



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA ODONTOLÓGICA

ERNANDA MARIA DE ARAÚJO SALES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA INCORPORAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO**

FORTALEZA

2016

ERNANDA MARIA DE ARAÚJO SALES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA INCORPORAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de concentração: Clínica Odontológica
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S155a Sales, Ernanda Maria de Araújo.
Avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano da incorporação de nanopartículas de prata em cimento de ionômero de vidro./ Ernanda Maria de Araújo Sales. – 2016.
46 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará; Centro de Ciências da Saúde; Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem; Departamento de Odontologia; Programa de Pós-Graduação em Odontologia; Mestrado em Odontologia, Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Clínica Odontológica.
Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues.
1. Cárie Dentária. 2. Cimentos de Ionômeros de Vidro. 3. Nanopartículas. 4. Streptococcus mutans. I. Título.

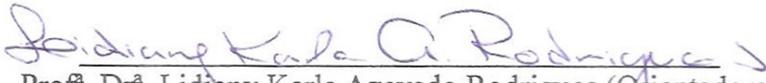
ERNANDA MARIA DE ARAÚJO SALES

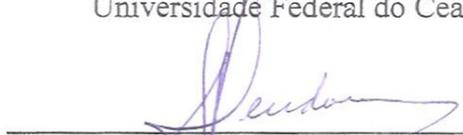
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA INCORPORAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO**

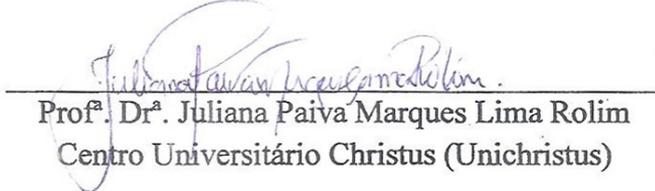
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em: 25/02/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof.^a. Dr.^a. Juliana Paiva Marques Lima Rolim
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Dedico este trabalho a Deus, pois sem ele nada seria possível. Aos meus pais, Maria e Ernando, e ao meu irmão, Lucas, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem em todos os momentos. E ao meu noivo Jefferson, um grande companheiro e incentivador.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **DEUS**, por estar sempre comigo, me protegendo e dando forças para continuar. Nos momentos mais difíceis, em que pensei que não conseguiria, a certeza de que para Deus nada é impossível me encorajou a prosseguir.

A toda a minha família, que sempre torceu pelo meu sucesso, pelas palavras de incentivo e de carinho, mas em especial aos meus pais amados, **ERNANDO SALES E MARIA FERREIRA**, que são exemplo de força e determinação; com vocês aprendi que não devemos desistir nunca e lutar sempre para alcançar nossos objetivos. Ao meu irmão, **LUCAS SALES**, que amo muito e que torce pela minha felicidade e realização profissional. A minha avó **MARIA**, que está sempre querendo me ver bem e feliz. Obrigada por estarem ao meu lado me apoiando sempre, vocês são a minha base e o amor por vocês me torna mais forte.

A **LUZIA CARVALHO**, que está junto a nossa família desde a minha infância e que torce muito pelo meu sucesso.

Ao meu noivo, **JEFFERSON WISNER**, que sempre me deu apoio em todos os momentos, entendendo minha ausência e sempre torcendo pela minha realização profissional. Obrigada pelo amor, dedicação, paciência e companheirismo. Agradeço pelo incentivo e pelo abraço que me dava força nos momentos em que estava desesperada, pelos dias em que me ajudou no laboratório, e por estar ao meu lado nesse momento tão especial.

A minha orientadora **DR^a LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES**, obrigada pelo conhecimento transmitido, por todo apoio, pelo carinho e disponibilidade em ajudar que demonstrou em todos os momentos. Agradeço a oportunidade de ser sua orientanda e poder conhecer essa profissional competente, dedicada, ética, humilde e essa pessoa admirável.

Aos professores **DR JULIANO SARTORI MENDONÇA E DR^a JULIANA PAIVA**, pela disponibilidade em participar da banca avaliadora desta defesa. Agradeço, antecipadamente, as valiosas contribuições para o trabalho.

À professora **DR^a PABLYANA RODRIGUES** e seu orientando **RODRIGO COSTA** pela disponibilização das nanopartículas de prata.

A minha dupla de pesquisa, **MARCELLA LIMA**, uma pessoa muito especial que este experimento me possibilitou conhecer e construir uma bela amizade. Obrigada pelas risadas, pelo apoio nos momentos em que mais precisei, e por ter me ajudado a concluir esta etapa tão importante. Juntas nós fomos mais fortes, e conseguimos seguir em frente, mesmo quando tudo parecia tão difícil. Você merece todo sucesso.

Ao amigo especial **PEDRO HENRIQUE ACIOLY**; somos amigos desde a graduação e desde então só tenho a agradecer todo o bem que me faz. Sua amizade é um presente e você é uma pessoa iluminada. Sua ajuda foi essencial. Obrigada pelo incentivo, torcida pelo meu sucesso e companheirismo.

À amiga **WESLANY MORAES**, que desde o início da pesquisa se propôs a ajudar, sempre muito solícita e atenciosa. Obrigada por todo carinho que teve em passar seus conhecimentos. Sua ajuda foi indispensável à conclusão deste trabalho.

Ao amigo **DAVID QUEIROZ**, obrigada pela amizade, palavras de estímulo, e por me acalmar nos momentos em que estava preocupada. Você foi muito importante para a realização deste trabalho, obrigada pela ajuda e por ter feito todo o possível para que eu conseguisse concluir esta pesquisa, além de tornar o ambiente do laboratório mais divertido.

À querida **DR^a RAMILLE LIMA**, pela sua disponibilidade em ajudar, pela forma em que compartilhou seus conhecimentos, e pelas palavras de estímulo.

À amiga querida **VANESSA FONTENELE**, uma supercompanheira que tive em todos os momentos do mestrado, desde os alegres aos mais difíceis, sempre soube que poderia contar com você. Sou muito grata por sua amizade e por estar sempre disponível a ajudar, além de tornar o ambiente do laboratório bem mais divertido.

Às amigas da graduação para a vida, **MARIANA CANUTO e DEBORAH CAVALCANTE**, pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos, por estarem comigo em mais essa fase tão especial.

Às amigas e companheiras de mestrado, **CINTHIA NARA, JÉSSICA RODRIGUES, BRUNA ALBUQUERQUE, LIANA FREIRE, NARA RODRIGUES e ZUILA TABOSA**, pelo apoio em todos os momentos. Foi muito bom ter vocês durante essa caminhada.

Aos amigos do **laboratório PPGO**, que tornaram as intermináveis horas de experimento mais divertidas e mais leves.

Aos amigos **SARAH GUEDES, MIRNA ARCANJO, HANIERY ALVES e ANA CATARINA REIS**, pelo carinho, força e incentivo, nos momentos em que mais precisei.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A liberação de fluoretos a partir de CIV pode ser importante para a prevenção de cáries ao redor de restaurações, principalmente devido aos seus efeitos sobre as fases minerais dos dentes e sobre o processo de remineralização. Considerando a falta de efeito dos fluoretos em bactérias cariogênicas, a incorporação de um agente antimicrobiano em CIV poderia contribuir para minimizar o risco de recidiva de lesões de cárie. A incorporação de nanopartículas de prata (NAg) tem sido testada em diversos materiais por apresentar efeito antimicrobiano de largo espectro, sem conduzir ao desenvolvimento de resistência bacteriana. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da incorporação de NAg em CIV em relação ao potencial antimicrobiano e inibição de lesões de cárie adjacente à restauração. NAg foi incorporada a um CIV comercial que foi comparada com o CIV inalterado e com um CIV reforçado com metais. Blocos de esmalte bovino (8x8x4 mm), nos quais foi realizado preparo cavitário na face vestibular (diâmetro: 4 mm e profundidade: 1,5 mm), foram restaurados utilizando o material restaurador de acordo com os grupos: CIVC (Riva Self Cure®-grupo controle), CIVS (Riva Silver®- com liga de prata), CIVNAg0,5 (Riva Self Cure® + 0,5% de NAg) e CIVNAg1 (Riva Self Cure® + 1% de NAg). Três blocos de cada grupo foram submetidos à formação de biofilme de *S. Mutans* por cinco dias e o experimento microbiológico foi feito em triplicata. O efeito antimicrobiano foi avaliado através da contagem de UFCs (unidades formadoras de colônia) e análise do peso seco. Os blocos submetidos ao modelo microbiológico de indução de cárie foram analisados através do teste de microdureza Knoop em corte longitudinal do esmalte a 50 µm e 100 µm a partir da margem de restauração e, para determinar desmineralização ao redor de restaurações, foi utilizado o parâmetro Delta S (ΔS). Os dados foram analisados utilizando ANOVA (um fator) para dados referentes às UFCs e peso seco, e ANOVA (dois fatores) para análise dos dados do Delta S, com nível de significância pré-estabelecido em 5%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas médias de UFC ($p=0,644$), peso seco ($p=0,569$) e perda mineral em esmalte (ΔS) a 50µm ($p= 0,241$) e 100µm ($p= 0,777$), entre os grupos testados. A incorporação de NAg nas concentrações testadas em CIV não apresentou diferenças significativas quando comparada ao CIV convencional e ao CIV com liga de prata na atividade antimicrobiana e no efeito sobre inibição de lesão de cárie.

Palavras-chave: Cárie Dentária. Cimentos de Ionômeros de Vidro. Nanopartículas.

Streptococcus mutans.

ABSTRACT

The fluoride release from glass CIV may be important for preventing caries around restorations, mainly due to their effects on the mineral phase of teeth and the remineralization process. Considering the lack of effect of fluorides on cariogenic bacteria, the incorporation of an antimicrobial agent in GIC could help to minimize the risk of recurrent caries. The incorporation of the silver nanoparticles (NAg) has been tested in various materials by having an antimicrobial effect with wide spectrum without leading to the development of bacterial resistance. The aim of this study was to evaluate the effect of NAg incorporation in GIC regarding the antimicrobial potential and inhibition of caries lesions adjacent to the restoration. NAg was incorporated into a commercial GIC that was compared with the unmodified GIC and with a compound commercially available silver alloy in composition. Enamel bovine blocks (8x8x4 mm), in which was held cavity preparation on the buccal surface (diameter: 4 mm and depth: 1.5 mm), were restored using the restorative material according to the groups: CIVC (Riva Self Cure®- control), CIVS (Riva Silver®- with silver alloy), CIVNAg0,5 (Riva Self Cure® + 0,5% NAg) and CIVNAg1 (Riva Self Cure® + 1% NAg). Three blocks of each group were subjected to biofilm formation of *S. mutans* for 5 days and microbiological experiment was done in triplicate. Antimicrobial effect was assessed by CFU counts (colony forming units) and dry weight analysis. The blocks subjected to microbiological model of caries induction were analyzed using the Knoop hardness test in longitudinal section of enamel, 50 μm and 100 μm from the restoration margin and to determine demineralization around restorations Delta S (ΔS) parameter was used. Data were analyzed using ANOVA (one factor) for data regarding the CFUs and dry weight as ANOVA (two factors) was used for Delta S data analysis, at a pre-determined significance level of 5 %. No statistically significant differences were observed in mean CFU ($p = 0.644$), dry weight ($p = 0.569$) and mineral loss of enamel (ΔS) to 50 μm ($p = 0.241$) and 100 μm ($p = 0.777$) between tested groups. The incorporation of NAg in concentrations tested in GIC showed no significant differences when compared to conventional GIC and GIC with silver alloy in antimicrobial activity and the effect on inhibition of caries lesions.

