

UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA
BRUNA MANDRÁ DA CUNHA

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UM CIMENTO
DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO COM VANADATO DE PRATA
NANOESTRUTURADO**

UBERABA - MG

2022

BRUNA MANDRÁ DA CUNHA

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UM CIMENTO
DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO COM VANADATO DE PRATA
NANOESTRUTURADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado Acadêmico da Universidade de Uberaba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tornavoi de Castro.

UBERABA – MG

2022

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

C914a Cunha, Bruna Mandrá da.
Análise das propriedades mecânicas e biológicas de um cimento de ionômero de vidro modificado com vanadato de prata nanoestruturado / Bruna Mandrá da Cunha. – Uberaba, 2022.
89 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área Clínica Odontológica Integrada.
Orientadora: Profa. Dra. Denise Tornavoi de Castro.

1. Cimentos dentários de ionômero de vidro. 2. Cimentos dentários. 3. Nanotecnologia. 4. Streptococcus mutans. I. Castro, Denise Tornavoi de. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área Clínica Odontológica Integrada. III. Título.

CDD 617.634

BRUNA MANDRÁ DA CUNHA

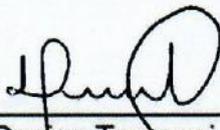
ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E BIOLÓGICAS DE UM
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO MODIFICADO COM VANADATO DE
PRATA NANOESTRUTURADO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Odontologia do Programa de Pós-Graduação em
Odontologia - Mestrado da Universidade de
Uberaba.

Área de concentração: Clínica Odontológica
Integrada

Aprovado (a) em: 25/02/2022

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Denise Tornavoi de Castro
Orientadora
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri
Universidade de Uberaba



Prof.^a. Dr.^a. Ana Beatriz Vilela Teixeira
Faculdade de Odontologia de Ribeirão
Pretor/USP

DEDICATÓRIA

Dedico à **Deus**, que iluminou o meu caminho e permitiu que a conclusão desse trabalho acontecesse.

Aos meus queridos e amados pais, **Fabiana Aparecida Mandrá Rodrigues da Cunha** e **Adeir Ferreira da Cunha**. Esta conquista é resultado do esforço de vocês. Obrigada pelo que sempre fizeram e ainda fazem por mim. A vocês minha eterna gratidão e respeito.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de Uberaba (UNIUBE)**, representada pelo Reitor Dr. Marcelo Palmério, pela contribuição em minha formação profissional, desde a graduação ao mestrado.

À **Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão da Universidade de Uberaba**, na pessoa do Pró-Reitor Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)**, pelo apoio financeiro em forma de bolsa de mestrado e principalmente pela confiança na elaboração deste trabalho (nº do projeto: PIBIC 2019/014).

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba, na pessoa do coordenador **Prof. Dr. César Penazzo Lepri**, pela oportunidade oferecida e pelo excelente trabalho executado.

À **Profa. Dra. Denise Tornavoi de Castro**, pela paciência e ensinamentos. Jamais esquecerei sua inestimável confiança. Meu reconhecimento e sinceros agradecimentos.

Ao técnico **Marcelo Silveira Hermeto** da Universidade de Uberaba, cuja ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

Ao graduando em Odontologia **Kaio Luca Gimenes Ribeiro** da Universidade de Uberaba, pela disponibilidade e ajuda em parte dos trabalhos laboratoriais. Te desejo muito sucesso.

À **Flávia Michele da Silva**, sempre disposta a ajudar, meu muito obrigada.

À **Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ)**, pelo auxílio concedido na síntese do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata. Especialmente ao Prof. Dr. Marco Antônio Schiavon.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP)**, pelo apoio na realização de determinados ensaios laboratoriais da pesquisa. Especialmente à Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis e à Técnica Viviane de Cássia Oliveira.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Nada é tão nosso como os nossos sonhos.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

RESUMO

Cimentos de ionômero de vidro (CIV) são reconhecidos como importantes materiais restauradores odontológicos, embora muitas vezes apresentem falhas devido às propriedades mecânicas deficientes e cárie secundária, em comparação com outros materiais odontológicos, tais como as resinas compostas. O objetivo deste estudo foi analisar, de forma inédita, a influência da incorporação do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3), nas propriedades mecânicas e biológicas de um cimento de ionômero de vidro. Inicialmente o AgVO_3 foi sintetizado e caracterizado. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada frente ao *Streptococcus mutans*. O AgVO_3 foi incorporado ao cimento de ionômero de vidro convencional autopolimerizável (Riva Self Cure) nas concentrações de 1%, 2,5% e 5%, em massa. Um grupo Riva Self Cure (controle), sem o nanomaterial também foi obtido. A atividade respiratória do *S. mutans* foi avaliada através do ensaio de redução de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) e a viabilidade celular por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (n=9) e da análise qualitativa por microscopia de fluorescência (n=2). Um total de 40 blocos de esmalte bovino foram obtidos com cavidades padronizadas e restaurados, e após a exposição ao biofilme de *S. mutans* por 5 dias a 37°C avaliados quanto a desmineralização do esmalte através da análise da microdureza Knoop (50g/15s). As propriedades físico-mecânicas foram avaliadas pelos ensaios de resistência a tração diametral, dureza e rugosidade superficial. Os dados foram analisados por análise de variância e pós teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$). A CIM do nanomaterial frente a *S. mutans* foi de 250 $\mu\text{g/mL}$. O método do XTT demonstrou que a viabilidade das células expostas ao grupo Riva Self Cure foi estatisticamente semelhante ao Riva Self Cure + 1% de AgVO_3 (p=1,000) e diferente dos demais grupos (p<0,05), que apresentaram maior atividade metabólica. O grupo Riva Self Cure + 1% de AgVO_3 apresentou o menor número de UFC/mL, sendo estatisticamente semelhante ao Riva Self Cure (p=0,099), e diferente dos demais (p<0,05) que apresentaram maiores valores. A microscopia de fluorescência demonstrou no grupo Riva Self Cure menor quantidade do número de células, havendo mais espaços vazios entre elas, em relação aos grupos com AgVO_3 . Quanto a desmineralização, o grupo Riva Self Cure + 1% de AgVO_3 apresentou menor perda percentual de microdureza, com diferença significativa em relação aos grupos incorporados com 2,5% (p=0,005) e 5% (-60,79% \pm 11,27%) (p=0,003). Entretanto, nenhum dos grupos foi capaz de prevenir a desmineralização do esmalte frente ao biofilme cariogênico. A incorporação de 5% do AgVO_3 resultou em uma diminuição significativa nos valores de resistência à tração diametral e de dureza superficial quando

comparado ao grupo Riva Self Cure ($p < 0,05$). A incorporação do nanomaterial não influenciou na rugosidade superficial ($p = 0,096$). Conclui-se que nenhum dos grupos foi capaz de inibir completamente a formação do biofilme e prevenir a desmineralização do esmalte. Os resultados sugerem que a incorporação de 1% de AgVO_3 ao CIV apresentou bom desempenho, entretanto o material testado foi sensível a incorporação de maiores concentrações, podendo estas sacrificarem as propriedades mecânicas sem potencializar o efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: 1. Cimentos de ionômero de vidro 2. Nanotecnologia 3. Vanadato de prata. 4. *Streptococcus mutans* 5. Desmineralização 6. Tração diametral. 7. Dureza superficial 8. Rugosidade superficial.

ABSTRACT

ABSTRACT

Glass ionomer cements (GIC) are recognized as important dental restorative materials, although they often fail due to poor mechanical properties and secondary carie compared to other dental materials, such as composite resins. The aim of this study was to analyze, in an unprecedented way, the influence of the incorporation of nanostructured silver vanadate decorated with silver nanoparticles (AgVO_3) on the mechanical and biological properties of a glass ionomer cement. Initially AgVO_3 was synthesized and characterized. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined against *Streptococcus mutans*. AgVO_3 was incorporated into conventional self-curing glass ionomer cement (Riva Self Cure) at concentrations of 1%, 2.5% and 5% by mass. A Riva Self Cure group (control) without the nanomaterial was also obtained. The respiratory activity of *S. mutans* was evaluated using the XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) and cell viability by counting colony forming units (CFU) count (n=9) and by qualitative analysis utilizing a fluorescence microscopy (n=2). A total of 40 blocks of bovine enamel were obtained with standardized cavities and restored, and after exposure to *S. mutans* biofilm for 5 days at 37°C, the enamel demineralization was evaluated through Knoop microhardness analysis (50g/15s). The physical-mechanical properties were evaluated by the diametral tensile strength, hardness, and surface roughness tests. Data were analyzed by analysis of variance and Bonferroni posttest ($\alpha=0.05$). The MIC of the nanomaterial against *S. mutans* was 250 $\mu\text{g/mL}$. The XTT method demonstrated that the viability of cells exposed to the Riva Self Cure group was statistically similar to Riva Self Cure + 1% AgVO_3 ($p=1,000$) and different from the other groups ($p<0.05$), which they showed greater metabolic activity. The Riva Self Cure + 1% AgVO_3 group had the lowest number of CFU/mL, being statistically similar to the Riva Self Cure ($p=0.099$), and different from the others ($p<0.05$) which had higher values. Fluorescence microscopy showed a lower number of cells in the control group, with more empty spaces between them, in relation to the groups with AgVO_3 . When analyzing the demineralization, the Riva Self Cure + 1% AgVO_3 group showed lower percentage loss of microhardness, with a significant difference compared to the incorporated groups with 2.5% ($p=0.005$) and 5% ($-60,79\% \pm 11,27\%$) ($p=0.003$). However, none of the groups was able to prevent enamel demineralization against cariogenic biofilm. The incorporation of 5% of the AgVO_3 resulted in a significant decrease in the values of diametral tensile strength and surface hardness when compared to the Riva Self Cure group ($p<0.05$). The incorporation of the nanomaterial did not influence the surface roughness ($p=0.096$). It is concluded that none of the groups was able to completely inhibit

biofilm formation and prevent enamel demineralization. The results suggest that the incorporation of 1% AgVO₃ to the GIC showed good performance, however the material tested was sensitive to the incorporation of higher concentrations, which could sacrifice the mechanical properties without potentiating the antimicrobial effect.

Keywords: 1. Glass ionomer cements 2. Nanotechnology 3. Silver vanadate. 4. *Streptococcus mutans* 5. Demineralization 6. Diametral traction. 7. Surface hardness 8. Surface roughness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do estudo.....	40
Figura 2 - Reagentes para a síntese do vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs.....	40
Figura 3 - Vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs.	41
Figura 4 - Protocolo para determinação da Concentração Inibitória Mínima – <i>Streptococcus mutans</i>	42
Figura 5 - Amostras preparadas de acordo com o grupo experimental.....	43
Figura 6 - Meio de cultura inoculado.	44
Figura 7 - Solução diluída de forma seriada nos tubos de ensaio.	45
Figura 8 – Diluição em Placa de Petri.	45
Figura 9 - Ensaio de redução de XTT.	46
Figura 10 - Preparo dos espécimes. A - Dente bovino hígido. B – Dentes seccionados coroa e raiz a 1mm da junta esmalte-cimento. C – Fixação da coroa com cera no bloco de acrílico para obtenção dos espécimes. D – Corte em máquina de corte de precisão ISOMET 1000®. E – Obtenção dos espécimes nas dimensões de 4 mm x 4 mm x 2 mm.	48
Figura 11 - Padronização das cavidades e restauração com a concentração do nanomaterial.	48
Figura 12 - Metade do esmalte dentário protegido pelo verniz ácido resistente e a outra metade recoberta com fita isolante.....	49
Figura 13 - Mensuração da microdureza. A - Esquema da microdureza, sendo R = Restauração com cimento de ionômero de vidro e E = Esmalte dental bovino. B - Imagem realizada através de câmera na lente do Microdurômetro - Shimadzu no momento da realização da mensuração da microdureza no lado experimental.....	50
Figura 14 - Máquina universal de ensaios.....	51
Figura 15 - Microdurômetro - Shimadzu HVM-2000.....	51
Figura 16 - Rugosímetro SJ. 201P – Mitutoyo.....	52
Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (x 200 magnitude).....	55
Figura 18 - Análise comparativa da absorbância do XTT. * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. $P < 0,05$	56
Figura 19 - Análise comparativa das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. $P < 0,05$	57

Figura 20 - Microscopia de fluorescência do biofilme formado (63x). A - Riva Self Cure. B - Riva Self Cure + 1% AgVO ₃ . C - Riva Self Cure + 2,5% AgVO ₃ . D - Riva Self Cure + 5% AgVO ₃	58
Figura 21 - Perda de microdureza considerando a interação grupo x distância da restauração. ANOVA de dois fatores e pós teste de Bonferroni. P<0,05.	58
Figura 22 - Perda de microdureza considerando o fator grupo de forma independente. ANOVA de dois fatores e pós teste de Bonferroni. P<0,05.	59
Figura 23 - Resistência à tração diametral (Mpa). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. P<0,05.....	60
Figura 24 - Dureza superficial (HK). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. P<0,05.	60
Figura 25 - Rugosidade superficial (µm). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. P<0,05.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cimento de ionômero de vidro utilizado no estudo.....	39
Tabela 2 - Micro-organismo padrão utilizado no experimento microbiológico.....	43
Tabela 3 - Micro-organismo e valor de CIM para AgVO_3 utilizado no ensaio microbiológico.	55

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

α -	Nível de Significância
Ag -	Íons de Prata
AgNO ₃ -	Nitrato de prata
AgNPs -	Nanopartículas de Prata
AgVO ₃ -	Vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata
ATCC -	American Type Culture Collection
BHI -	Brain Heart Infusion
C -	Celsius
CAAE -	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
CIV -	Cimentos de Ionômero de Vidro
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico
g -	Gramma
gf -	Gramma Força
HK -	Dureza Knoop
kN -	Kilonewton
min -	Minuto
mL -	Mililitro
mm -	Milímetro
NH ₄ VO ₃ -	Vanadato de Amônio
nm -	Nanômetro
NPs -	Nanopartículas
PAA -	Ácido Poliacrílico
PBS -	Tampão Fosfato-salino
pH -	Potencial Hidrogênio
ROS -	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm -	Rotações por Minuto
s -	Segundo
STEM -	Microscopia Eletrônica de Transmissão
UFC -	Unidade Formadora de Colônia
V -	Vanádio
XTT -	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

μL - Microlitro
 μg - Micrograma
 μm - Micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 MATERIAIS	39
3.1.1 Vanadato de Prata Nanoestruturado Decorado com Nanopartículas de Prata	39
3.1.2 Cimentos de Ionômero de Vidro	39
3.2 MÉTODOS.....	39
3.2.1 Delineamento Experimental	39
3.2.2 Síntese e Caracterização do Vanadato de Prata Nanoestruturado Decorado com Nanopartículas de Prata	40
3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	41
3.2.4 Confecção das Amostras de Cimento de Ionômero de Vidro.....	42
3.2.5 Análise Microbiológica.....	43
3.2.5.1 Micro-organismo e Condição de Crescimento	43
3.2.5.2 Desenvolvimento do Biofilme.....	43
3.2.5.3 Unidades Formadoras de Colônias	44
3.2.5.4 Atividade Respiratória através do Ensaio de Redução de XTT	46
3.2.5.5 Microscopia de Fluorescência	47
3.2.6 Avaliação do Efeito da Incorporação do Nanomaterial ao CIV na Prevenção da Desmineralização do Esmalte após Formação do Biofilme Cariogênico	47
3.2.7 Avaliação da Resistência a Tração Diametral	50
3.2.8 Avaliação da Dureza Superficial.....	51

3.2.9 Avaliação da Rugosidade Superficial	52
3.2.10 Análise dos Dados	52
4 RESULTADOS	53
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO VANADATO DE PRATA NANOESTRUTURADO DECORADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA	55
4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO NANOMATERIAL PURO	55
4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	56
4.3.1 XTT	56
4.3.2 Unidades Formadoras de Colônias	56
4.3.3 Microscopia de Fluorescência	57
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INCORPORAÇÃO DO NANOMATERIAL AO CIV NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE	58
4.5 ANÁLISES FÍSICO-MECÂNICAS	59
4.5.1 Tração Diametral.....	59
4.5.2 Dureza Superficial	60
4.5.3 Rugosidade Superficial	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS	73
ANEXO.....	87

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os Cimentos de Ionômero de Vidro (CIV) foram idealizados em 1971 e sua comercialização no mercado ocorreu em 1977, concebendo uma evolução dos cimentos de silicato e policarboxilato (WILSON; KENT, 1972; KENT; LEWIS; WILSON, 1973). A adesividade sobre a estrutura dental, a biocompatibilidade, a liberação de flúor e o coeficiente de expansão térmico-linear do material despertaram o interesse pelo seu uso. Os CIV são classificados em três grupos de acordo com sua natureza: os convencionais, os reforçados por metais e os modificados por resina (BAKHADHER *et al.*, 2019).

O CIV convencional apresenta-se nas formas de pó e de líquido. O pó normalmente é composto de sílica, alumina e fluoreto de cálcio, sendo de caráter básico. O líquido é constituído por ácido policarboxílico sob a forma de copolímero com o ácido itacônico, tricarbálico, maleico ou tartárico. Quando manipulados, compõem um sal hidratado, que age como matriz de ligação entre as partículas de vidro (KANTOVITZ *et al.*, 2020).

Trata-se de um material bioativo devido à troca de íons com seu ambiente. (PAIVA *et al.*, 2018; FRICKER, 2021). A bioatividade desses cimentos em comparação aos materiais à base de resina é aumentada pelo caráter hidrofílico do Ácido Poliacrílico (PAA), utilizado em aplicações envolvendo materiais que devem ser permeáveis à água e a íons (ZOHURIAAN-MEHR; KABIRI, 2008; LOPES *et al.*, 2018). Ao combinar a solubilidade em água do PAA e dos vidros lixiviáveis, o CIV forma um material restaurador à base de água altamente bioativo com potencial para fornecimento de íons terapêuticos, tais como os íons de fluoretos (BERG *et al.*, 2016; FRICKER, 2021). Devido a essas propriedades, o CIV tem ampla aplicabilidade durante a terapêutica de pacientes de alto/médio risco/atividade da doença cárie.

Apesar das propriedades citadas, o CIV apresenta algumas limitações dentre elas a perda do desempenho mecânico e a formação de trincas e rachaduras, levando a um alto risco de micro infiltração marginal e fratura em cavidades compostas e conseqüentemente cárie secundária (CORRÊA; OGASAWARA, 2006; BELLO; FERNANDEZ, 2008; DA SILVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011; BACCHI; BACCHI; ANZILIERO, 2013; SPEZZIA, 2017). Diante disso, existem potenciais vantagens clínicas com a adição de compostos antimicrobianos nos cimentos de ionômero de vidro. Com isso, um breve grupo de substâncias têm sido estudadas em detalhes, entre essas a clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de benzalcônio, cetrimida e compostos inorgânicos (TÜZÜNER; DIMKOV; NICHOLSON, 2019).

Servindo ao mesmo propósito, nanocompósitos de polímero/prata têm sido amplamente investigados como materiais antibacterianos para aplicações odontológicas (ZHANG *et al.*, 2017) e biomédicas (TAMAYO *et al.*, 2019).

A prata é um metal que foi utilizado por séculos em todo o mundo como antimicrobiano (NISKA *et al.*, 2016; TANG; ZHENG, 2018). Restaurações em amálgama de prata foram amplamente utilizadas durante o século 19, sendo substituídas gradativamente por restaurações em resinas compostas a partir de 1930 (ALCARAZ *et al.*, 2014; AMINOROAYA *et al.*, 2020). Estudos com compostos à base de prata nanoestruturada foram impulsionados devido principalmente às suas propriedades antimicrobianas e também ao crescente desenvolvimento da nanociência (LEE; JUN, 2019). Pesquisas envolvendo nanotecnologia, sobretudo relacionadas à produção e aplicação de nanopartículas, contribuíram com a evolução dos materiais odontológicos (PADOVANI *et al.*, 2015). As nanopartículas, por apresentarem tamanho reduzido, entre 1 e 100 nm, exibem propriedades que estão ausentes naquelas em séries não nanométricas (PADOVANI *et al.*, 2015; NISKA *et al.*, 2016). A ascensão de estudos nesta área pode ser percebida pelo crescente número de pedidos de patentes, o que reafirma o crescimento dessa tecnologia (FERNANDEZ *et al.*, 2021).

A inclusão de nanopartículas em materiais odontológicos contribuiu para a melhoria de suas propriedades (PADOVANI *et al.*, 2015; NISKA *et al.*, 2016; NORONHA *et al.*, 2017). A eficácia das nanopartículas de prata (AgNPs), se deve não apenas ao seu tamanho em nanoescala, mas também à sua grande proporção área de superfície/ volume o que permite uma maior interação com os micro-organismos e, conseqüentemente seu amplo espectro de ação (YIN *et al.*, 2020). Sua atividade antibacteriana também tem sido percebida mesmo contra aqueles resistentes a antibióticos (BRANDT *et al.*, 2012; MOHANTY *et al.*, 2012); ademais, efeitos sinérgicos puderam ser observados em composições de antibióticos com AgNPs (NANDA; SARAVANAN, 2009; FAYAZ *et al.*, 2010).

A atividade antibacteriana das AgNPs ainda não é totalmente conhecida, porém estudos mostram a atuação de seus íons prata nas diversas estruturas do componente celular bacteriano, especialmente com relação à capacidade de adesão à parede das células e também à membrana citoplasmática pela atração e afinidade eletrostática às moléculas de enxofre, elevando a permeabilidade e ruptura da membrana (RAFFI *et al.*, 2008; ABBASZADEGAN *et al.*, 2015), em gram-negativas, as porinas, que são as proteínas presentes na membrana externa, atuam na absorção de AgNPs (RADZIG *et al.*, 2013). DNA, proteínas e lipídios são moléculas que podem ser afetadas pelas AgNPs (INBAKANDAN *et al.*, 2016; KUMARI *et al.*, 2017). AgNPs podem inibir o crescimento e a vitalidade bacteriana pelo estímulo ao estresse oxidativo que

leva à destruição das células bacterianas elevando a desfosforilação de resíduos de tirosina em substratos peptídeos bacterianos (PRABHU; POULOSE, 2012; KUMARI *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que espécies reativas de oxigênio (ROS) são os principais responsáveis pela interrupção da membrana celular e modificação do DNA (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016).

Estudos recentes evidenciaram as vantagens da utilização de AgNPs na área odontológica, haja vista seu potencial antimicrobiano, evitando inclusive a necessidade de terapias de infecção em diversos casos (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016). Há em todo o mundo, uma disseminação de resistência bacteriana, dificultando a eficácia de tratamentos (UNEMO; NICHOLAS, 2012) e isso causa vastos efeitos sociais e econômicos, requerendo medidas urgentes no que se refere ao desenvolvimento de ações preventivas e de controle de infecção (World Health Organization, 2017). AgNPs têm sido utilizadas em diferentes materiais odontológicos, dentre eles os protéticos (BACALI *et al.*, 2020; TAKAMIYA *et al.*, 2021), sistemas adesivos (DUTRA-CORREA *et al.*, 2018), implantes (GODOY-GALLARDO *et al.*, 2015), endodônticos (KRETH *et al.*, 2008; BHANDI *et al.*, 2021), nas terapias para tratamento de lesões cariosas (DOS SANTOS *et al.*, 2014) e prevenção de biofilmes (JIA *et al.*, 2016), além de serem usados também na indução osteogênica (TIAN *et al.*, 2016), ampliando suas possibilidades de uso no século 21. A utilização de nanopartículas (NPs) pode ser acrescentada em materiais de uso odontológicos como o cimento de ionômero de vidro, na tentativa de melhorar suas propriedades, ajudando no controle do processo DES-RE (FATTAH; JOWKAR; REZAEIAN, 2021).

Os desafios em relação às AgNPs se devem à sua elevada área de superfície que favorece a agregação das partículas finas como aquelas em escala nanométrica originando partículas secundárias o que limita a sua utilização (HOLTZ *et al.*, 2010; HOLTZ *et al.*, 2012). Diante do exposto, estudos têm sido realizados visando ancorar o íon e evitar esta agregação (KUMAR *et al.*, 2013).

Um potencial agente antimicrobiano, a base de prata, o nanofio de vanadato de prata decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3) foi descrito por HOLTZ *et al.*, (2010) e HOLTZ *et al.*, (2012). Os estudos revelam que a sua concentração inibitória mínima (CIM) é 100 vezes menor que a apresentada pela Oxacilina. Além disso, esse nanomaterial apresenta uma elevada atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus* resistente à vancomicina.

O potencial antimicrobiano do AgVO_3 incorporado a diferentes materiais odontológicos, dentre eles, hidrocolóide irreversível, resina acrílica, cimento endodôntico,

cerâmica, superfície de implante dentário e revestimento para prótese foi comprovado em estudos recentes (DE CASTRO *et al.*, 2019; DE CAMPOS; BOTELHO; DOS REIS, 2021; DE CASTRO *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2021).