Keywords: Dental Caries. Glass ionomer cements. Nanoparticles. *Streptococcus mutans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aparência dos blocos de esmalte restaurados.....	28
Figura 2 – Modelo microbiológico de formação de biofilme.....	29
Figura 3 – Coleta do biofilme formado sobre o bloco após cinco dias.....	30
Figura 4 – Aspecto dos blocos após corte e embutimento, para realização de microdureza longitudinal. Imagem lupa estereoscópica (aumento 40x).....	31
Figura 5 – Desenho esquemático das indentações realizadas durante a análise de microdureza de corte longitudinal	32
Figura 6 – Imagem dos materiais restauradores em microdurômetro (Future Tech 9000 FM) (Lente aumento de 10 x).....	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Cálculo da perda de dureza (ΔS)	
Gráfico 2 – Média e desvio padrão do efeito antibacteriano (contagem de UFC).....	35
Gráfico 3 – Média e desvio padrão do peso seco do biofilme	36
Gráfico 4 – Média e desvio padrão do perfil da perda de dureza (ΔS) dos grupos avaliados às distâncias de 50 μm e 100 μm da margem da restauração.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Materiais restauradores por grupo.....	25
Tabela 2 – Especificações dos CIVs testados	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIV	Cimento de ionômero de vidro
NAg	Nanopartículas de prata
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	PROPOSIÇÃO	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Tipo de estudo	24
4.2	Síntese das nanopartículas de prata	24
4.3	Formulações dos materiais experimentais	25
4.4	Grupos experimentais	25
4.5	Obtenção das amostras	26
4.5.1	<i>Blocos de esmalte</i>	26
4.5.2	<i>Preparo das cavidades</i>	27
4.5.3	<i>Preparo dos materiais e restauração dos blocos de esmalte</i>	27
4.6	Modelo Microbiológico	28
4.6.1	<i>Análise do biofilme</i>	30
4.6.2	<i>Análise de peso seco do biofilme</i>	31
4.7	Análise da microdureza de corte longitudinal	31
4.8	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é resultado da produção de ácido pelas bactérias da placa bacteriana (biofilme oral) durante a fermentação de açúcares da dieta, sendo considerada, portanto, uma doença biofilme-açúcar dependente e, quando não controlada, pode levar à destruição dental (BAKRY *et al.*, 2014; CURY *et al.*, 2009; TENUTA *et al.*, 2010).

Biofilme é uma comunidade cooperativa, bem organizada, de células microbianas aderidas a uma superfície úmida e aglomerada por matriz de polissacarídeos, podendo haver formação a partir de uma ou múltiplas espécies (FLEMING; WINGENDER, 2010; SPATRT; PRATTEN, 2003). A cárie desenvolve-se através de um biofilme composto por bactérias cariogênicas, altamente eficientes na conversão de carboidratos em ácidos orgânicos que desmineralizam os substratos dentários (SHEN *et al.*, 2004).

Na superfície dentária, os colonizadores iniciais se aderem à película adquirida - uma camada de proteínas derivada da saliva e/ou dieta, tendo como principais componentes glicoproteínas, fosfoproteínas, lipídios e componentes do fluido crevicular gengival (FERJESKOV, 2008). As forças físico-químicas envolvidas na agregação inicial das bactérias são essenciais ao desenvolvimento do biofilme, podendo ser forças inicialmente fracas de longo alcance (> 50 nm) e, em seguida, fortes de pequeno alcance (< 5 nm), intensificadas em função das adesinas na superfície celular microbiana, tornando-se interações específicas, com receptores complementares na película adquirida (ALLAKER, 2010; FERJESKOV, 2008). Essas interações podem ter impacto no sucesso da terapia antimicrobiana na desordem inicial do biofilme (SUTHERLAND, 2001). Após o crescimento desses primeiros colonizadores, o microambiente local torna-se susceptível à sobrevivência de outras espécies em um processo conhecido como sucessão microbiana (FERJESKOV, 2008).

Um dos micro-organismos mais estudados e historicamente relacionado à cárie dentária é o *Streptococcus mutans*, sendo considerado o micro-organismo mais cariogênico da microbiota bucal e implicado em todos os tipos de cárie dentária (LIU *et al.*, 2013) e, juntamente aos lactobacilos, estão envolvidos com a progressão da doença (BADET; THEBAUD, 2008).

Entre os fatores de virulência de *S. mutans*, destacam-se sua capacidade de adesão à superfície dentária, seu potencial acidogênico (capacidade de produzir ácido a partir de carboidratos fermentáveis da dieta) e acidúrico (capacidade de crescer e metabolizar preferencialmente em meio ácido, além de tolerar ambientes de baixo pH). Os polissacarídeos secretados por *S. mutans* e outras bactérias da placa fornecem a adesão à estrutura dental

através da película e produzem mais carboidratos para o metabolismo bacteriano quando fontes alimentares tenham sido esgotadas (CCAHUANA-VÁSQUEZ *et al.*, 2010; MOUNT, 2005).

A doença cárie é resultante de uma alteração no equilíbrio fisiológico entre os íons minerais presentes na estrutura do dente e fluido da placa dentária, representado por processos de desmineralização e remineralização (FERJESKOV, 2004). A mudança na saturação do fluido da placa ocorre pela redução do pH, como consequência da produção de ácido pelas bactérias, causando uma diminuição no nível de pH abaixo de 5,5, o que resulta na desmineralização dos cristais de hidroxiapatita do esmalte e quebra proteolítica da estrutura de tecidos duros do dente. Os processos alternados de diminuição e aumento do pH são seguidos pelos respectivos processos de desmineralização e remineralização da superfície do dente. Em condições saudáveis, esses processos estão em equilíbrio e sem danos permanentes à superfície dental (MELO *et al.*, 2013a; STRUZYCKA, 2014).

Durante anos, havia dificuldades para distinção da cárie como uma doença de seus sinais: as lesões de cárie. A odontologia restauradora tradicional baseava o diagnóstico e o tratamento da doença cárie quase exclusivamente no reparo da lesão. Uma cavidade, no entanto, é apenas o resultado de uma perda mineral progressiva provocada por cáries, dependente da presença de exposição de biofilme e do açúcar (CURY *et al.*, 2009). Já o atual modelo da dentística está vinculado a uma promoção de saúde e contempla a verificação da atividade da doença. Além disso, adota medidas educacionais e preventivas, equilibrando o processo de des-remineralização do tecido dental e o progresso da doença (JINGARWAR *et al.*, 2014).

Baseadas na odontologia minimamente invasiva, abordagens para gerenciamento de cárie ganharam grande importância, sendo sugerido que apenas a dentina infectada (amolecida) seja removida, tendo em vista a capacidade de remineralização da dentina afetada. Dessa forma, evita-se desgaste excessivo e risco de exposição e envolvimento pulpar em cavidades profundas (HAYASHI *et al.*, 2011). No entanto, mesmo após a remoção da camada infectada, muitos micro-organismos podem permanecer viáveis no substrato dentinário, mesmo na presença de um padrão de selamento (DUQUE *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2006).

Os cimentos de ionômero de vidro (CIV) são bastante utilizados na odontologia. São materiais que apresentam muitas formulações que conferem grande versatilidade e eficácia clínica, justificando sua indicação para uma variedade de situações clínicas, tais como forrador de cavidades, agente de cimentação, selamento de cicatrículas e fissuras e

restaurações dentárias (BERG *et al.*, 2015). Eles são derivados de ácidos orgânicos, geralmente um ácido polimérico aquoso e um componente de vidro, como o fluor-alumínio-silicato, embora possam ser encontrados outros componentes em produtos comerciais diferentes (MOSHAVERINIA *et al.*, 2011; VAN NOORT, 2000). O CIV é considerado um material restaurador de alta relevância clínica, especialmente por sua adesão química à estrutura dentária, biocompatibilidade, capacidade de liberação e reincorporação de flúor ao longo do tempo e coeficiente de expansão térmica semelhante ao da estrutura dentária (KOVARIK *et al.*, 2005).

Entre os materiais restauradores dentários, o cimento de ionômero de vidro é considerado o mais cariostático, devido à sua liberação de flúor. O potencial anticárie do flúor advém da atuação desse íon diminuindo a desmineralização e melhorando a remineralização (WIEGAND *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2011). Esses íons, disponíveis mais frequentemente no meio bucal, podem, de forma efetiva, diminuir a taxa de progressão da lesão em cada superfície dentária, onde ocorre acúmulo de biofilme e exposição regular a açúcares da dieta (CURY *et al.*, 2016). Embora o flúor seja a mais importante substância anticárie, seu efeito antibacteriano é limitado, pois sua atuação sobre o metabolismo das bactérias ocorre apenas em concentrações de 10 ppm ou superior, portanto, impossibilitando sustentar essa concentração no biofilme (BRADSHAW *et al.*, 2002; MARINHO, 2008).

Desta forma, considerando o papel do biofilme oral na etiologia da cárie dentária, a incorporação de componentes dotados de propriedades antimicrobianas em cimento de ionômero de vidro pode ser uma estratégia eficaz para modificar a cariogenicidade do biofilme, contribuir para a eliminação de infecção residual, minimizar o risco de cárie secundária e inibir o desenvolvimento de lesões de cárie ao redor de áreas restauradas (interface dente/restauração) (DE CASTILHO *et al.*, 2013). Portanto, poderia tornar o tratamento preventivo-restaurador global mais eficaz, através do controle do biofilme por meio da liberação controlada de um agente antimicrobiano *in loco*.

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem tido um grande impacto, com muitas aplicações em diversas áreas, principalmente, no campo da medicina, no qual metais tais como prata, cobre e ouro têm sido aplicados como uma importante ferramenta para manter e preservar a saúde. A prata tem uma longa história de uso na medicina como um agente antimicrobiano (AHN *et al.*, 2009). Além disso, tem sido demonstrado que, em baixas concentrações, a prata não é tóxica para as células humanas, e que o efeito bactericida de nanopartículas de prata depende do tamanho e forma da partícula (KIM *et al.*, 2007; RAI *et al.*, 2009).

Embora haja muito conflito na literatura sobre qual é o mecanismo de atuação de nanopartículas de prata sobre os micro-organismos, acredita-se que é um efeito multifacetado, através de interação com a parede celular ou membrana plasmática, com DNA bacteriano e com proteínas bacterianas, contribuindo para proporcionar um vasto espectro de atividade antimicrobiana. Além disso, a presença de múltiplos mecanismos bactericidas atuando em sinergia torna a resistência bacteriana extremamente rara. (CHALOUPIKA *et al.*, 2010; SILVER, 2003).