O AgVO_3 é um nanomaterial que estabiliza AgNPs em nanofios de vanádio. Este composto híbrido se dissocia em íons de prata (Ag^+) e vanádio ($\text{V}^{4+} / \text{V}^{5+}$) e é reativo para cepas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (HOLTZ *et al.*, 2012). Os íons Ag^+ e vanádio em estado pentavalente interagem com os grupos tiol presentes nas enzimas do metabolismo bacteriano formando complexos estáveis e, quando em contato com o DNA bacteriano, o Ag^+ impede sua replicação. A oxidação-redução entre V^{4+} e V^{5+} leva ao estresse oxidativo na célula bacteriana (HOLTZ *et al.*, 2012). Dessa forma, este nanomaterial pode atuar na progressão de diversos tipos de doenças causadas por micro-organismos (DE CAMPOS; BOTELHO; DOS REIS, 2021). Apesar disso, o uso do AgVO_3 em cimento de ionômero de vidro ainda não havia sido investigado. O objetivo deste estudo, *in vitro*, foi avaliar de forma inédita a influência da incorporação do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata nas propriedades físico-mecânicas e biológicas de um cimento de ionômero de vidro. A hipótese nula testada foi a de que a incorporação de AgVO_3 não influenciaria nas propriedades deste material restaurador.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da incorporação do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata nas propriedades mecânicas e biológicas de um cimento de ionômero de vidro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar o vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata;
- Determinar a concentração inibitória mínima do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata frente ao *Streptococcus mutans*;
- Incorporar diferentes concentrações de vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata em um cimento de ionômero de vidro;
- Avaliar a atividade respiratória do *Streptococcus mutans* através do ensaio de redução de XTT, a viabilidade celular por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e análise qualitativa por microscopia de fluorescência;
- Avaliar o efeito do cimento de ionômero de vidro modificado, na prevenção da desmineralização do esmalte após formação de biofilme cariogênico;
- Avaliar a influência da incorporação do AgVO_3 na resistência à tração diametral, dureza e rugosidade superficial do cimento de ionômero de vidro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Vanadato de Prata Nanoestruturado Decorado com Nanopartículas de Prata

O vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs foi produzido e caracterizado no Laboratório de Pesquisa em Química de Materiais do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João Del-Rei (MG).

3.1.2 Cimentos de Ionômero de Vidro

Para o estudo foi selecionado um cimento de ionômero de vidro, especificado a seguir na Tabela 1.

Tabela 1 - Cimento de ionômero de vidro utilizado no estudo.

Marca Comercial/ Fabricante	Classificação	Composição	Apresentação
Riva Self Cure/SDI	Cimento de ionômero de vidro convencional condensável para restaurações - art autopolimerizável	Vidro de Estrôncio / Ácido Poliacrílico / Ácido Tartárico	Kit pó / líquido 10g pó 6mL líquido

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Delineamento Experimental

O fator em estudo foi a concentração de vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3) incorporada a um cimento de ionômero de vidro autopolimerizável (Riva Self Cure; Riva Self Cure + 1% AgVO_3 ; Riva Self Cure + 2,5% AgVO_3 e Riva Self Cure + 5% AgVO_3). Para as análises microbiológicas, as variáveis de resposta quantitativas foram: contagem de unidades formadoras de colônia (em \log_{10} UFC/mL) e Absorbância do XTT (em nm). Por meio da microscopia de fluorescência foi realizada uma

análise qualitativa. Para as análises mecânicas as seguintes variáveis de resposta quantitativas foram abordadas: resistência à tração diametral (MPa), Dureza Superficial (HK) e Rugosidade Superficial (μm) e para a análise da desmineralização do esmalte, a Dureza Superficial (HK). A Figura 1 mostra o fluxograma do estudo.

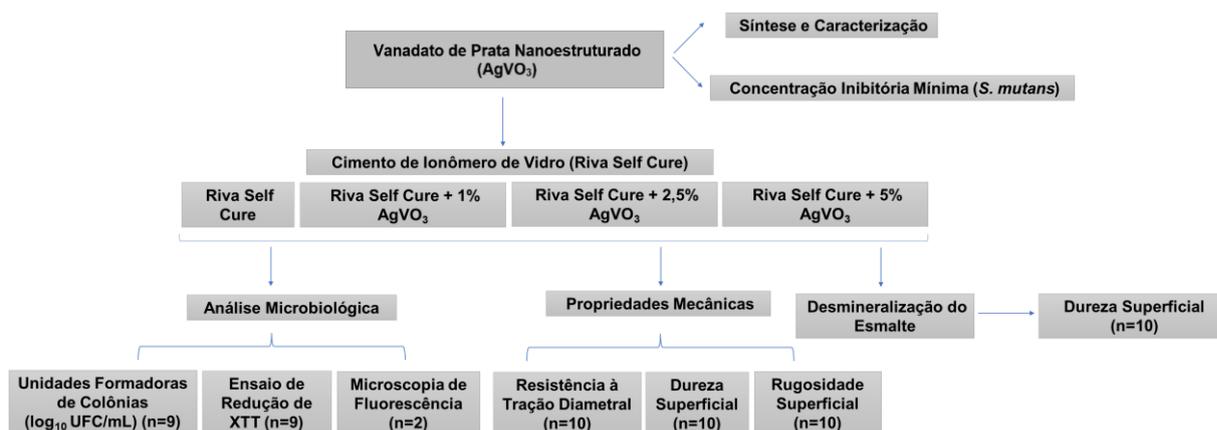


Figura 1 - Fluxograma do estudo.

3.2.2 Síntese e Caracterização do Vanadato de Prata Nanoestruturado Decorado com Nanopartículas de Prata

O vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata foi sintetizado através de uma reação de precipitação (Figura 2) entre o nitrato de prata (AgNO_3 , Merck 99,8%) e o vanadato de amônio (NH_4VO_3 , Merck 99%).



Figura 2 - Reagentes para a síntese do vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs.

Fonte - de Castro (2017, p. 43).

Inicialmente, 0,9736 g de NH_4VO_3 e 1,3569 g de AgNO_3 foram solubilizadas em 200 mL de água destilada, respectivamente. As soluções foram agitadas separadamente em superfície aquecida à 65°C , durante 10 minutos. A seguir, a solução de nitrato de prata foi adicionada gota a gota com o uso de uma bureta na solução de vanadato de amônio sob agitação constante à temperatura de 65°C . O precipitado obtido foi lavado com água destilada e álcool absoluto por diversas vezes, sendo posteriormente filtrado e seco em linha de vácuo por 10 horas (Figura 3).



Figura 3 - Vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs.

A caracterização foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão (STEM), com o microscópio JEOL JEM-100CX II, a fim de verificar a morfologia e a presença de nanopartículas de prata (AgNPs) na superfície dos cristais formados.

3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata frente à *Streptococcus mutans* ocorreu pelo método das diluições.

Placas de 96 poços foram preparadas contendo 100 μL do meio de cultura BHI. O pó do AgVO_3 deu-se diluído em água destilada, e no primeiro poço sucedeu adicionado 100 μL de AgVO_3 à concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, seguido de homogeneização. As diluições sucessivas foram realizadas, transferindo-se 100 μL da suspensão para o próximo poço, de forma que a

concentração do agente fosse reduzida pela metade, a cada diluição. Em cada poço foram inoculados 5 μL do micro-organismo testado.

Foram obtidas 10 concentrações do agente antimicrobiano (que variaram de 500 a 0,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e dois controles, um positivo, contendo apenas meio de cultura e micro-organismo, e outro negativo, contendo meio de cultura e a solução com AgVO_3 .

As placas passaram por incubação a 37°C , em estufa microbiológica, e após 24 horas de incubação, o crescimento microbiano seguiu sendo avaliado através da turbidez da amostra a olho nu. Havendo turvação, o resultado foi considerado ineficiente para ação antimicrobiana do vanadato. Uma alíquota dos poços considerados negativos foi semeada em placa com meio de cultura específico para confirmar ausência/presença de crescimento (Figura 4).



Figura 4 - Protocolo para determinação da Concentração Inibitória Mínima – *Streptococcus mutans*.

3.2.4 Confeção das Amostras de Cimento de Ionômero de Vidro

As amostras foram preparadas nas dimensões de $\varnothing 6 \times 3$ mm por mistura das porcentagens de 0% (Riva Self Cure), 1%, 2,5% e 5% (em massa) de AgVO_3 . A manipulação foi realizada sempre por um único operador. O nanomaterial foi incorporado proporcionalmente ao pó do cimento de ionômero de vidro, pesados em balança de precisão. Em seguida, o pó foi incorporado ao líquido seguindo as instruções e a manipulação realizada com espátula sobre uma placa de vidro despolida a fim de garantir uma melhor homogeneização (Figura 5). Finalizada a manipulação, o material foi inserido em matrizes de mesmo formato e dimensão, uma placa de vidro foi sobreposta à matriz a fim de obter uma superfície plana. Após o tempo de polimerização, foi realizado o acabamento e o polimento das amostras com lixas #400, #600, #1200, #2000 #2500 e #5000.



Figura 5 - Amostras preparadas de acordo com o grupo experimental.

3.2.5 Análise Microbiológica

3.2.5.1 Micro-organismo e Condição de Crescimento

A análise microbiológica foi realizada frente a espécie citada no Tabela 2.

Tabela 2 - Micro-organismo padrão utilizado no experimento microbiológico.

Código	Micro-organismos	Procedência	Características
Sm	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC25175	Cocos Gram-positivos

ATCC, American Type Culture Collection.

Para o preparo do inóculo, o micro-organismo foi semeado em placa de Petri sobre o meio de cultura específico e incubado a 37°C por 48 horas. A seguir, para a padronização dos inóculos (10^8 UFC/mL), uma alçada do micro-organismo recém-cultivado foi adicionada à solução salina a 0,85%. Foi utilizado o espectrofotômetro PCB 687 (BYK Gardner, Geretsried, Alemanha), com a leitura da absorbância entre 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625 nm.

3.2.5.2 Desenvolvimento do Biofilme

Assepticamente, em cabine de fluxo laminar (Pachane, pa 400 – ECO, Piracicada, São Paulo, Brasil) o biofilme do micro-organismo foi formado em placas de cultura pré-estéreis de

24 orifícios. Os espécimes (n=9), previamente esterilizados com peróxido de hidrogênio de baixa temperatura, com um ciclo de duração de 35 minutos (Multilav Esterizações Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (MCEVOY; ROWAN, 2019), foram distribuídos em cada poço e 1 alíquota de 1,5 mL do meio de cultura inoculado foi transferida para cada orifício (Figura 6).

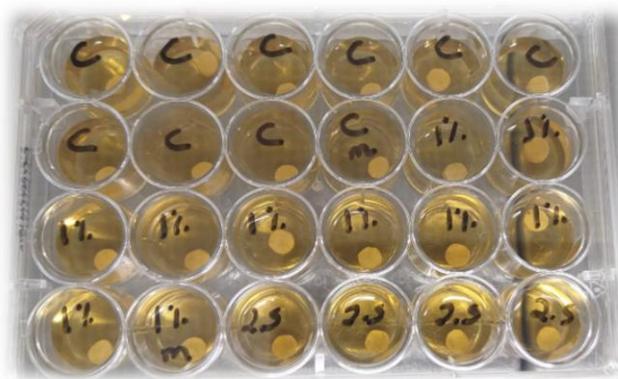


Figura 6 - Meio de cultura inoculado.

As placas foram incubadas a 37°C por 1 h e 30 minutos sob agitação de 750 rpm em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker, Mod. – CE-320, Cienlab, Campinas, SP, Brasil) para aderência do biofilme nos corpos-de-prova. Após o período de adesão, os corpos-de-prova foram lavados cuidadosamente com 2 mL de solução salina a 0,85% com a finalidade de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos.

Em seguida, 2 mL de meio de cultura estéril foram adicionados em cada poço com o objetivo de oferecer mais nutrientes aos micro-organismos. As placas foram incubadas a 37°C sob agitação de 750 rpm por 48 h para a maturação do biofilme. Decorrido esse período, os espécimes foram retirados das placas de 24 poços, lavados 1 vez com solução salina e inseridos separadamente em microtubos contendo 1 mL de PBS.

3.2.5.3 Unidades Formadoras de Colônias

O número de células viáveis foi quantificado em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Para a realização da semeadura em placas de Petri, as soluções contida nos tubos de ensaio foram diluídas de forma seriada. Para isso, os tubos foram individualmente agitados em um agitador de tubos de ensaio (Phoenix, AP 56, Araraquara, São Paulo, Brasil), uma alíquota de 25 µL da solução foi utilizada sem diluição e posteriormente,

uma alíquota de 25 μL foi transferida para um microtubo contendo 250 μL de PBS, obtendo-se assim diluições seriadas de 10^0 a 10^{-3} (Figura 7).

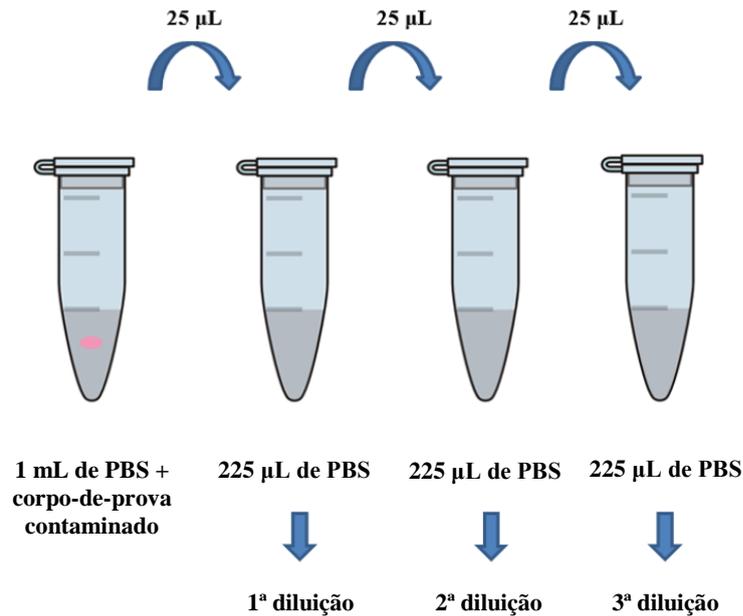


Figura 7 - Solução diluída de forma seriada nos tubos de ensaio.