Diante do exposto, uma combinação de flúor (potencial anticárie) e de nanopartículas de prata (potencial antimicrobiano) poderia apresentar resultados terapêuticos promissores, enfatizando a significância clínica deste estudo. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de prata em cimento de ionômero de vidro sobre o potencial antimicrobiano e inibição de lesões de cárie adjacentes à restauração.

2 PROPOSIÇÃO

- Avaliar o efeito da adição de nanopartículas de prata em cimento de ionômero de vidro quimicamente ativado na inibição da formação de biofilme *in vitro* de *S. mutans* sobre os dentes restaurados e na inibição da formação de lesões de cárie ao redor da restauração, através de microdureza de corte longitudinal.

-Adicionalmente, o estudo objetivou comparar o efeito anticárie dos cimentos contendo 0,5% ou 1% de nanopartículas de prata com aqueles de um cimento de ionômero de vidro quimicamente ativado comercial contendo liga de prata na sua composição.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A cárie dentária continua sendo a doença oral mais comum e generalizada, resultando na destruição da estrutura do dente, causada devido à produção de ácido por bactérias cariogênicas encontradas no biofilme dental (FERJESKOV, 2004). A cárie dentária apresenta biofilme e açúcar como fatores determinantes para o surgimento da doença, porém uma série de outros fatores pode aumentar o risco de seu desenvolvimento. Esses fatores podem ser biológicos, físicos, ambientais e comportamentais, tais como: elevado número de bactérias cariogênicas, alterações no fluxo salivar, baixa exposição a fluoretos, má higiene oral, métodos inadequados de alimentação, entre outros (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007).

A abordagem primária deve ser baseada na prevenção. Higiene oral adequada, associada ao uso de dentifrício preferencialmente fluoretado, e a restrição da ingestão de carboidratos da dieta é essencial para alcançar o máximo controle de cárie (CURY *et al.*, 2016). O tratamento secundário deve estar centrado na gestão do processo de cárie, com uma abordagem minimamente invasiva e máxima preservação do tecido dental (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Abordagens de adequação do meio bucal através de procedimentos clínicos, dentre eles selamento provisório de cavidades abertas e remoção de fatores retentivos de placa, podem diminuir risco/atividade de cárie (VOLPATO *et al.*, 2011).

Apesar de a cárie não ser o resultado de deficiência de flúor, esse íon é o único agente terapêutico conhecido por controlar eficazmente a progressão da lesão de cárie, e materiais que liberam flúor podem ser considerados uma forma ou veículo de entrega de flúor. O efeito anticárie do flúor pode ser obtido pelo mesmo modo de ação, independentemente da fonte ou forma de utilização (CURY *et al.*, 2016). Ele pode inibir a desmineralização e promover a remineralização dos tecidos dentários duros. No entanto, a dificuldade de penetração em depósitos de placa residuais poderia diminuir seu poder inibitório, em locais de difícil acesso e estagnação (WATSON *et al.*, 2005). Consequentemente, controle de lesões de cárie em margens de restaurações e em superfícies proximais ainda são desafios para a pesquisa na área de cariologia (MALTERUD, 2012).

Cimentos de ionômero de vidro são um grupo de materiais desenvolvidos para uso em odontologia no final dos anos 1960 e início dos anos 1970. Atualmente, apresentam diferentes composições e são amplamente utilizados em várias áreas da odontologia (KOVARIK; HAUBENREICH; GORE, 2005; WILSON; KENT, 1972).

Cimentos de ionômero de vidro possuem muitas propriedades que são clinicamente úteis e que promovem longevidade. Possuem adesão à estrutura dentária,

proporcionam período prolongado de liberação de flúor (potencial anticárie), estética aceitável e biocompatibilidade (CHOI; LEE; KIM, 2008; YLI-URPO *et al.*, 2005). No entanto, apresentam desvantagens como baixa resistência, tempo de presa lenta e sensibilidade à umidade (KOVARIK; HAUBENREICH; GORE, 2005; MOSHAVERINIA *et al.*, 2011).

Em odontologia restauradora preventiva, cárie secundária é uma questão crítica e sua prevenção desempenha um papel fundamental para obtenção de longevidade em restaurações. Ela ocorre na interface entre a restauração e o preparo cavitário, sendo a principal razão para falha de restauração tanto em resinas compostas como em cimentos de ionômero de vidro (DELIGEORGI; MJOR; WILSON, 2001; FORSS; WIDSTROM, 2004; KIRKEVANG; VAETH; WENZEL, 2011; MJOR; DAHL; MOORHEAD, 2002).

Outro tipo de tratamento restaurador em que o cimento de ionômero de vidro é comumente utilizado é o ART (do inglês *Atraumatic Restorative Dentistry*), que envolve a remoção de tecido cariado utilizando apenas instrumentos manuais seguido do selamento com material adesivo e é muito utilizado em crianças em idade pré-escolar ou quando não há possibilidade de utilização de instrumentos rotatórios (PRABHAKAR; PRAHLAD; KUMAR, 2013; TAKAHASHI *et al.*, 2006). Um material com propriedades anticárie e antimicrobiana poderia minimizar o aparecimento de lesões de cárie secundária, principalmente em áreas de difícil acesso para escovação, além de ser interessante para uso em técnicas de ART.

A literatura científica apresenta tentativas de melhorar o desempenho de restaurações dentárias através da incorporação em materiais dentários de agentes com atividade antimicrobiana, como: íons prata, íons zinco, compostos quaternários de amônio e clorexidina (MELO *et al.*, 2013a; TAKAHASHI *et al.*, 2006). Entretanto, embora a presença de antimicrobianos em materiais dentários possa contribuir para o tratamento restaurador, uma avaliação sobre alterações nas propriedades mecânicas deve ser concluída antes de sua utilização na prática clínica. Além disso, o agente antibacteriano deve apresentar ausência ou baixa citotoxicidade. Em relação ao CIV, qualquer modificação feita a esse material deve ser avaliada para não interferir na sua importante propriedade que o torna tão utilizado: o seu efeito anticárie pela liberação de flúor (SOUZA *et al.*, 2006).

A prata tem uma atividade antibacteriana superior, em comparação com outros metais, apresenta um forte efeito citotóxico em uma ampla gama de micro-organismos nas formas metálicas e iônica (BÜRGERS *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2013b).

A primeira tentativa de incorporação de prata em cimento de ionômero de vidro deu-se objetivando proporcionar maior resistência e também radiopacidade. Em trabalho de

Simmons (1983), foi introduzida a chamada mistura milagrosa (Miracle Mix ®), que consistia na mistura de pó de ionômero de vidro e pó de liga de prata de amálgama. Em 1985, McLean & Gasser desenvolveram o CERMET, no qual partículas de prata são fundidas em conjunto com partículas de vidro (SIMMONS, 1983 *apud* MCLEAN; GASSER, 1985 *apud* WILLIAMS; BILUNGTON; PEARSON, 1997).

Apesar de ser dito que CIVs reforçados por metais possuem capacidades mecânicas superiores quando comparados aos CIVs convencionais, na literatura não há consenso que suporte essa visão, devido à variedade de materiais e métodos de ensaio utilizados (SARKAR, 1999; YAP; CHEANG; CHAY, 2002). Os estudos que avaliam os cimentos de ionômero de vidro reforçados por metais buscaram observar se eles apresentam maior resistência, não existindo estudos relatados que investiguem se algum efeito antimicrobiano é obtido com a utilização desse material.

A nanotecnologia está trazendo progressos para várias áreas do conhecimento científico, incluindo a Odontologia. Os materiais são convertidos em escala nanométrica de até 100 nm (ABOU NEEL *et al.*, 2015). Tem sido aplicada na obtenção de materiais dentários como um conceito inovador para o desenvolvimento de produtos com melhores propriedades e potencial anticárie. Dessa forma, tem proporcionado a obtenção de partículas de prata cada vez menores, com maior eficácia contra bactérias e menor toxicidade (CHOI *et al.*, 2008; FOLDBJERG *et al.*, 2009). O aumento das superfícies de contato das nanopartículas quando comparadas àquelas das usuais dimensões micrométricas e o fato de as reações químicas ocorrerem nas superfícies explica sua maior reatividade em comparação a partículas maiores (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010).

O uso de NAg em Odontologia e Medicina tem sido estimulado, porque tem um efeito antimicrobiano de largo espectro, quando utilizado em concentrações baixas e porque não conduz ao desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes (MORONES *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2013). O mecanismo antimicrobiano de NAg não foi completamente esclarecido (ALLAKER, 2010). No entanto, a ação antimicrobiana pode ser proporcional à quantidade de íons de prata liberados (Ag⁺) e sua interação com as membranas das células bacterianas (PENG; BOTELHO; MATINLINNA, 2012). Os íons de prata fornecem efeito bactericida por interações com a parede celular de peptidoglicano e a membrana plasmática (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010). Esses íons podem impedir a replicação de DNA bacteriano (RADZIG *et al.*, 2013) através da interação com proteínas bacterianas, especialmente com as enzimas envolvidas em processos celulares vitais, como a cadeia de transporte de elétrons (RADZIG *et al.*, 2013; SETH *et al.*, 2011).

Estudo realizado previamente incorporou nanopartículas de prata 0,1% e nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo 10-40% em adesivo, obtendo como resultado uma atividade antimicrobiana potente, mantendo uma forte resistência de união à dentina. O efeito antibacteriano foi fornecido pela NAG, reduzindo as contagens de UFC (MELO *et al.*, 2013b). Mais recentemente, outra pesquisa avaliou e comparou o efeito antimicrobiano da incorporação de 1% de nanopartículas de prata e 1% de nanopartículas de óxido de zinco em resinas compostas (*flow*) sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*. Ambos os grupos apresentaram atividade antibacteriana significativa contra os dois micro-organismos em relação ao grupo controle, porém, em relação aos *Lactobacillus*, não houve diferença significativa do efeito entre materiais com prata ou óxido de zinco e, já em relação ao *Streptococcus mutans*, o óxido de zinco demonstrou melhor resultado (KASRAEI *et al.*, 2014).

A incorporação de 0,1% de nanopartículas de prata em cimento de ionômero de vidro modificado por resina, para uso em ortodontia, foi testada com o objetivo de conferir um efeito antimicrobiano para inibir formação de lesões de mancha branca. Além de análise microbiológica, avaliação de resistência ao cisalhamento também foi observada e, como resultado, houve uma redução significativa na formação e atividade do biofilme, sem comprometimento da resistência ao cisalhamento (WANG X; WANG B; WANG Y, 2015).