Uma alíquota de 25 μL de cada diluição foi transferida à placa de Petri nos respectivos quadrantes e espalhada sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça Drigalsky. Em seguida, as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o número de colônias de cada diluição foi contado, e o valor de UFC obtido, com base na diluição que promoveu 30 a 300 colônias: $\text{UFC/mL} = \text{número de colônias} \times 10^n/q$, onde: n = valor absoluto da diluição (0, 1, 2,5 ou 5), e q = quantidade da suspensão plaqueada (0,025 mL). O valor de UFC/mL foi convertido em \log_{10} (Figura 8).

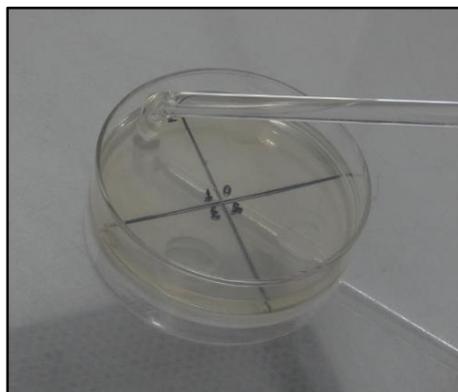


Figura 8 – Diluição em Placa de Petri.

Fonte - de Castro (2014, p. 56).

3.2.5.4 Atividade Respiratória através do Ensaio de Redução de XTT

Os biofilmes foram submetidos ao ensaio de XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida] para avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos (Figura 9). O teste baseou-se na habilidade das enzimas desidrogenases mitocondriais de micro-organismos metabolicamente ativos converterem o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em um produto solúvel em água – formazana (cor laranja), o que foi mensurado em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia). Dessa forma, a redução bioquímica do XTT pode ser empregada para medir a atividade metabólica de biofilmes.

O XTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) foi dissolvido em tampão PBS a uma concentração final de 1 mg/mL. A solução de menadiona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) foi preparada à concentração de 0,4 mM em acetona (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) imediatamente antes do uso. Para cada ensaio, a solução de XTT foi misturada com a solução de menadiona a uma razão de volume de 20:1.

Alíquotas de 100 μ L da suspensão homogeneizada de cada microtubo e 50 μ L da solução de XTT foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços. As placas foram cobertas com folha de alumínio e incubadas no escuro a 37°C durante 2h. Decorrido o tempo de incubação a quantificação da formação de formazan por espectrofotometria a 492 nm foi realizada em triplicata, utilizando um leitor de microplacas (Synergy II, BioTek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).



Figura 9 - Ensaio de redução de XTT.

3.2.5.5 Microscopia de Fluorescência

A análise qualitativa do biofilme foi realizada por microscopia de fluorescência. Os biofilmes formados na superfície das amostras ($n = 2$) foram corados com o kit de viabilidade celular LIVE / DEAD BacLight (Molecular Probes) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o enxágue, os espécimes foram transferidos para uma nova placa de 24 poços e cada amostra corada com 1000 μL da solução de 0,3% de Syto 9 e corantes de iodeto de propídio e incubados em temperatura ambiente no escuro por 15 minutos.

Após a incubação, as amostras foram enxaguadas com PBS, montadas em lamínulas de vidro de 0,14 mm de espessura (24x60 mm) e observadas sob microscópio invertido com filtros em comprimentos de onda de excitação de 490 nm e 546 nm (Axio Observer A1; Carl Zeiss®) com ampliação de 63x. As imagens foram capturadas e analisadas usando o software ZEN 2.3 Lite (Carl Zeiss® Microscopy Ltd., Oberkochen, Alemanha).

3.2.6 Avaliação do Efeito da Incorporação do Nanomaterial ao CIV na Prevenção da Desmineralização do Esmalte após Formação do Biofilme Cariogênico

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (CAAE - 002/2021), 40 incisivos bovinos sem quaisquer trincas ou desgaste foram selecionados. Os dentes foram limpos e, em seguida, imersos em solução de formalina a 10% para desinfecção por 7 dias. Depois, os dentes foram lavados e armazenados em água destilada e deionizada a uma temperatura de 4°C.

Os incisivos foram seccionados separando a porção coronária da raiz com um disco de diamante sob refrigeração na máquina de corte ISOMET 1000® (Precision Saw Buehler, Illinois – EUA).

O primeiro corte foi feito 1 mm abaixo da junta esmalte-cimento. Foram obtidos espécimes a partir da porção coronária, padronizados nas dimensões de 4 mm x 4 mm x 2 mm (Figura 10). Então, foram lixados na máquina de polimento Arotec APL-4 (Série 41042, Arotec S.A. indústria e comércio), sob refrigeração em água com lixas #400, #600, #1200, #2000 #2500 e #5000, para a planificação da superfície do esmalte. A seguir foi feita a seleção dos espécimes através da mensuração da microdureza (Knoop, 50g, 15s) no microdurômetro Shimadzu. O coeficiente de variação aceito foi de 10%.

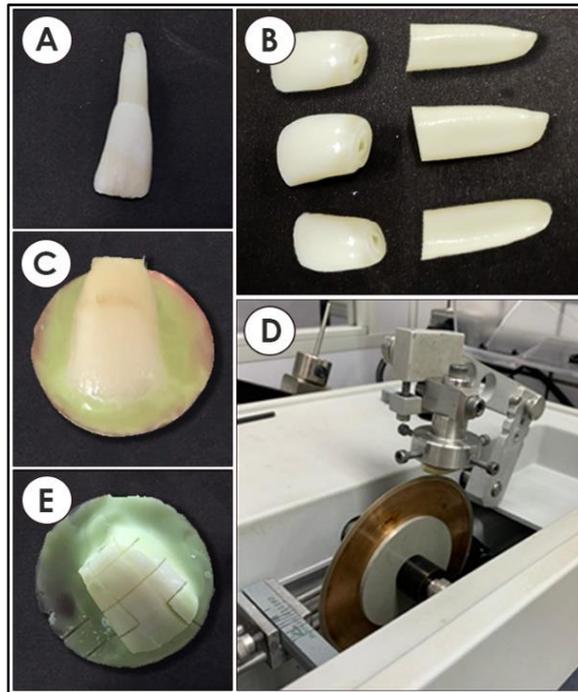


Figura 10 - Preparo dos espécimes. A - Dente bovino hígido. B – Dentes seccionados coroa e raiz a 1mm da junta esmalte-cimento. C – Fixação da coroa com cera no bloco de acrílico para obtenção dos espécimes. D – Corte em máquina de corte de precisão ISOMET 1000®. E – Obtenção dos espécimes nas dimensões de 4 mm x 4 mm x 2 mm.

Dessa forma, foram obtidos 40 blocos de esmalte, que receberam preparos de cavidades padronizadas com broca 1016 (KG) e foram divididos em grupos (n=10) de acordo com a concentração do nanomaterial (Figura 11).

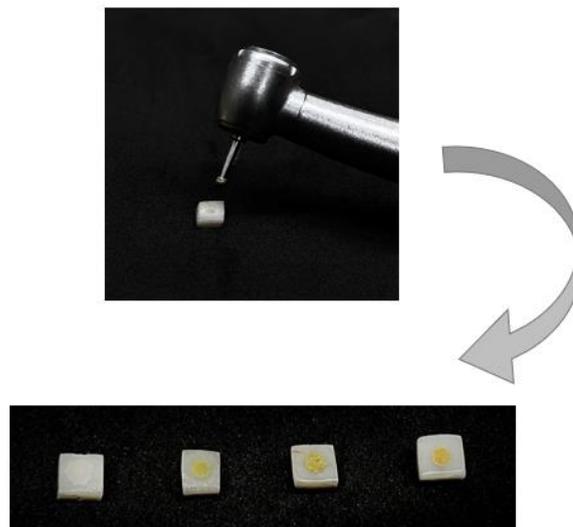


Figura 11 - Padronização das cavidades e restauração com a concentração do nanomaterial.

O polimento foi realizado com lixa #5000 para remoção dos excessos do material. Uma metade dos dentes foi recoberta com fita isolante e as demais faces (porção da dentina e região controle), foram protegidas com duas camadas de esmalte vermelho cosmético para unhas (Colorama, L'Oreal Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ácido-resistente (Figura 12). Em seguida, as amostras foram esterilizadas com peróxido de hidrogênio de baixa temperatura com um ciclo de duração de 35 minutos (Multilav Esterizações Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) (MCEVOY; ROWAN, 2019).

Após a esterilização, a fita isolante foi retirada, deixando exposta a região experimental. Para o desafio cariogênico, os dentes foram inseridos em tubos de ensaio estéreis com meio de sobrevivência Brain Heart Infusion (BHI, Labcenter, São Paulo, Brasil) suplementado com 0,5% de extrato de levedura (Labcenter, São Paulo, Brasil), 0,5% de glicose (Labcenter, São Paulo, Brasil), 1% de sacarose (Labcenter, São Paulo, Brasil) e cepa padrão de *S. mutans* ATCC 25175 (Fundação André Tosello, Campinas, Brasil) padronizada na escala 0,5 de MacFarland (Labcenter, São Paulo, Brasil) (CARVALHO *et al.*, 2008).

As amostras foram incubadas a 37 °C por 5 dias em jarras de anaerobiose (Labcenter, São Paulo, Brasil) pelo método da chama de vela e armazenadas em estufa bacteriológica (Sterllifer, Diadema, Brasil). Durante o transcorrer dos 5 dias, o meio de sobrevivência BHI (Labcenter, São Paulo, Brasil) foi renovado a cada 48 horas (CARVALHO *et al.*, 2008; BECCI *et al.*, 2014). O pH foi mensurado a cada troca de meio para verificar que esteja $\text{pH} \leq 5$, caracterizando o desafio cariogênico.

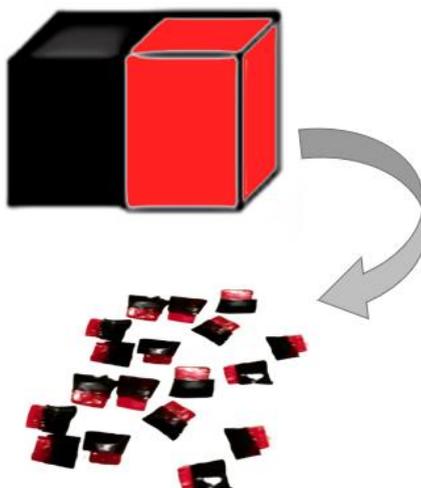


Figura 12 - Metade do esmalte dentário protegido pelo verniz ácido resistente e a outra metade recoberta com fita isolante.

Após os 5 dias, os blocos foram removidos dos tubos de ensaios e imersos durante 1 minuto em hipoclorito de sódio para a descontaminação. A seguir, o verniz foi removido da região controle, foi realizada a limpeza com algodão e então procedeu-se a mensuração da microdureza (Knoop, 50 g, 15s), através de 3 linhas com 5 identações (50, 150, 250, 350 e 450 μm) em cada, iniciando a 50 μm da margem da restauração e finalizando com 450 μm com 100 μm de distância entre elas. As medições foram realizadas nos lados protegidos (controle) e exposto ao biofilme (experimental)(Figuras 13).

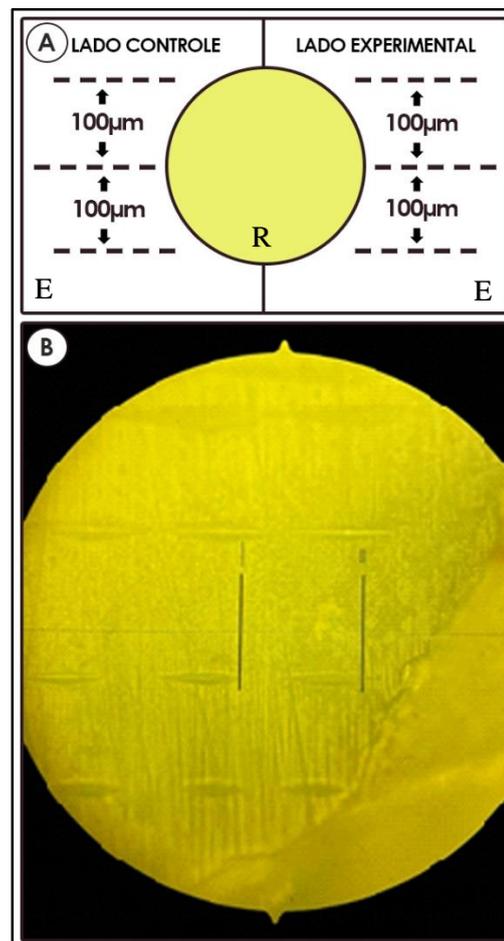


Figura 13 - Mensuração da microdureza. A - Esquema da microdureza, sendo R = Restauração com cimento de ionômero de vidro e E = Esmalte dental bovino. B - Imagem realizada através de câmera na lente do Microdurômetro - Shimadzu no momento da realização da mensuração da microdureza no lado experimental.

3.2.7 Avaliação da Resistência a Tração Diametral

O teste de resistência a tração diametral seguiu a norma ADA n.66 com espécimes de \varnothing

6 x 3 mm (n=10). Os espécimes foram mantidos na matriz em estufa a $37\pm 1^\circ\text{C}$ por 1 hora e depois, armazenados em água deionizada em estufa por 23 horas. Os testes de resistência foram realizados em máquina de ensaios universal (EMIC DL-3000 – Capacidade de 30 kN) com uma velocidade de 0,75 mm/min (Figura 14) (MAGALHÃES *et al.*, 2017).



Figura 14 - Máquina universal de ensaios.

3.2.8 Avaliação da Dureza Superficial

A análise da dureza superficial (n=10) foi realizada por meio do Microdurômetro (Shimadzu HMV-2000, Japão) (Figura 15). Foram realizadas 3 medições aleatoriamente equidistantes em cada corpo-de-prova por meio de um penetrador tipo Knoop com carga de 25 gf (gramas força) por 30 segundos (DOS SANTOS *et al.*, 2015). As indentações foram medidas através de duas marcas nos vértices do losango em uma imagem com aumento de 40x, determinando o comprimento da diagonal maior e, por conseguinte, os resultados de dureza Knoop por meio do cálculo automático feito pelo software do equipamento.

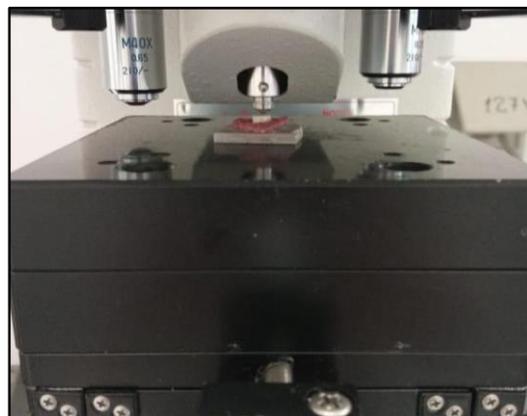


Figura 15 - Microdurômetro - Shimadzu HMV-2000.

3.2.9 Avaliação da Rugosidade Superficial

A análise da rugosidade superficial (n=10) foi feita por meio do rugosímetro SJ. 201P (Mitutoyo Corporation, Japão), que opera com uma ponta analisadora de superfície capaz de medir até 100 mm de percurso, apresentando uma base de granito com baixo potencial de dilatação, evitando a descalibragem do aparelho. A ponta analisadora tocou na peça e percorreu uma distância de 4 mm (milímetros) fazendo 3 medições em cada corpo-de-prova (Figura 16).

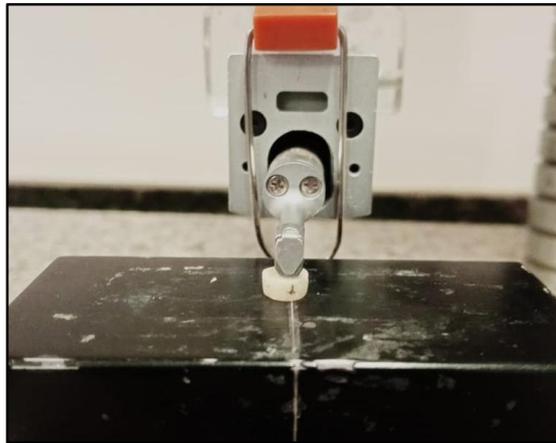


Figura 16 - Rugosímetro SJ. 201P – Mitutoyo.

3.2.10 Análise dos Dados

A análise estatística dos dados foi realizada através do software SPSS versão 22.0. Verificada a distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov) e homogênea (Levene), os dados foram comparados com o teste de Análise de Variância de um ou dois fatores. Para a diferenciação das médias, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Para todos os testes o nível de significância foi 5% ($\alpha= 0,05$).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO VANADATO DE PRATA NANOESTRUTURADO DECORADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A caracterização demonstrou a obtenção de um nanomaterial híbrido. Nanofios de vanadato de prata com diâmetro médio de 150 nm e comprimento em escala micrométrica decorados com nanopartículas de prata metálicas semiesféricas em escala nanométrica (Figura 17).



Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (x 200 magnitude).

4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO NANOMATERIAL PURO

O valor da concentração inibitória mínima (CIM) do vanadato de prata puro foi determinado antes que o mesmo fosse incorporado ao cimento de ionômero de vidro. A CIM contra *Streptococcus mutans* foi de 250 µg/mL como atestado na Tabela 3, este valor é importante uma vez que demonstra a eficácia antimicrobiana de vanadato de prata contra a bactéria.

Tabela 3 - Micro-organismo e valor de CIM para AgVO₃ utilizado no ensaio microbiológico.

Código	Micro-organismo	Procedência	Característica	CIM (µg/mL)
Sm	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	Coco gram-positivo	250

4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.3.1 XTT

O efeito da incorporação do nanomaterial sobre a viabilidade do biofilme de *S. mutans*, avaliado pelo ensaio de redução de XTT encontra-se descrito a seguir, de acordo com a leitura da alteração colorimétrica.

A Figura 18 mostra que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). O grupo Riva Self Cure ($0,016\% \pm 0,010\%$), foi estatisticamente semelhante ao Riva Self Cure + 1% de AgVO_3 ($0,014\% \pm 0,010\%$) ($p = 1,000$) e diferente dos demais grupos ($p < 0,05$), que por sua vez apresentaram maior atividade metabólica.

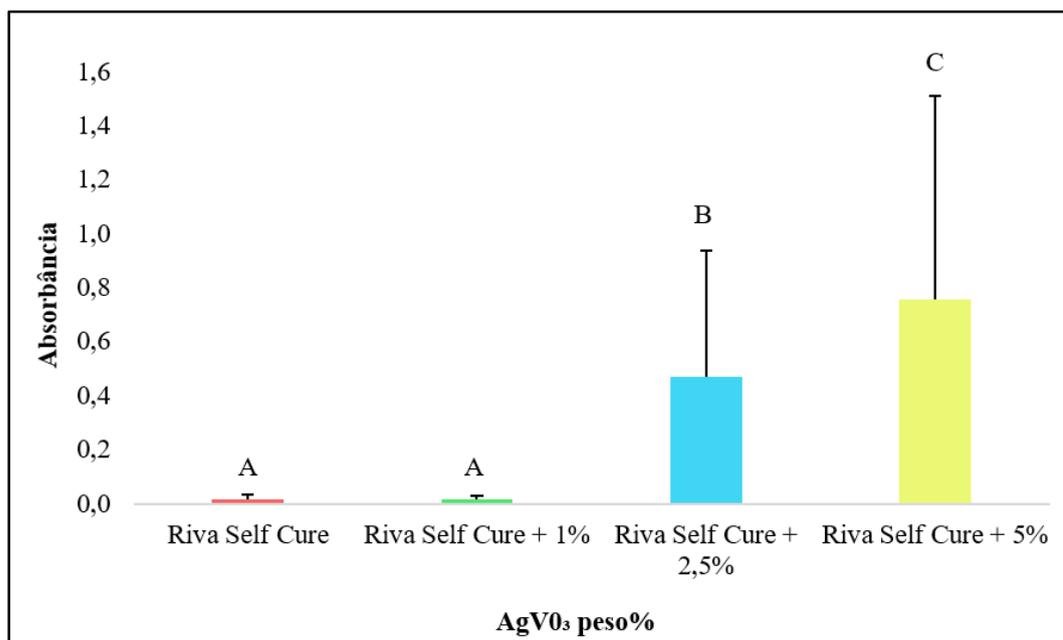


Figura 18 - Análise comparativa da absorbância do XTT. * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. $P < 0,05$.

4.3.2 Unidades Formadoras de Colônias

A análise da quantificação do número de células viáveis em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) é apresentada a seguir (Figura 19).

A contagem de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* mostrou que houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,006$). O grupo Riva Self Cure ($4,28\% \pm 0,51\%$), foi estatisticamente semelhante aos demais ($p > 0,05$). A diferença estatística foi observada entre os

grupos incorporados com o nanomaterial, sendo que o Riva Self Cure + 2,5% de AgVO_3 ($4,65\% \pm 0,65\%$) e Riva Self Cure + 5% de AgVO_3 ($4,47\% \pm 0,41\%$) apresentaram maiores valores de unidades formadoras de colônias em relação ao Riva Self Cure + 1% de AgVO_3 ($3,36\% \pm 1,21\%$) ($p < 0,05$).

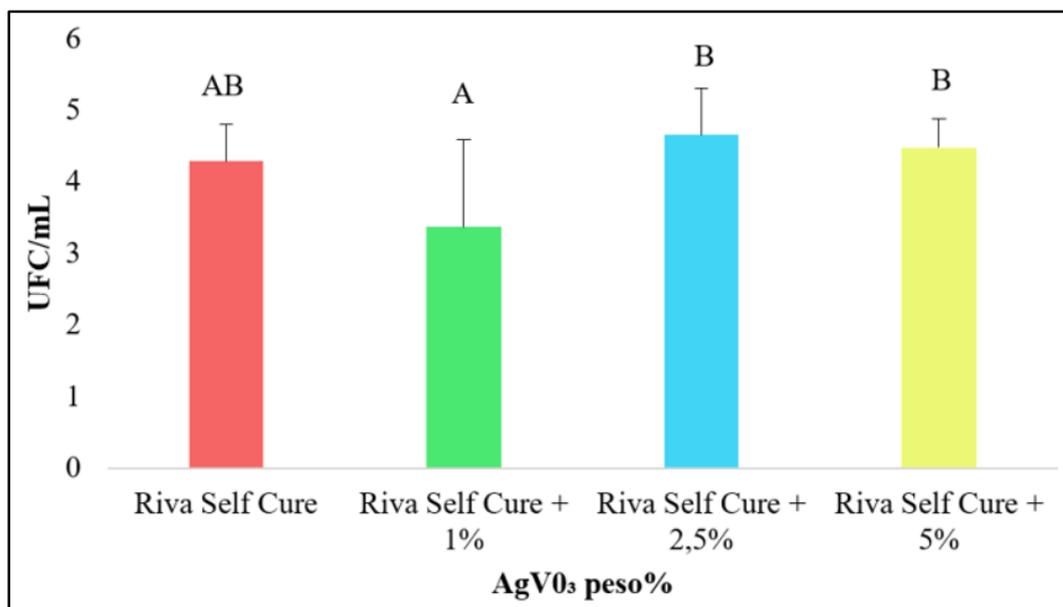


Figura 19 - Análise comparativa das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni.

$P < 0,05$.

4.3.3 Microscopia de Fluorescência

As imagens obtidas por meio da análise qualitativa do biofilme encontram-se a seguir (Figura 20). É possível observar uma maior densidade de células e em maior proporção na cor verde, nos grupos incorporados com o nanomaterial, em comparação com o Riva Self Cure. Nota-se no Riva Self Cure, a menor quantidade do número de células, havendo mais espaços vazios entre elas, embora uma inibição completa não tenha sido observada.

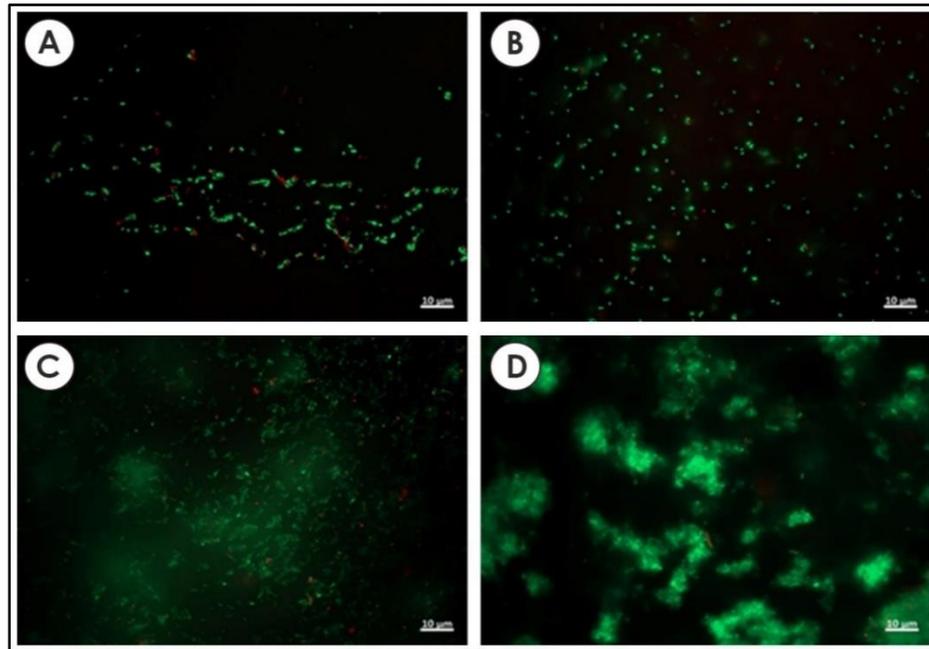


Figura 20 - Microscopia de fluorescência do biofilme formado (63x). A - Riva Self Cure. B - Riva Self Cure + 1% AgVO₃. C - Riva Self Cure + 2,5% AgVO₃. D - Riva Self Cure + 5% AgVO₃.