A citotoxicidade da incorporação de nanopartículas de prata em duas concentrações 0,1% e 0,2% em relação a células pulpares em cimentos de ionômero de vidro convencional e cimento de ionômero de vidro modificado por resina foi avaliada recentemente (SIQUEIRA *et al.*, 2015). Como resultado, o CIV modificado por resina apresentou redução significativa na viabilidade celular mesmo sem adição de NAg, e não houve diferença significativa entre a presença ou ausência de prata nesse material. No entanto, o CIV convencional não apresentou diferença significativa em relação à viabilidade celular quando comparado ao controle negativo e também não houve diferença no grupo com e sem NAg. Portanto, o CIV convencional com NAg demonstrou não apresentar toxicidade para células pulpares, nas concentrações testadas (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Diante do que foi exposto, observa-se um potencial antimicrobiano de nanopartículas de prata sobre inibição de bactérias que participam da etiologia da cárie, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*. Portanto, sua incorporação em materiais dentários deve ser mais estudada, para avaliar a concentração ideal, avaliando doses biocompatíveis e com eficácia antimicrobiana; além disso, avaliar sua influência nas propriedades mecânicas do material. O efeito antimicrobiano da incorporação de nanopartículas de prata em CIV

convencional ainda não foi testado. No entanto, caso apresente efeitos de inibição bacteriana e não prejudique as propriedades do material, principalmente a liberação de flúor, poderia contribuir para melhorar o desempenho clínico do material, principalmente auxiliando a prevenção de cáries secundárias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, do tipo investigação experimental em laboratório ou *in vitro*. Os procedimentos laboratoriais foram executados nos Laboratórios de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, em parceria com o Labpol (Laboratório de Polímeros) do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, para obtenção das partículas a serem testadas no estudo.

4.2 Síntese das nanopartículas de prata

Foi utilizado um reator ultrassônico de marca VCX 750 ultrasonic (Sonics & Materials, Newtown, USA), de frequência 20 kHz com tip (ponteira) de diâmetro 13 mm, operando com amplitude de 40% e atingindo potência média de 34 W. Para a estabilização das nanopartículas de prata, utilizou-se a galactomanana isolada de sementes de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis Benth*), oriundas do município do Crato, CE, seguindo a metodologia descrita por Cunha *et al.*, (2009).

A galactomanana foi dissolvida em 100 mL de água deionizada, sob agitação magnética em temperatura ambiente por 24 h, na concentração 0,032% (m/v). Após a completa dissolução da galactomanana, o pH da solução foi ajustado com NaOH (1 mol/L) até atingir o pH 12,0. Em seguida, 80 mL da solução foram transferidos para uma cuba de parede dupla refrigerada com água por banho termostaticado, a fim de manter a temperatura do sistema a 25°C. Após verificar a temperatura através do termopar do aparelho ultrassônico, adicionaram-se 2 mL de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO₃). As sínteses foram realizadas utilizando solução de AgNO₃ na concentração de 10 mmol/L. O sistema foi deixado sob sonicação de forma contínua, por 3 h. Após o tempo de síntese, o sistema reacional foi posto para dialisar contra água deionizada e a diálise acompanhada por condutância; por último, o sistema foi liofilizado.

4.3 Formulações dos materiais experimentais

O cimento de ionômero de vidro convencional restaurador escolhido para o estudo foi o Riva Self Cure (SDI/Victoria/Austrália). As formulações de materiais testados neste estudo foram preparadas por meio da incorporação de pó contendo nanopartículas de prata na concentração de 10 mM, para obter formulações finais contendo 0,5% e 1% de nanopartículas de prata, de acordo com o grupo experimental. Os cimentos foram aglutinados manualmente, de acordo com as instruções do fabricante (proporção v/v) para todos os ensaios realizados a uma temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa de $50 \pm 10\%$, tal como recomendado pela ISO 9917-1: 2003. No entanto, o CIV reforçado por prata, Riva Silver (SDI/Victoria/Austrália), por se apresentar em cápsulas, foi manipulado segundo o fabricante por 10 s, com a utilização de amalgamador Ultramat (SDI/Victoria/Austrália).

4.4 Grupos experimentais

Foram utilizados 36 dentes bovinos para obtenção de 36 blocos de esmalte, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo utilizadas três unidades amostrais em cada grupo por triplicata. Os grupos estudados estão descritos na Tabela 1. Na Tabela 2, estão descritas as especificações dos materiais testados.

Tabela 1. Materiais restauradores por grupo.

GRUPOS	DESCRIÇÃO
CIVC (Riva Self Cure®-grupo controle)	Cimento de ionômero de Vidro Convencional
CIVS (Riva Silver®- com liga de prata)	Cimento de Ionômero de Vidro com liga de prata
CIVNAg0,5 (Riva Self Cure® + 0,5% de NAg)	Cimento de ionômero de Vidro Convencional com 0,5% de nanopartículas de prata
CIVNAg1 (Riva Self Cure® + 1% de NAg)	Cimento de ionômero de Vidro Convencional com 1% de nanopartículas de prata

Tabela 2. Especificações dos CIVs testados.

Riva Self Cure	SDI/Victoria/Austrália	Convencional	Pó: Fluoreto de silicato de alumínio Ácido poliacrílico Líquido: Ácido poliacrílico Ácido tartárico
Riva Silver	SDI/ Victoria/ Austrália	Reforçado com liga de prata	Pó: Fluoreto de silicato de alumínio Ácido poliacrílico Liga de prata, Estanho e Cobre Líquido: Ácido poliacrílico Ácido tartárico

4.5 Obtenção das amostras

4.5.1 Blocos de esmalte

Foi realizada a limpeza dos dentes, os quais foram raspados manualmente com curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), para remoção de restos teciduais ou outros detritos. A seleção dos dentes para o estudo foi realizada utilizando-se uma lupa estereoscópica (Leica microsystem LTD, Wetzlar, Germany), com aumento de 4x, com a finalidade de detectar possíveis trincas, lesões de cárie ou outras alterações estruturais que pudessem vir a comprometer o experimento. Em seguida, os dentes foram armazenados em

solução de timol a 0,1% sob refrigeração e utilizados por um período não superior a seis meses.

Os dentes incisivos bovinos foram fixados com cera pegajosa (Kota Ind. E Com. Ltda, São Paulo, SP) no centro de uma placa de acrílico (40 x 40 x 5 mm) e seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, através do emprego de disco diamantado dupla face (Modelo 12205, Extec®, Enfield, CT, EUA) montado em uma cortadeira metalográfica (Isomet®, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob baixa rotação e refrigeração abundante com água destilada. Nas faces vestibulares dos dentes, foram realizados cortes seriados para a obtenção de blocos de esmalte (8x8x4 mm).

4.5.2 Preparo das cavidades

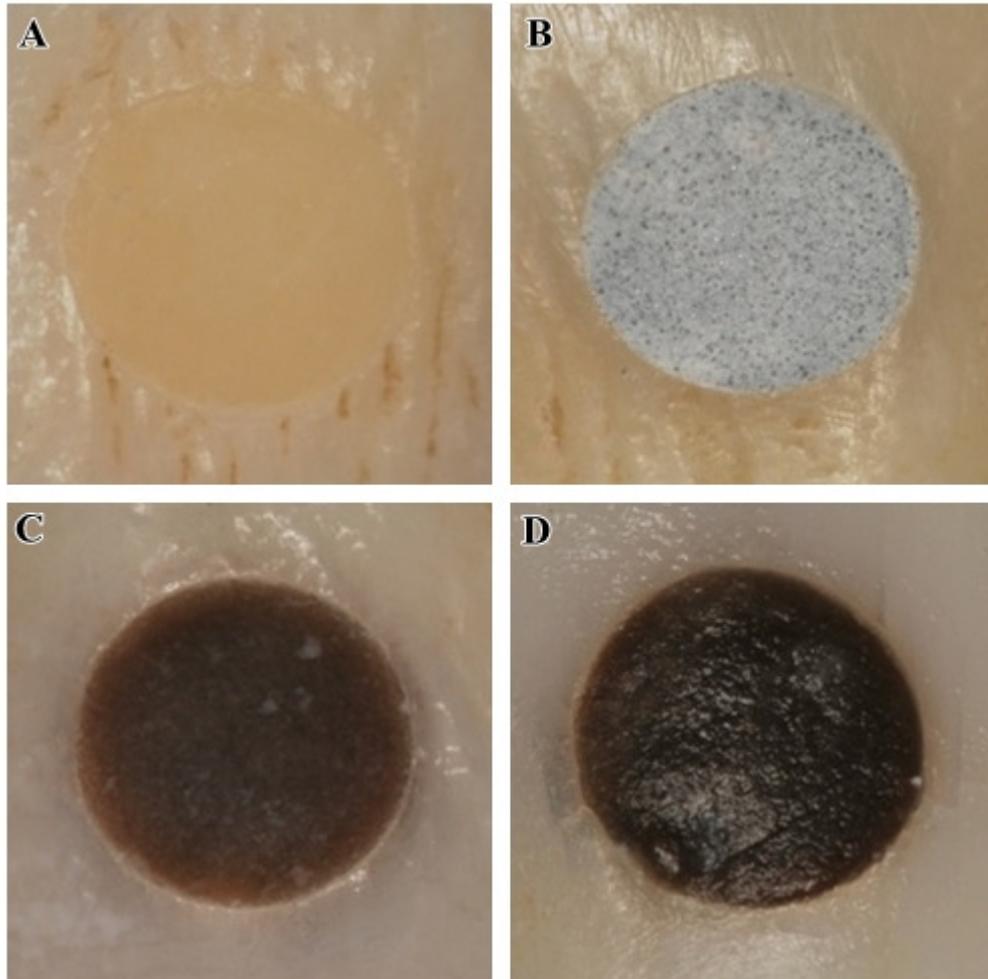
Para a realização do preparo cavitário, os blocos de esmalte foram fixados em lâminas de cera utilidade, com a face vestibular voltada para cima. Todos os preparos em forma cilíndrica foram realizados com pontas diamantadas cilíndricas nº 2294 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo) para padronização da profundidade de aproximadamente 1,5 mm e pontas diamantadas nº 3053 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo) para padronização do diâmetro 4 mm. As pontas diamantadas foram trocadas a cada cinco preparos, visando manter o mesmo poder de desgaste, evitar um maior aquecimento da estrutura dentária e impedir a perda da padronização do diâmetro das cavidades. As cavidades foram realizadas com turbina de alta rotação (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil) sob refrigeração.

4.5.3 Preparo dos materiais e restauração dos blocos

Os blocos foram esterilizados em microtubos tipo eppendorfs abertos com solução salina em autoclave a 121°C por 15 min. Em uma câmara de fluxo laminar (Filtracom, Valinhos, SP), as cavidades presentes nos blocos de esmalte foram restauradas com os materiais descritos na Tabela 1. Os cimentos foram preparados de acordo com as especificações do fabricante, e as nanopartículas de prata foram adicionadas ou não, de acordo com o grupo ao qual pertencia o espécime. O pó foi pesado em uma balança analítica (modelo: Auw220D; Shimadzu, Tóquio/Japão), e foi preparado de acordo com o peso, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante, de acordo com o grupo de tratamento, utilizando 0,00095g e 0,001910g de pó contendo nanopartículas de prata, respectivamente para os grupos CIVNAg0,5 e CIVNAg1. Os espécimes, após restaurados, foram

armazenados por 24 h, em ambiente úmido, aguardando-se o tempo de presa total do material e somente foram introduzidos no modelo microbiológico de indução de cárie após esse período. Na Figura 1, observa-se os blocos restaurados com os diferentes materiais.