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INCORPORAÇÃO DO NANOMATERIAL AO CIV NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE

A análise da microdureza superficial demonstrou que não houve diferença significativa ($p=0,795$) na interação dos fatores (grupo e distância) (Figura 21).

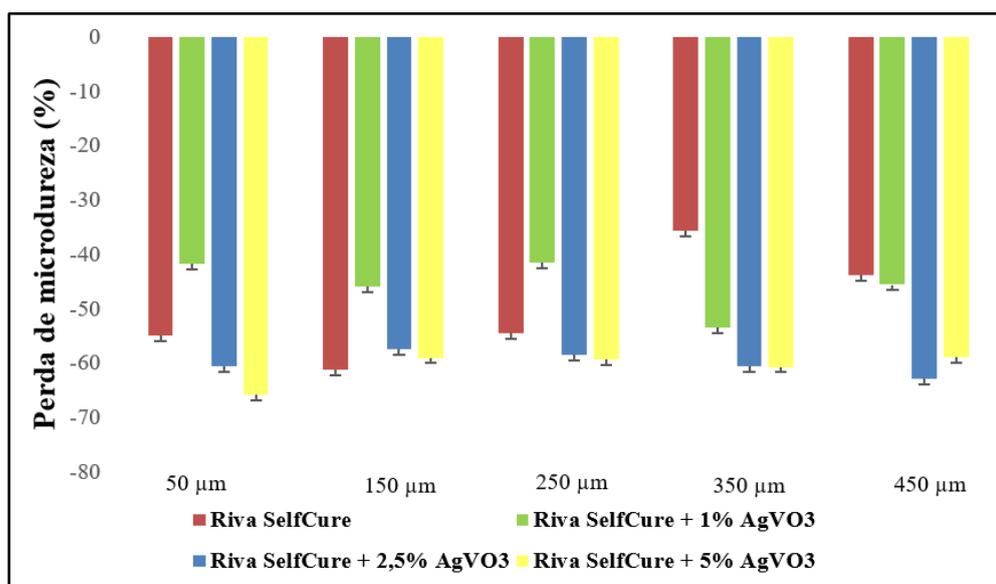


Figura 21 - Perda de microdureza considerando a interação grupo x distância da restauração. ANOVA de dois fatores e pós teste de Bonferroni. $P < 0,05$.

Diferença significativa foi observada ao comparar os grupos de forma independente ($p=0,005$), sendo que o grupo Riva SelfCure + 1% apresentou menor perda percentual de microdureza ($-45,17\% \pm 28,13\%$), com diferença significativa em relação ao Riva SelfCure + 2,5% ($-60,06\% \pm 15,93\%$) ($p=0,005$) e o Riva SelfCure + 5% ($-60,79\% \pm 11,27\%$) ($p=0,003$). Nota-se que nenhum dos grupos foi capaz de prevenir a desmineralização do esmalte frente ao biofilme cariogênico (Figura 22).

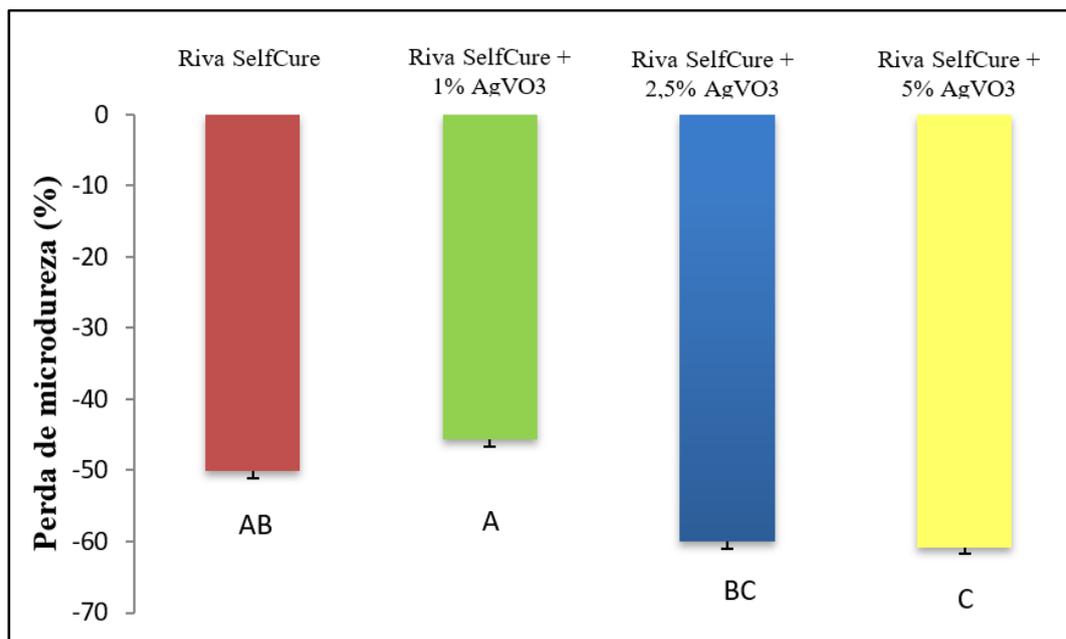


Figura 22 - Perda de microdureza considerando o fator grupo de forma independente. ANOVA de dois fatores e pós teste de Bonferroni. $P<0,05$.

4.5 ANÁLISES FÍSICO-MECÂNICAS

4.5.1 Tração Diametral

Como mostra a Figura 23, a incorporação de 2,5% ($4,40\% \pm 0,93\%$) e 5% ($3,48\% \pm 1,06\%$), em peso do AgVO_3 resultou em uma diminuição significativa ($p<0,001$) nos valores de resistência à tração diametral quando comparados ao grupo Riva Self Cure ($6,84\% \pm 2,47\%$).

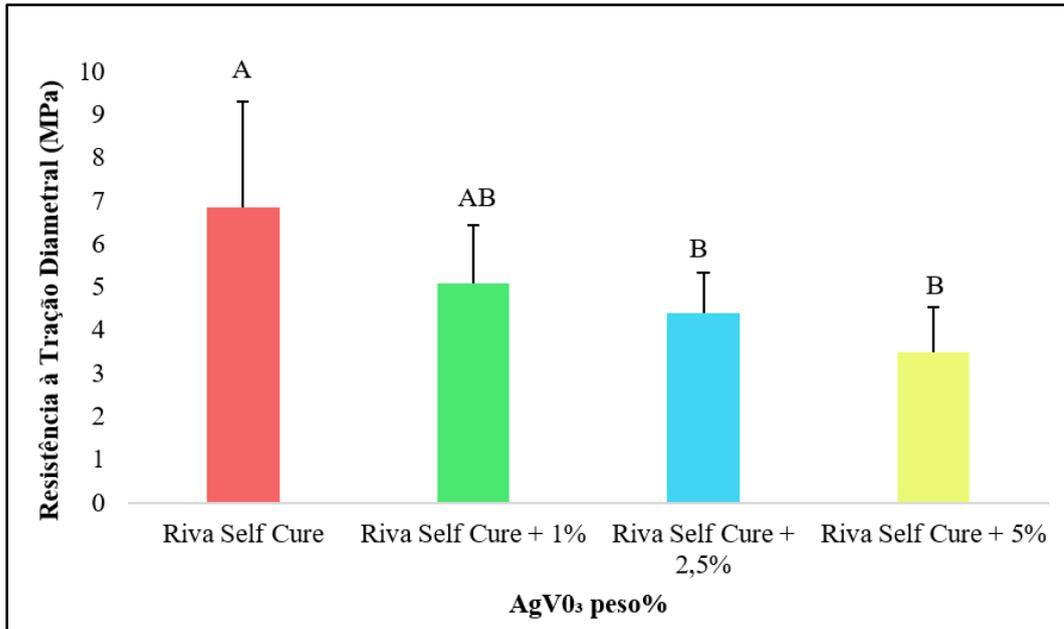


Figura 23 - Resistência à tração diametral (Mpa). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. $P < 0,05$.

4.5.2 Dureza Superficial

A incorporação de 5% de AgVO_3 ($34,66\% \pm 3,76\%$) resultou em uma diminuição significativa da dureza superficial em comparação com o grupo Riva Self Cure ($43,28\% \pm 8,28\%$) ($p=0,042$) (Figura 24).

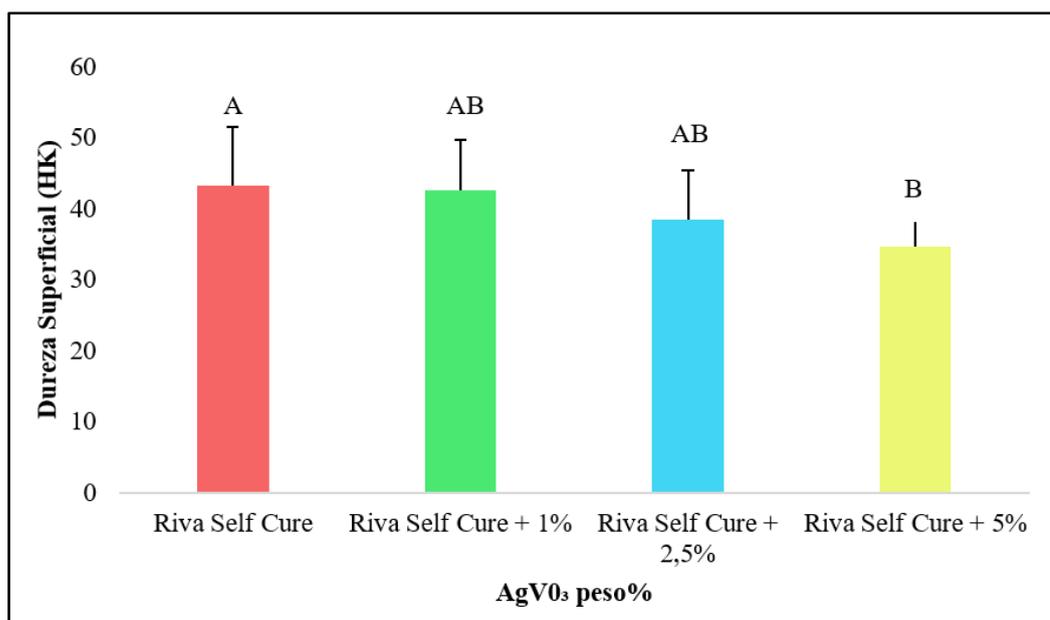


Figura 24 - Dureza superficial (HK). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. $P < 0,05$.

4.5.3 Rugosidade Superficial

Como mostra a Figura 25, em relação a rugosidade superficial, não houve diferença significativa ao comparar o grupo Riva Self Cure, com os grupos incorporados ao nanomaterial ($p=0,096$).