Figura 1. Aparência dos blocos de esmalte restaurados. **A** (CIVC); **B** (CIVS); **C** (CIVNAg0,5); **D** (CIVNAg1).



4.6 Modelo microbiológico

Para a indução de cárie em esmalte, utilizou-se um modelo microbiológico de formação de biofilme durante cinco dias e, por se tratar de um experimento microbiológico, o mesmo modelo foi feito em triplicata. Cultura de *S. mutans* UA 159 foi utilizada como inóculo, a fim de proporcionar desafio cariogênico aos blocos de esmalte. Inicialmente, *S. mutans* foram ativados em meio para crescimento (TSB com Glicose 10%) durante 18 h em

estufa bacteriológica com 5% de CO₂ a 37°C (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Após esse período, foi feita a inoculação de 100 µL de cultura de *S. mutans* crescidos *overnight*, previamente ajustados utilizando uma escala de McFarland, obtendo uma turvação correspondente a 1-2x10⁸ UFC/mL. Os blocos de esmalte restaurados foram imersos em solução de *Tryptic Soy Broth* (TSB) contendo extrato de levedura e sacarose a 10% (p/v) em placas de 24 poços (Biofil TCP011024), sendo distribuídos 2 mL de meio em cada poço, Figura 2.

A inoculação das placas de 24 poços foi realizada uma única vez, no primeiro dia do experimento e foram incubados em estufa bacteriológica com 5% de CO₂ a 37°C e mantidos em repouso durante 24 h para permitir a formação de biofilme inicial. Após esse período, os espécimes eram lavados uma vez ao dia, por imersão, três vezes em uma placa contendo solução de NaCl a 0,89%, objetivando remover o biofilme fracamente aderido; em seguida, eram transferidos com pinça esterilizada para novas placas de 24 poços com meio TSB estéril. Esse processo de troca foi realizado durante cinco dias seguidos (DUARTE *et al.*, 2006).

Figura 2. Modelo microbiológico de formação de biofilme.



4.6.1 Análise do biofilme

Ao final dos cinco dias de crescimento, os biofilmes formados sobre os blocos foram coletados com espátula 3S estéril, como observado na Figura 3, e transferidos para microtubos tipo eppendorf pré-pesados e, após obtenção do peso úmido do biofilme, foi calculada a quantidade de solução salina NaCl 0,89% a ser acrescentada (1 μ L/mg de biofilme) e sonicados em sonicador de alta potência (Branson Ultrasonics 250,USA) durante 45 s, com intervalos de 15 s sob refrigeração, com a finalidade de obter suspensões contendo células simples. Em seguida, a suspensão foi diluída em série (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1.000.000 e 1:10.000.000), e alíquotas de 10 μ L foram semeadas em triplicata em meio Brain-Heart Infusion (BHI ágar) para contagem de estreptococos do grupo mutans. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C em uma pressão parcial de 5% de CO₂ por 48 h. Após a incubação, a viabilidade celular bacteriana foi mensurada pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), e os valores finais foram expressos em (UFC/mL/mm²).

Figura 3. Coleta do biofilme formado sobre o bloco após cinco dias.



4.6.2 Análise de peso seco do biofilme

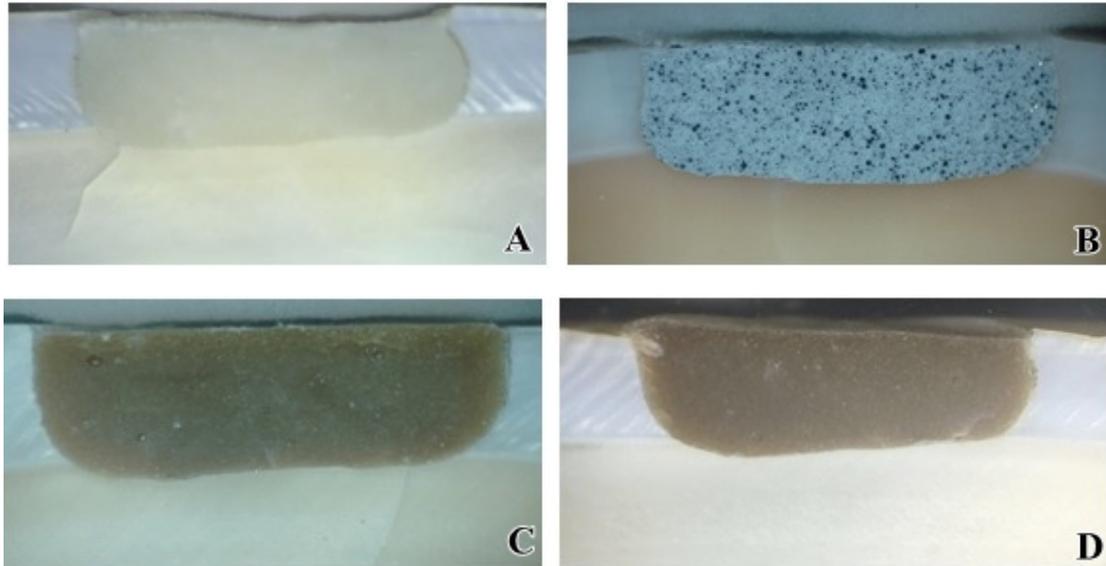
Para a análise do peso seco do biofilme formado ao final dos cinco dias de experimento, após a semeadura em ágar, alíquotas de 200 µL da suspensão de biofilme de cada bloco foram coletadas em microtubos tipo eppendorf limpos e pré-pesados. Adicionaram-se 600 µL de álcool etílico 99,9% previamente armazenado em -20°C e as suspensões foram armazenadas também em -20°C pelo período mínimo de 24 h.

Após a remoção do congelador, as suspensões foram homogeneizadas utilizando um agitador vortex (Biomixer QL-901) e colocadas em centrífuga durante 10 min em -4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 500 µL de álcool etílico a 70% foram novamente adicionados. A nova suspensão foi novamente homogeneizada em vortex e colocada em centrífuga (modelo: 5418, eppendorf) por mais 5 min em -4°C, sendo o sobrenadante descartado. Sequencialmente, os microtubos tipo eppendorf contendo os precipitados foram armazenados em um dissecador até a remoção total da umidade interna e, em seguida, foram pesados em balança de precisão com cinco casas decimais (modelo: Auw220D; Shimadzu, Tóquio/Japão). (DUARTE *et al.*, 2006)

4.7 Análise da microdureza de corte longitudinal

Os blocos submetidos ao modelo microbiológico de indução de cárie foram analisados através do teste de microdureza Knoop em corte longitudinal do esmalte, para determinar desmineralização ao redor das restaurações. Os blocos foram seccionados longitudinalmente na região central da restauração, com disco diamantado acoplado à cortadeira (Isomet® 1000, Buehler, Lake Buff, USA). Em seguida, foram embutidos em 7 g de resina acrílica incolor termicamente ativada (VipiCril, São Paulo, Brasil) em uma embutidora metalográfica Pre-30 Mi (Arotec S.A. Ind. Com., São Paulo, Brasil). Os ciclos foram padronizados em 6 min de aquecimento, compressão de 150 Kgf/cm² seguidos por 7 min de resfriamento. Para melhor fixação, foi usada uma pequena quantidade de adesivo à base de cianoacrilato (SuperBonder® - Loctite, São Paulo, Brasil) e cada espécime foi identificado com seus respectivos números.

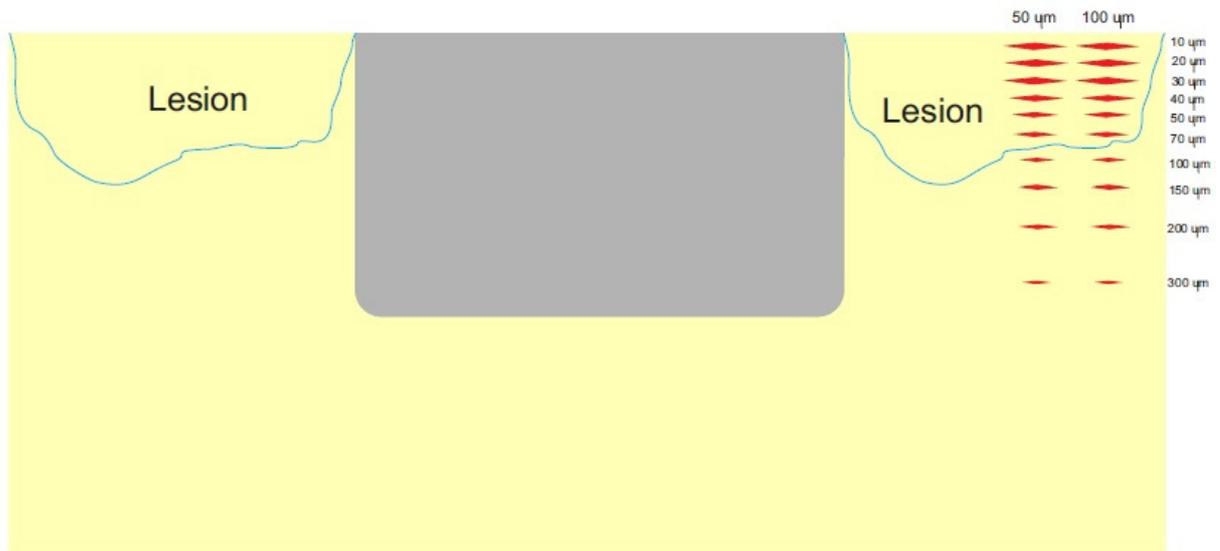
Figura 4. Aspecto dos blocos após corte e embutimento, para realização de microdureza longitudinal. Imagem Lupa estereoscópica. Aumento 40 x. **A** (CIVC); **B** (CIVS); **C** (CIVNAg0,5); **D** (CIVNAg1).



Após o embutimento, as amostras foram planificadas e polidas em uma Politriz automática Ecomet 250 (Buehler, Lake Buff, USA), utilizando um dispositivo para uso de seis corpos-de-prova simultâneos, com carga de 25 N sobre cada corpo, em baixa velocidade, sob refrigeração com água deionizada. Foram utilizadas lixas de carbeto de silício de granulação 320 (2 min), 600 (2 min), 1200 (4 min) (Buehler, Lake Buff, USA) trocadas a cada ciclo, até a completa exposição das superfícies embutidas. A seguir, o polimento foi realizado com pastas de alumina de 1 μm (Extec Corp. Gamma Alum. Perm. Susp. Ref.: 16776) e 0,5 μm (Extec Corp. Perm. Susp. Ref.: 16774) e discos de feltro (Buehler, Lake Buff, USA) autoadesivos correspondentes, durante 5 min, refrigerados com água. Entre as etapas de planificação e polimento, para padronização, os corpos de prova contendo os espécimes foram imersos em ultrassom com água deionizada por 10 min, para remoção das partículas de lixa e alumina.