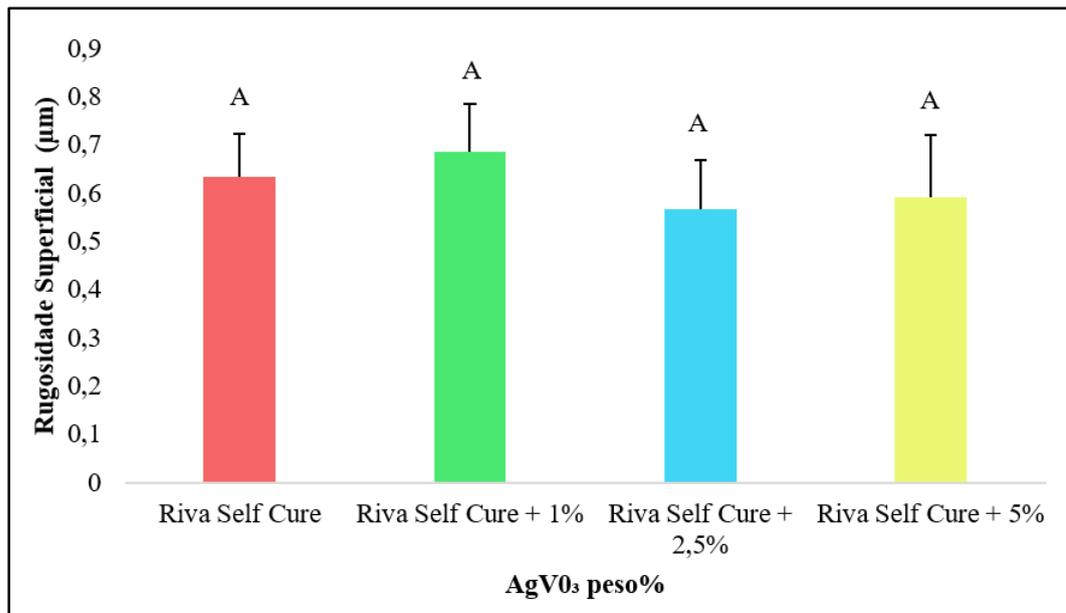


Figura 25 - Rugosidade superficial (µm). * Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. ANOVA de um fator e pós teste de Bonferroni. $P<0,05$.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A cárie é uma doença multifatorial que impacta negativamente a saúde pública (BOTAZZO, 2008; ENDRES, 2021) e que pode ter associação com doenças sistêmicas (MATHUR; DHILLON, 2018). A higienização precária da cavidade bucal contribui para a proliferação de micro-organismos orais e conseqüentemente para o seu desenvolvimento (MATHUR; DHILLON, 2018). Estratégias preventivas da doença envolvem o controle da desmineralização do esmalte dental após a formação do biofilme cariogênico.

Cimento de ionômero de vidro (CIV) tem sido muito utilizado em técnicas restauradoras devido a conservação da estrutura dentária hígida e sua adesão química (DIAS *et al.*, 2018). Alguns estudos sugeriram que a atividade antibacteriana do CIV é atribuída principalmente à liberação de flúor (RAO; RAO; SUDHA, 2011; PENDRYYS, 2011; KRÄMER *et al.*, 2017), enquanto outros argumentaram que o baixo pH do material durante a configuração do material contribui mais para o efeito bactericida e quase nenhuma atividade antibacteriana existe com o passar do tempo (LOYOLA-RODRIGUEZ; GARCIA-GODOY; LINDQUIST, 1994; YESILYURT *et al.*, 2009). Além disso, pesquisas clínicas revelaram que o potencial de inibição bacteriano não é forte o suficiente para evitar cárie secundárias ao fazer uso de restaurações de CIV (FORSS; WIDSTRÖM, 2004; XIE *et al.*, 2011).

Bactérias cariogênicas tais como o *Streptococcus mutans*, gram-positivo, podem fermentar carboidratos para produzir ácido e desmineralizar a estrutura do dente na interface, criando cárie secundárias. Diante disso, agentes antibacterianos foram adicionados aos cimentos de ionômero de vidro convencionais para superar esses problemas, dentre eles quaternários de amônio (WENG *et al.*, 2010; MAKVANDI *et al.*, 2018), antibióticos (YESILYURT *et al.*, 2009) e clorexidina (PALMER *et al.*, 2004), entretanto foi observado o sacrifício de propriedades mecânicas, que já são relatadas na literatura como deficientes, ou seja, o CIV, naturalmente apresenta baixa resistência ao desgaste, microdureza e resistência a compressão e tração diametral o que limita seu uso (SOUZA *et al.*, 2013).

Conhecida por sua superioridade em relação a outros metais e não-metais, devido a suas propriedades antimicrobianas a prata possui vasta aplicação. Propriedades essas que são aumentadas quando arrançadas no modo de nanopartículas. Estudos demonstraram que os derivados de prata geram baixa toxicidade para indivíduos quando empregados em doses apropriadas, mesmo sendo altamente tóxico para micro-organismos (CHENG *et al.*, 2013; KHURANA *et al.*, 2013).

O vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs (AgVO₃) surgiu na tentativa

de aumentar o uso das nanopartículas de prata em início utilizados na área médica e hospitalar, como em tintas à base d'água com intuito de conter infecções hospitalares (HOLTZ *et al.*, 2012).

O presente trabalho estudou a incorporação do AgVO_3 no cimento de ionômero convencional autopolimerizável de forma inédita visto que estudos prévios relatam que este nanomaterial tem ação antimicrobiana e tem se apresentado eficiente na redução de infecções bacterianas transmitidas por micro-organismos altamente patogênicos (DE CAMPOS; BOTELHO; DOS REIS, 2021), promovendo uma alta dispersão de nanopartículas de prata em nanofios de vanadato de prata, sendo considerável para garantir uma grande área de superfície com os micro-organismos patogênicos, gerando grande efeito e longevidade da ação antimicrobiana (HOLTZ *et al.*, 2012).

Os métodos de redução do XTT, contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e análise qualitativa por microscopia de fluorescência, foram dispostos para estimar a atividade antimicrobiana do cimento de ionômero de vidro convencional associado ao AgVO_3 , no presente trabalho. O micro-organismo de escolha foi o *Streptococcus mutans*, coco gram-positivo, que possui gigantesca capacidade de adesão à estrutura dental e aos materiais restauradores, sendo o agente patogênico com maior responsabilidade para o surgimento da doença cárie (CUI *et al.*, 2019).

O método do XTT demonstrou maiores valores de absorvância, indicando maior atividade metabólica das células expostas aos grupos com 2,5 e 5% de AgVO_3 . O grupo Riva Self Cure + 1% de AgVO_3 apresentou o menor número de UFC/mL, sendo estatisticamente semelhante ao Riva Self Cure e diferente dos demais que apresentaram maiores valores. A estrutura das bactérias vivas e mortas na superfície do biofilme foi apresentada pela microscopia de fluorescência deixando evidente um aumento na formação de biofilme dependente da dose, sendo assim quanto maior a concentração do nanomaterial incorporado ao CIV, menos áreas negras foram observadas manifestando maior quantidade de micro-organismos, em sua maioria micro-organismos vivos sendo de tonalidade verde, e a tonalidade vermelha, sendo micro-organismos mortos, foi observada em certa quantidade no grupo Riva Self Cure.

Os resultados microbiológicos foram de desencontro com aqueles obtidos em trabalhos anteriores nos quais a incorporação de AgVO_3 a hidrocolóide irreversível, resina acrílica, cimento endodôntico, cerâmica, superfície de implante dentário e revestimento para prótese resultou em uma inibição quase completa do biofilme, com efeito dose dependente (DE CASTRO *et al.*, 2019; DE CAMPOS; BOTELHO; DOS REIS, 2021; DE CASTRO *et al.*, 2021; TEIXEIRA *et al.*, 2021).

GARCIA *et al.*, 2016 realizou a associação do CIV a nanopartículas de óxido de zinco nas concentrações de 1% e 2% em peso, e não observou uma ação antimicrobiana. Provavelmente o nanomaterial associado ao CIV teve esse desempenho devido a interação de seus componentes, fluoreto de sódio, pó de cálcio, óxido de silício básico, óxido de alumínio e cálcio e magnésio, sendo o líquido, uma solução aquosa de ácido poliacrílico, ácido tartárico e ácido itacônico (GENARO *et al.*, 2020), levando a não efetividade do AgVO_3 .

Com relação a desmineralização, nenhum dos grupos foi capaz de impedir a perda de dureza do esmalte dental exposto ao biofilme cariogênico. Acredita-se que o CIV tenha atividades cariostáticas devido à liberação de flúor (BIJLE, 2020). O íon fluoreto pode prevenir a desmineralização e promover a remineralização do esmalte, reduzir o crescimento de bactérias orais (THURNHEER; BELIBASAKIS, 2020). No entanto, de acordo com alguns estudos clínicos, a cárie secundária ainda é a principal razão para a falha na restauração do CIV, indicando a potência antibacteriana insuficiente da liberação de flúor (FORSS; WIDSTRÖM, 2004; XIE *et al.*, 2011; BIJLE, 2020). Isso destaca o motivo pelo qual este trabalho buscou modificar o material em busca de uma boa atividade antimicrobiana, visando inibir a colonização de bactérias cariogênicas na interface da restauração e da dentina e consequentemente reduzir a incidência de cárie secundária e aumentar a taxa de sobrevivência das restaurações. O grupo Riva Self Cure + 1% de AgVO_3 apresentou menor perda percentual de microdureza, com diferença significativa em relação aos grupos incorporados com 2,5% e 5%, e semelhança ao Riva Self Cure, que também não impediu a desmineralização.

O desempenho físico-mecânico foi avaliado, a fim de prever a durabilidade do material quando exposto às forças do meio bucal, através de ensaios de dureza, rugosidade e tração diametral.

O teste de dureza é frequentemente usado na Odontologia, pois é útil para indicar o sucesso do material no meio oral se considerando sua tenacidade às forças, tensão, deformação e desgaste (CASTILHO *et al.*, 2019). A incorporação do AgVO_3 ao CIV convencional na concentração de 5% promoveu uma diminuição significativa na microdureza.

A rugosidade de superfície é uma limitação no desempenho mecânico e estético do CIV, sendo indispensável o acabamento e polimento deste material (ALMEIDA *et al.*, 2017). Por sua vez, a rugosidade superficial não sofreu influência da incorporação do nanomaterial.

A tração diametral do CIV foi influenciada pela incorporação do nanomaterial, onde as concentrações de 2,5% e 5% em peso do AgVO_3 resultaram em uma diminuição significativa na resistência, em comparação com o grupo Riva Self Cure, portanto essa redução poderia levar a falha clínica devido a tensão causada por estresse (SOUZA *et al.*, 2013).

Este estudo pode orientar o desenvolvimento futuro de materiais restauradores. É preciso entender o motivo pelo qual o AgVO_3 quando associado a diferentes materiais é capaz de promover atividade antimicrobiana, com efeito dose dependente, e no presente estudo o grupo incorporado com a menor concentração (1%) do nanomaterial foi aquele que apresentou melhor desempenho em relação aos grupos incorporados com maiores concentrações do nanomaterial. Consequentemente, novas análises devem ser feitas para explorar essa associação.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que nenhum dos grupos foi capaz de inibir completamente a formação do biofilme e prevenir a desmineralização do esmalte. Os resultados sugerem que a incorporação de 1% de AgVO_3 ao cimento de ionômero de vidro apresentou desempenho semelhante ao grupo Riva Self Cure, entretanto o material testado foi sensível a incorporação de maiores concentrações, podendo estas sacrificarem as propriedades mecânicas sem potencializar o efeito antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2018 (Segunda Edição).

REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, A.; GHAHRAMANI, Y.; GHOLAMI, A.; HEMMATEENEJAD, B.; DOROSTKAR, S.; NABAVIZADEH, M., *et al.* The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. **Journal of Nanomaterial**, v.2015, p.1-8, 2015.

ALCARAZ, M.G.R.; VEITZ-KEENAN, A.; SAHRMANN, P.; SCHMIDLIN, P.R.; DAVIS, D.; IHEOZOR-EJIOFOR, Z. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent or adult posterior teeth. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n.3, p.1-48, 2014.

ALMEIDA, J.R.M.; MEDEIROS, T.C.; ARAÚJO, D.F.G.; CALDAS, S.G.F.R.; GALVÃO M.R. Evaluation of roughness, hardness, and surface of ionomer glass cements after submission to different systems of finishing and polishing. **Revista de Odontologia da UNESP**, [S. l.], p.330-335, 2017.

AMINOROAYA, A.; NEISIANY, R.E.; KHORASANI, S.N.; PANAH, P.; DAS, O.; RAMAKRISHNA, S. A Review of Dental Composites: Methods of Characterizations. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, [S. l.], v.6, n.7, p.3713-3744, 2020.

BACALI, C.; BALDEA, I.; MOLDOVAN, M.; CARPA, R.; OLTEANU, D.E.; FILIP, G.A., *et al.* Flexural strength, biocompatibility, and antimicrobial activity of a polymethyl methacrylate denture resin enhanced with graphene and silver nanoparticles. **Clinical Oral Investigations**, [S. l.], v.24, n.8, p.2713-2725, 2020.

BACCHI, A.C.; BACCHI, A.C.; ANZILIERO, L. The glass ionomer cement and its application in different areas of Dentistry. **Perspectiva**, [S. l.], v.37, n.137, p.103-114, 2013.

BAKHADHER, W.; SHAIIBANI, D.A.; BAMUSA, B.; BAJAFAR S.; EIDAN S.A.; ALMUHAIDIB D., *et al.* Modification of glass ionomer restorative material: A review of literature. **EC Dental Science**, v.18, p.1001-1006, 2019.

BECCI, A.C.O.; MARTI, L.M.; ZUANON, A.C.C.; BRIGHENTI, F.L.; SPOLIDÓRIO, D.M.P.; GIRO E.M.A. Influence of the addition of chlorhexidine diacetate on bond strength of a high-viscosity glass ionomer cement to sound and artificial caries-affected dentin. **Revista de Odontologia da UNESP**, [S. l.], p.1-7, 2014.