As análises foram efetuadas utilizando-se o microdurômetro (Future Tech 9000 FM, Future-Tech Corp., Kanagawa, Japan) acoplado a um software FM-ARS® e penetrador do tipo Knoop, sob carga de 25 g por 5 s. Foram feitas 20 indentações em 10 diferentes profundidades abaixo da superfície externa do esmalte cariado de cada espécime, a 50 μm e 100 μm da restauração, formando duas fileiras de indentações longitudinais nas profundidades: 10 μm , 20 μm , 30 μm , 40 μm , 50 μm , 70 μm , 100 μm , 150 μm , 200 μm e 300 μm , obtendo-se as médias dos valores de microdureza (KHN- Knoop Hardness Number) em cada profundidade para cada espécime (Figura 5).

Figura 5. Desenho esquemático das indentações realizadas durante a análise de microdureza de corte longitudinal.



Os dados obtidos foram transportados para planilhas (Microsoft Excel), nas quais foram calculadas as médias dos valores obtidos para, a partir destes dados, calcular-se o parâmetro Delta S (ΔS), correspondente à área de perda de dureza das amostras.

O cálculo do Delta S (desmineralização integrada) foi realizado da seguinte maneira: inicialmente, os números de dureza Knoop (KHN) das indentações anteriormente citadas foram obtidos a partir do esmalte exterior; em seguida, KHN foi registrado em função da profundidade de cada bloco e o perfil de dureza integrada do esmalte com lesão foi calculado. Para profundidades maiores do que 150 μm , a média KHN utilizada era considerada como uma medida do perfil de dureza integrada de esmalte sadio. Portanto, ΔS é o perfil de dureza do esmalte com lesão subtraído do perfil de dureza do esmalte sadio, como pode ser observado no gráfico 4 (SOUSA *et al.*, 2009).

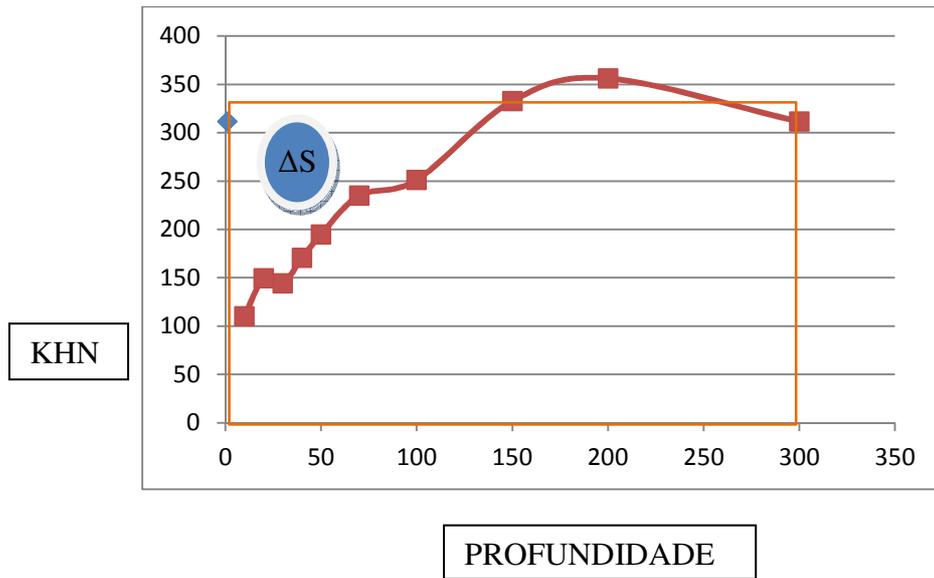
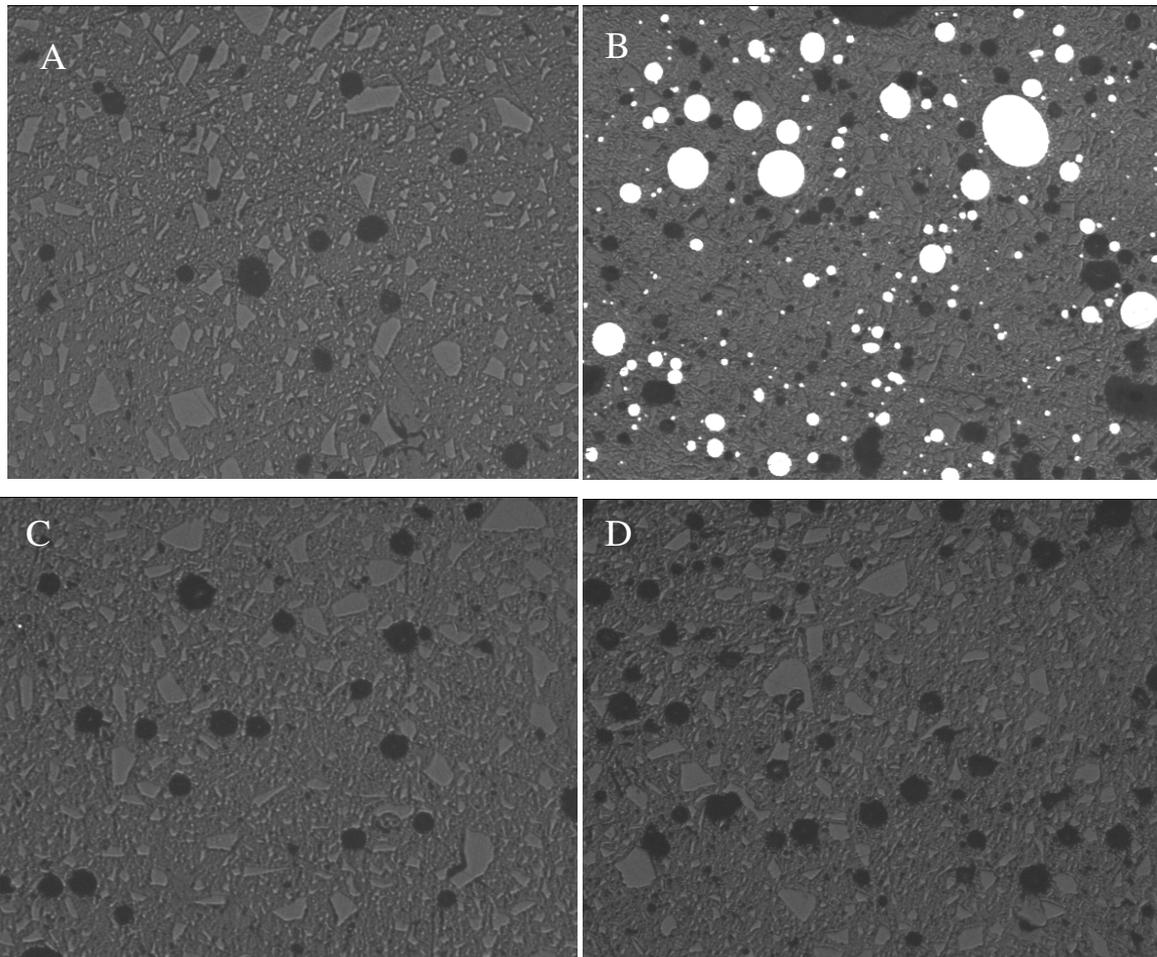
Gráfico 1. Cálculo de perda de dureza (ΔS).

Figura 6. Imagem dos materiais restauradores em microdurômetro (Future Tech 9000 FM) (Lente aumento de 10x). **A** (CIVC); **B** (CIVS); **C** (CIVNAg0,5); **D** (CIVNAg1).



4.8 Análise estatística

Depois de observadas a normalidade e a homogeneidade de variâncias, foram realizadas análise de variância ANOVA (*One Way*) para dados referentes à contagem de UFC e do peso seco, e ANOVA (*Two Way*) para análise dos dados de microdureza (valores de Delta S (ΔS)) entre os quatro grupos de tratamento, adotando um nível de significância de 5%. O programa utilizado foi SigmaStart3.5 (Sistaty).

5 RESULTADOS

Na análise dos dados para efeito antibacteriano, obtidos através da contagem de UFC, não foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos testados ($p=0,644$), como mostrado no Gráfico 2.

As médias dos valores referentes ao peso seco do biofilme coletado após cinco dias não mostraram diferença estatisticamente significante entre os grupos avaliados ($p=0,569$), como pode ser observado no Gráfico 3.

Em relação à perda mineral em esmalte (ΔS), calculada a partir dos valores de microdureza de corte longitudinal, analisando isoladamente os grupos de materiais e as distâncias de leitura (50 μm e 100 μm), observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas, respectivamente ($p=0,241$) e ($p=0,777$), assim como para a avaliação da interação entre os grupos testados e as leituras realizadas a 50 μm ou a 100 μm da restauração ($p=0,895$), como observado no Gráfico 4.

Gráfico 2. Média e desvio padrão do efeito antibacteriano (contagem de UFC).

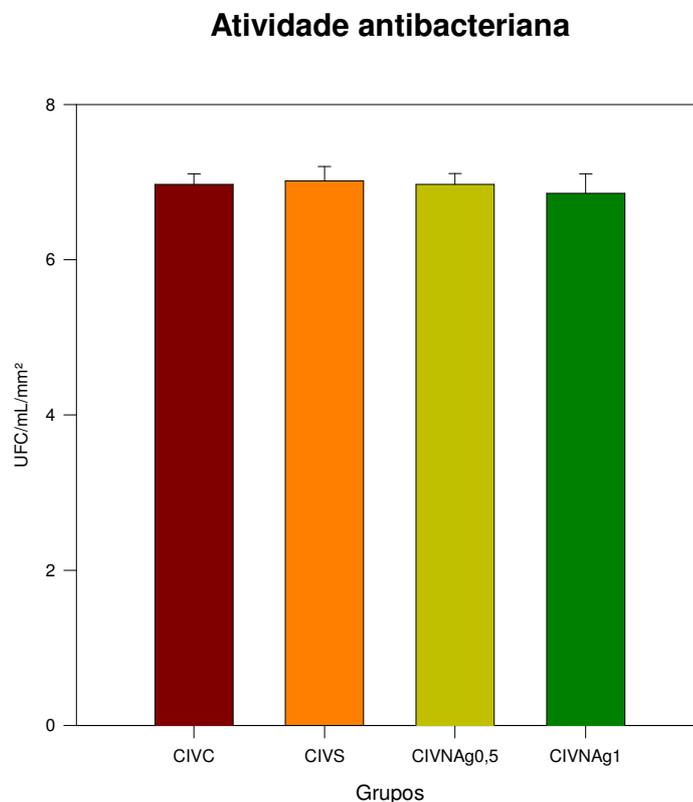


Gráfico 3. Média e desvio padrão do peso seco do biofilme acumulado pelos respectivos grupos avaliados.

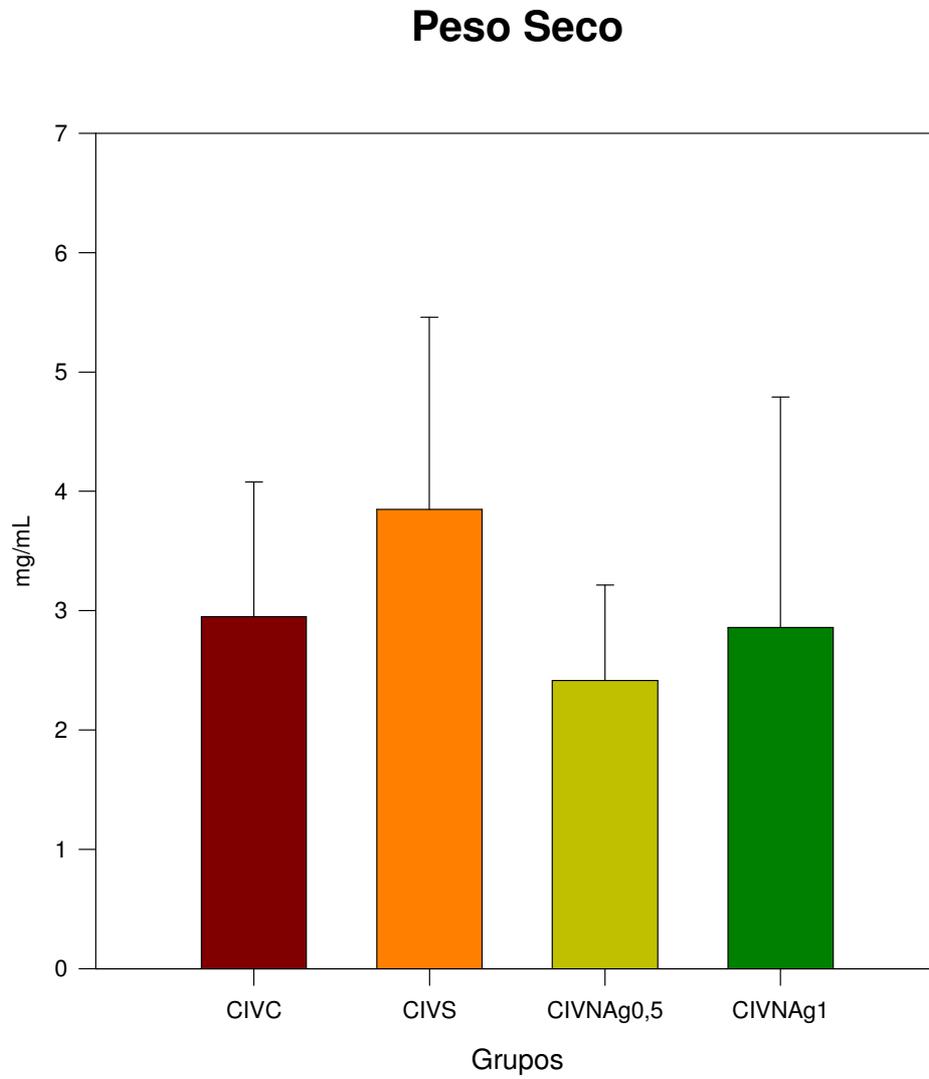
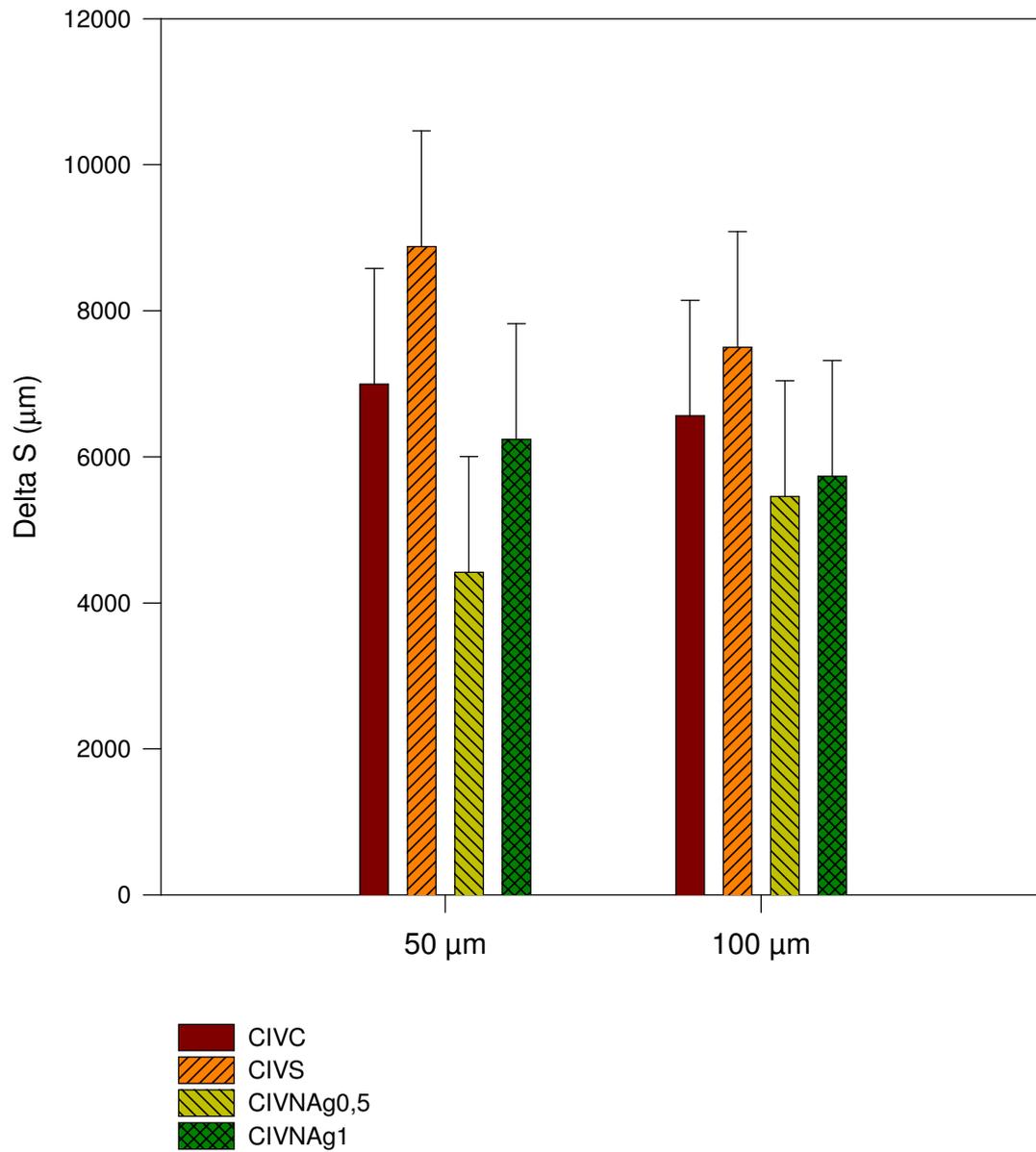


Gráfico 4. Média e desvio padrão do perfil da perda de dureza (ΔS) dos grupos avaliados às distâncias de 50 μm e 100 μm da margem restauração.



6 DISCUSSÃO

No presente estudo, incorporaram-se nanopartículas de prata em cimento de ionômero de vidro restaurador, porém, na literatura científica, somente estudos que incorporam nanopartículas em outros materiais como resinas, adesivos e cimentos ortodônticos (CORRÊA *et al.*, 2015) foram encontrados. Siqueira *et al.*, 2015, realizaram estudo incorporando nanopartículas de prata em cimento de ionômero de vidro convencional e cimento de ionômero de vidro modificado por resina, nas concentrações de 0,1% e 0,2%, porém, ao contrário deste estudo, os autores não analisaram efeito antimicrobiano, avaliaram a citotoxicidade desses materiais (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

Na análise microbiológica, através de contagem de UFC, o fato de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados poderia ser atribuído à forma da coleta do biofilme, tendo em vista que o biofilme não foi coletado apenas da região da restauração, mas de todo o bloco de esmalte. Portanto, se na região próxima da restauração houve inibição, essa diferença pode ter sido diluída diante de todo o biofilme coletado. A maioria dos estudos que avaliam esse potencial antimicrobiano utiliza corpos de prova, ou através do halo de inibição; desta forma, avaliam o efeito da formação do biofilme apenas sobre ou próximo ao material. Moreira *et al.*, (2015), avaliaram o efeito da incorporação de NAg em cimento ortodôntico (Opal Band), utilizando corpos de prova para avaliação de atividade antimicrobiana, obtendo como resultado que o cimento ortodôntico incorporado com 0,5% e 1% de nanopartículas de prata apresentaram efeito antimicrobiano (MOREIRA *et al.*, 2015).

Quando se analisam os dados do peso seco do biofilme, consegue-se observar uma tendência de menor formação de biofilme no grupo CIVNAg0,5 e maior formação de biofilme no grupo CIVS, e, apesar de não existir diferença significativa entre os grupos, essa tendência se observa também ao analisar os resultados de Delta S, demonstrando uma coerência entre esses resultados. Observa-se uma tendência de menor formação de lesão no grupo CIVNAg0,5 e maior formação no grupo CIVS. Essa diferença entre perda de dureza é mais observada na região mais próxima da restauração, ou seja, a 50 μm .

Um estudo anterior avaliou o efeito antimicrobiano de diferentes tamanhos de nanopartículas de prata na formação do biofilme de *Streptococcus mutans* e concluiu que a sensibilidade bacteriana foi maior quando o tamanho das nanopartículas foi menor (FREIRE *et al.*, 2015). Nanopartículas de prata de menor tamanho têm maior atividade antimicrobiana,

pois têm maior área de contato superficial com células bacterianas e, conseqüentemente, uma maior interação do que partículas maiores (ESPINOSA CRISTÓBAL *et al.*, 2012; ESPINOSA CRISTÓBAL *et al.*, 2013). Talvez, por esse motivo, o cimento de ionômero de vidro com liga de prata (RIVA Silver), que não apresenta partículas em escala nanométrica (1-100 nm) e possui partículas de prata grandes e em quantidade maior, não tenha apresentado o efeito antimicrobiano esperado, pois apesar de não ter apresentado diferença estatística, observou-se uma tendência ao maior acúmulo de biofilme. Além disso, a presença de liga de prata no ionômero pode ter alterado a liberação de flúor, diminuindo o potencial anticárie do CIV, pois esse material apresentou maior tendência à perda de dureza do que o grupo controle CIV convencional e os outros grupos testados.

Quando se comparam os dois grupos em que nanopartículas de prata foram acrescentadas em 0,5% ou 1% e o grupo controle, apesar da ausência de diferença estatística, observa-se, através do gráfico de peso seco, uma tendência a menor formação de biofilme nos grupos em que NAg foram acrescentadas, principalmente no grupo em que menor quantidade de nanopartículas foi acrescentada, CICNAg0,5, o que poderia sugerir que, apesar de discreto, apresentou algum efeito antimicrobiano, e que outras concentrações poderiam ser testadas para buscar um efeito antimicrobiano significativo.

Comparando os grupos com NAg em relação a perda de dureza (ΔS), ambos apresentaram uma tendência a menor perda quando comparados ao controle, principalmente o grupo CIV 0,5%, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa, sugerindo que não influenciaram negativamente no potencial anticárie do CIV, não impediram a liberação de flúor e um discreto efeito antimicrobiano pode ter sido acrescentado, possibilitando uma menor formação de lesão, principalmente no grupo em que menor concentração de nanopartículas foi acrescentada.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a incorporação de nanopartículas de prata em cimento de ionômero de vidro não apresentou diferenças significativas quando comparado ao cimento de ionômero de vidro convencional e ao CIV com liga de prata, na atividade antimicrobiana, como também no efeito sobre inibição de formação de lesão de cárie. Torna-se, assim, clara a necessidade de mais estudos para testar outras concentrações que possam tornar evidente esse efeito antimicrobiano, aprimorando o CIV, acrescentando a este um potencial antimicrobiano, sem alterar seu importante potencial anticárie.

REFERÊNCIAS

- ABOU NEEL E.A. *et al.* Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. **Int J Nanomedicine.**, v. 8, n. 10, p. 6371-94, Oct 2015.
- AHN S.J. *et al.* Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. **Dent Mater.**, v. 25, n. 2, p. 206-13, Feb. 2009.
- ALLAKER RP. The use of nanoparticles to control biofilm formation. **J Dent Res.**, v. 89, n. 11, p. 1175–1186, Nov. 2010.
- BADET C.; THEBAUD N.B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. **Open Microbiol J**, v. 2, p. 38-48, 2008.
- BAKRY, A.S. *et al.* Evaluation of new treatment for incipient enamel demineralization using 45S5 bioglass. **Dent Mater.**, v. 30, n.3, p.314-20, mar. 2014.
- BERG J.H.; CROLL T.P. Glass ionomer restorative cement systems: an update. **Pediatr Dent**, v. 37, n. 2, p. 116-24, Mar-Apr 2015.
- BRADSHAW D.J. *et al.* Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. **Caries Res.**, v. 36, n. 2, p. 81-86, Mar-Apr. 2002.
- BÜRGERS R. *et al.* The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. **Arch Oral Biol.**, v. 54, p. 595-601, 2009.
- CCAHUANA-VÁSQUEZ R.A.; CURY J.A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Braz Oral Res.**, v. 24, n. 2, p. 135-41, Apr-Jun. 2010.
- CHALOUPKA K.; MALAM Y.; SEIFALIAN A.M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends Biotechnol.**, v.28, n. 11, p. 580-8, Nov. 2010.
- CHOI J.Y.; LEE H.H.; KIM H.W. Bioactive sol-gel glass added ionomer cement for the regeneration of tooth structure. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 19, p. 3287-94, 2008.
- CORRÊA J.M. *et al.* Silver nanoparticles in dental biomaterials. **Int J Biomater.**, 2015.
- CUNHA P.L.R. *et al.* Isolation and characterization from *Dimorphandra gardneriana* Tul. Seeds as potential guar gum substitute. **Food hydrocolloids**, v. 23, 880, 2009.
- CURY, J.A.; TENUTA, L.M. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Braz Oral Res.**, v.23 Suppl 1, p.23-30, 2009.
- CURY J.A. *et al.* Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? **Dent Mater**, Jan. 2016.

DE CASTILHO A.R. *et al.* In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. **J Dent.**, v. 41, n. 2, p. 155-63, Feb. 2013.

DELIGEORGI V.; MJOR I.A.; WILSON N.H. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. **Prime Dent Care.**, v. 8, p. 5-11, 2001.

DUARTE S. *et al.* Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 257, n. 1, p. 50-56, 2006.

DUQUE C. *et al.* Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. **Clin Oral Investig**, v. 13, n. 4, p. 465-71, Dec. 2009.

ESPINOSA-CRISTÓBAL L.F. *et al.* Antimicrobial sensibility of *Streptococcus mutans* serotypes to silver nanoparticles. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 32, p.896-901, 2012.

ESPINOSA-CRISTÓBAL L.F. *et al.* Adherence inhibition of *Streptococcus mutans* on dental enamel surface using silver nanoparticles. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 33, p. 2197-2202, 2013.

FERJESKOV O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 182-91, 2004.

FERJESKOV O.; KIDD E, editors. Dental caries: the disease and its clinical management. Second Ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008.

FLEMMING, HC; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FOLDBJERG R. *et al.* PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicol Lett.**, v. 190, n. 2, p. 156-62, Oct 2009.

FORSS H.; WIDSTROM E. Reasons for restorative therapy and longevity of restorations in adults. **Acta Odontol Scand.**, v. 62, p. 82-6, 2004.

FREIRE P.L. *et al.* Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 45, n. 2, p. 183-7, Feb 2015.

HAYASHI M. *et al.* Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation – a systematic review. **J Dent**, v. 39, n. 2, p. 95-107, Feb. 2011.

ISO. ISO 9917-1 dentistry – water based cements – Part 1. Powder liquid acid-base cements. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2003.

JINGARWAR M.M.; BAJWA N.K.; PATHAK A. Minimal intervention dentistry – a new frontier in clinical dentistry. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 7, p. 4-8,

2014.

KASRAEI S. *et al.* Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. **Restor Dent Endod.**, v. 39, n. 2, p. 109-14, May 2014.

KIRKEVANG L.L.; VAETH M.; WENZEL A. Incidence of caries lesions in approximal surfaces: a radiographic study of a general adult Danish population. **Caries Res.**, v. 45, n. 6, p. 538-46, 2011.

KIM J.S. *et al.* **Nanomedicine: Nanotechnol. Biol.Med.**, v. 3, p. 95–101,2007.

KOVARIK R.E.; HAUBENREICH J.E.; GORE D. Glass ionomer cements: a review of composition, chemistry, and biocompatibility as a dental and medical implant material. **J Long Term Eff Med Implants**, v. 15, n. 6, p. 655-71, 2005.

LIU Y. *et al.* Effect of citrus lemon oil on growth and adherence of *Streptococcus mutans*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n.7, p. 1161-67, Jul. 2013.

MARINHO V.C.C. Evidence-based effectiveness of topical fluorides. **Adv Dent Res.**, v. 20, n. 1, p. 3-7, Jul. 2008.

MALTERUD M.I. Minimally invasive dentistry – A biomimetic approach. **Gen Dent.**, v. 60, p. 186-187, 2012.

MELO M.A. *et al.* Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. **Trends Biotechnol**, v. 31, n.8, p. 459-67, Aug. 2013a.

MJOR A.; DAHL J.E.; MOORHEAD. Placement and replacement of restorations in primary teeth. **Acta Odontol Scand.**, v. 60, p. 25-8, 2002.

MOREIRA D.M. *et al.* A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. **Angle Orthod.**, v. 85, n. 2, p. 175-83, Mar 2015.

MORONES J.R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology.**, v. 16, p. 2346-53, 2005.

MOSHAVERINIA A. *et al.* A review of powder modifications in conventional glass-ionomer dental cements. **J Mater Chem**, v. 21, p. 1319-1328, 2011.

MOUNT G.J. Defining, classifying, and placing incipient caries lesions in perspective. **Dent Clin North Am**, v. 49, n. 4, p. 701-23, Oct. 2005.

PRABHAKAR A.R.; PRAHLAD D.; KUMAR S.R. Antibacterial activity, fluoride release, and physical properties of na antibiotic-modified glass ionomer cement. **Pediatr Dent.**, v. 35, n. 5, p. 411-5, Sep-Oct 2013.

PENG J.J.; BOTELHO M.G.; MATINLINNA J.P. Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. **J Dent.**, v. 40, n. 7, p. 531-41, Jul 2012.

PINTO A.S. *et al.* Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in

indirect pulp capping in primary teeth. **Am J Dent**, v. 19, n. 6, p. 382-6, Dec. 2006.

RADZIG M.A. *et al.* Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids Surf B: Biointerfaces.**, v. 102, p.300-306, 2013.

RAI M.; YADAV A.; GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnol Adv.**, v. 27, n. 1, p. 76-83, Jan-Feb. 2009.

SARKAR N.K.; Metal-matrix interface in reinforced glass ionomers. *Dent Mater.*, v. 15, p. 421-425, June 1999.

SETH D. *et al.* Nature-inspired novel drug design paradigm using nanosilver: Efficacy on multi-drug-resistant clinical isolates of tuberculosis. **Curr Microbiol.** v. 62, p. 715-726, 2011.

SHEN, S.; SAMARANAYAKE, L.P.; YIP, HK. In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. **Journal of dentistry**, v. 32, n. 8, p. 667-678, 2004.

SILVER S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 27, n. 2-3, p. 341-53, Jun. 2003.

SIQUEIRA P.C. *et al.* Citotoxicity of glass ionomer cements containing silver nanoparticles. **J Clin Exp Dent.**, v. 7, n. 5, p. 662-7, Dec 2015.

SOUZA P.P. *et al.* In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. **Dent Mater.**, v. 22, n. 9, p.838-44, Sep. 2006.

SPRATT D.A.; PRATTEN J. Biofilms and the Oral Cavity. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 109-120, June 2003.

STRUZYCKA, I. The oral microbiome in dental caries. **Pol J Microbiol**, v. 63, n.2, p. 127-35, 2014.

SUTHERLAND, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3-9, 2001.

TAKAHASHI Y. *et al.* Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. **Dent Mater.**, v. 22, n. 7, p. 647-52, Jul 2006.

TENUTA, L.M.A.; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. **Brazilian oral research**, v.24 (Spec Iss 1), p.9-17, 2010.

VAN NOORT R. Glass-ionomer cements and resin-modified glass-ionomer cements. **Introduction to dental materials**, Edinburgh, UK: Mosby; cap. 2, p. 129-130, 2000.

VOLPATO F.C. *et al.* Effects of oral environment stabilization procedures on Streptococcus mutans counts in pregnant women. **Braz Dent J.**, v. 22, n. 4, p. 280-4, 2011.

WATSON O.S. *et al.* Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. **J Dent Res.**, v. 84, n. 5, p. 451-5, May 2005.

WANG X.; WANG B.; WANG Y. Antibacterial orthodontic cement to combat biofilm and white spot lesions. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v. 148, n. 6, p. 974-81, Dec 2015.

WIEGAND A.; BUCHALLA W.; ATTIN T. Review on fluoride-releasing restorative materials: fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dent Mater**, v. 23, p. 343-362, 2007.

WILLIAMS J.A.; BILUNGTON R.W.; PEARSON G. Silver and fluoride ion release from metal-reinforced glass-ionomer filling materials. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 24, p.369-37, 1997.

WILSON A.D., KENT B.E. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. **Br Dent J.**, v. 132, n. 4, p. 133-5, 1972.

XIE D. *et al.* Preparation and evaluation of a novel glass-ionomer cement with antibacterial functions. **Dent Mater.**, v. 27, n. 5, p. 487-96, May. 2011.

YAMAMOTO K. *et al.* Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci. **Dent Mater.**, v. 12, p.227-229, 1996.

YAP A.U.J.; CHEANG P.H.N.; CHAY P.L. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, p. 682-88, 2002.

YLI-URPO H. *et al.* Compressive strength and surface characterization of glass ionomer cements modified by particles of bioactive glass. **Dent Mater.**, v. 21, p.201-9, 2005.

ZHANG K. *et al.* Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties. **J Dent.**, v. 41, p. 464-74, 2013.