BELLO, S.C.; FERNANDEZ, L. Atraumatic Restorative Treatment like a tool of the Simplified Dentistry Review. **Acta Odontológica Venezolana**, [S. l.], v.46, n.4, p.567-572, 2008.

BERG, M.C.; JACOBSEN J.; MOMSEN, N.C.R.; BENETTI, A.R.; TELLING, M.T.F.; SEYDEL, T., *et al.* Water dynamics in glass ionomer cements. **The European Physical Journal Special Topics**, [S. l.], v.225, n.4, p.773-777, 2016.

BHANDI, S.; MEHTA, D.; MASHYAKHY, M; CHOHAN, H.; TESTARELLI, L; THOMAS, J., *et al.* Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles as Root Canal Irrigant's: A Systematic Review. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v.10, n.6, p.1-11, 2021.

BIJLE, M.N.; EKAMBARAM, M.; LO, E.C.M.; YIU, C.K.Y. Antibacterial and mechanical properties of arginine-containing glass ionomer cements. **Dental Materials**, [S. l.], v.36, n.9, p.1226-1240, 2020.

BOTAZZO, C. A cárie dentária como fetiche. Primeiras notas. *In*: BOTAZZO, C.; DE OLIVEIRA, M.A. **Atenção básica no Sistema Único de Saúde: abordagem interdisciplinar para os serviços de saúde bucal**. São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica Ltda, 2008. cap.18, p.219-238.

BRANDT, O.; MILDNER, M.; EGGER, A.E.; GROESSL, M.; RIX, U.; POSCH, M., *et al.* Nanoscale silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. **Nanomedicine**, v.8, n.4, p. 478–488, 2012.

CARVALHO, F.G; FUCIO, S.B.P.; SINHORETI, M.A.C.; CORRER-SOBRINHO, L; PUPPIN-RONTANI, R.M. Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. **Brazilian Dental Journal**, [S. l.], p.139-144, 2008.

CASTILHO, A.R.F.; ROSALEN, P.L.; ARAÚJO, I.J.S.; KITAGAWA, IL; COSTA, C.A.G.A.; JANAL, M.N., *et al.* Trans, trans-farnesol, an antimicrobial natural compound, improves glass ionomer cement properties. **PLOS ONE**, [S. l.], p.1-16, 2019.

CHENG, H.; LI, Y.; HUO, K.; GAO, B.; XIONG, W. Long-lasting in vivo and in vitro antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research A.**, v.102, n.10, p.3488-3499, 2013.

CORRÊA, L.G.P.; OGASAWARA, T. Comparative study of some conventional glass-ionomer cements. **Matéria**, [S. l.], v.11, n.3, p.297-305, 2006.

CUI, T.; LUO, W.; XU, L.; YANG, B.; ZHAO, W.; CANG, H. Progress of Antimicrobial Discovery Against the Major Cariogenic Pathogen *Streptococcus mutans*. **Current Issues in Molecular Biology**, [S. l.], v.32, p.601-644, 2019.

DA SILVA, R.J.; DE QUEIROZ, M.S.; DE FRANÇA, T.R.T.; DA SILVA, C.H.V.; BEATRICE, L.C.S. Glass ionomer cements properties: a systematic Review. **Scientific-Clinical Odontology**, [S. l.], v.9, n.2, p.125-129, 2010.

DE CAMPOS, M.R.; BOTELHO, A.L.; DOS REIS, A.C. Nanostructured silver vanadate decorated with silver particles and their applicability in dental materials: A scope review. **Heliyon**, [S. l.], v.7, n.6, p.0-6, 2021.

DE CASTRO, D.T. **Análise das propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas de uma resina acrílica odontológica sintetizada por diferentes métodos**. 2017. p. 137. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, [S. l.], 2017.

DE CASTRO, D.T. **Efeito da Incorporação de vanadato de prata nanoestruturado na atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia de resinas acrílicas**. 2014. p. 119. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, [S. l.], 2014.

DE CASTRO, D.T.; KREVE, S.; OLIVEIRA V.C.; ALVES, O.L.; REIS, A.C. Development of an impression material with antimicrobial properties for dental application. **Journal of Prosthodontics**, v. 28, n. 8, p. 906-912, 2019.

DE CASTRO, D.T.; TEIXEIRA, A.B.V.; NASCIMENTO, C.; ALVES O.L.; SANTOS, E.S.; AGNELLI J.A.M., *et al.* Comparison of oral microbiome profile of polymers modified with silver and vanadium base nanomaterial by next-generation sequencing. **Odontology**, v.109, n.3, p.605-614, 2021.

DIAS, A.G.A.; MAGNO, M.B.; DELBEM, A.C.B.; CUNHA, R.F.; MAIA, L.C.; PESSAN, J.P. Clinical performance of glass ionomer cement and composite resin in Class II restorations in primary teeth: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, [S. l.], p. 1-13, 2018.

DOS SANTOS, M.M.P.R.; MATHIAS, I.F.; DINIZ, M.B.; BRESCIANI, E. Evaluation of surface hardness of glass ionomer reinforced cements by carbon nanotubes. **Revista de Odontologia da UNESP**, [S. l.], v.44, n.2, p.108-112, 2015.

DOS SANTOS, V.E.; VASCONCELOS FILHO, A.; TARGINO, A.G.R.; FLORES, M.A.P.; GALEMBECK, A.; CALDAS, A.F., *et al.* A new "silver-bullet" to treat caries in children-nano silver fluoride: a randomised clinical trial. **Journal of Dentistry**, v.42, n.8, p.945-951, 2014.

DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; SEABRA, A.B. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: An overview and comments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, n.15, p.6555-6570, 2016.

DUTRA-CORREA, M.; LEITE, A.A.B.V.; DE CARA, S.P.H.M.; DINIZ, I.M.A.; MARQUES, M.M.; SUFFREDINI, I.B., *et al.* Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. **Journal of Dentistry**, [S. l.], v.77, p.66-71, 2018.

ENDRES, C.R. **Bruxism: A Public Health Problem**. 2021. p. 167. Dissertação (Mestre em Sociedade, Risco e Saúde) - Universidade de Lisboa, [S. l.], 2021.

FATTAH, Z.; JOWKAR, Z.; REZAEIAN, S. Microshear Bond Strength of Nanoparticle-Incorporated Conventional and Resin-Modified Glass Ionomer to Caries-Affected Dentin. **International Journal of Dentistry**, v. 2021, 2021.

FAYAZ, A.M.; BALAJI, K.; GIRILAL, M.; YADAV, R.; KALAICHELVAN, P.T.; VENKETESAN, R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine**, v.6, n.1, p.103–109, 2010.

FERNANDEZ, C.C.; SOKOLONSKI, A.R.; FONSECA, M.S.; STANISIC, D.; ARAÚJO, D.B.; AZEVEDO, V., *et al.* Applications of Silver Nanoparticles in Dentistry: Advances and Technological Innovation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v.22, n.5, p.1-21, 2021.

FORSS, H.; WIDSTRÖM, E. Razões para a terapia restauradora e a longevidade das restaurações em adultos. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.62, n.2, p.82-86, 2004.

FRICKER, J.P. Therapeutic properties of glass-ionomer cements: Their application to orthodontic treatment. **Australian Dental Journal**, [S. l.], 2021.

GARCIA, P.P.N.S.; CARDIA, M.F.B.; FRANCISCONI, R.S.; DOVIGO, L.N.; SPOLIDÓRIO, D.M.P.; RASTILLI, A.N.S., *et al.* Antibacterial activity of glass ionomer cement modified by zinc oxide nanoparticles. **Microscopy Research and Technique**, [S. l.], v.80, n.5, p.456-461, 2016.

GENARO, L.E.; ANOVAZZI, G.; HEBLING, J.; ZUANON, A.C.C. Glass Ionomer Cement Modified by Resin with Incorporation of Nanohydroxyapatite: In Vitro Evaluation of Physical-Biological Properties. **Nanomaterials**, [S. l.], v.10, n.7, p.1-12, 2020.

GODOY-GALLARDO, M.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.G.; DELGADO, L.M.; MANERO, J. M.; JAVIER GIL, F.; RODRÍGUEZ, D. Silver deposition on titanium surface by electrochemical anodizing process reduces bacterial adhesion of *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus salivarius*. **Clinical Oral Implants Research**, v.26, n.10, p.1170-1179, 2015.

HOLTZ, R.D.; LIMA, B.A.; SOUZA FILHO, A.G.; BROCCHI, M.; ALVES, O.L. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. **Nanomedicine**, v.8, n.6, p.935–940, 2012.

HOLTZ, R.D.; SOUZA FILHO, A.G.; BROCCHI, M.; MARTINS, D.; DURÁN, N.; ALVES, O. L. Development of nanostructured silver vanadates decorated with silver nanoparticles as a novel antibacterial agent. **Nanotechnology**, v.21, n.18, p.1-8, 2010.

INBAKANDAN, D.; KUMAR, C.; BAVANILATHA, M.; RAVINDRA, D. N.; KIRUBAGARAN, R.; KHAN, S. A. Ultrasonic-assisted green synthesis of flower like silver nanocolloids using marine sponge extract and its effect on oral biofilm bacteria and oral cancer cell lines. **Microbial Pathogenesis**, v.99, p.135-141, 2016.

JIA, Z.; XIU, P.; LI, M.; XU, X.; SHI, Y.; CHENG, Y., *et al.* Bioinspired anchoring AgNPs onto micro-nanoporous TiO₂ orthopedic coatings: Trap-killing of bacteria, surface-regulated osteoblast functions and host responses. **Biomaterials**, v.75, p.203-222, 2016.

KANTOVITZ, K. R.; FERNANDES, F. P.; FEITOSA, I. V.; LAZZARINI, M. O.; DENUCCI, G. C.; GOMES, O. P., *et al.* TiO₂ nanotubes improve physico-mechanical properties of glass ionomer cement. **Dental Materials**, v.36, n.3, p.e85-e92, 2020.

KENT, B.E.; LEWIS, B.G.; WILSON, A.D. The properties of a glass ionomer cement. **British Dental Journal**, [S. l.], v.135, n.7, p.322-326, 1973.

KHURANA, C.; VALA, A.K.; ANDHARIYA, N.; PANDEY, O.P.; CHUDASAMA, B. Antibacterial activity of silver: The role of hydrodynamic particle size at nanoscale. **Journal of Biomedical Materials Research A.**, v.102, n.10, p.3361-3368, 2013.

KUMAR, V.; JOLIVALT, C.; PULPYTEL, J.; JAFARI, R.; AREFI-KHONSARI, F. Development of silver nanoparticle loaded antibacterial polymer mesh using plasma polymerization process. **Journal of Biomedical Materials Research A.**, v.101A, n.4, p.1121-1132, 2013.

KUMARI, M.; SHUKLA, S.; PANDEY, S.; GIRI, V.P.; BHATIA, A.; TRIPATHI, T., *et al.* Enhanced cellular internalization: A bactericidal mechanism more relative to biogenic nanoparticles than chemical counterparts. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.9, n.5, p.4519-4533, 2017.

KRÄMER, N.; SCHMIDT, M.; LÜCKER, S.; DOMANN, E.; FRANKENBERGER, R. Glass ionomer cement inhibits secondary caries in an in vitro biofilm model. **Clinical Oral Investigations**, [S. l.], v.22, n.2, p.1019-1031, 2017.

KRETH, J.; KIM, D.; NGUYEN, M.; HSIAO, G.; MITO, R.; KANG, M.K., *et al.* The antimicrobial effect of silver ion impregnation into endodontic sealer against *Streptococcus mutans*. **The Open Dentistry Journal**, v.2, n.1, p.18-23, 2008.

LEE, S.H.; JUN, B. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v.20, n.4, p.1-23, 2019.

LOPES, C.M.C.F.; GALVAN, J.; CHIBINSKI, A.C.R.; WAMBIER, D.S. Fluoride release and surface roughness of a new glass ionomer cement: glass carbomer. **Revista de Odontologia Da UNESP**, [S. l.], v.47, n.1, p.1-6, 2018.

LOYOLA-RODRIGUEZ, J.P.; GARCIA-GODOY, F.; LINDQUIST, R. Growth inhibition of glass ionomer cements on mutans streptococci. **Pediatrc Dental Journal**, v.16, n.5, p.346-349, 1994.

MAGALHÃES, A.P.R.; MENEZES-SILVA, R.; BUENO, L.S.; LEAL, S.C.; PASCOTTO, R.C.; NAVARRO, M.F.L., *et al.* Resistência à Compressão e à Tração Diametral de Diferentes Marcas de Cimentos de Ionômero. **Journal of Health Sciences**, [S. l.], v.19, n.5, p.121, 2017.

MAKVANDI, P.; JAMALEDIN, R.; JABBARI M.; NIKFARJAM, N.; BORZACCHIELLO, A. Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic review. **Dental Materials**, v.34, p.851-867, 2018.

MATHUR, V.P.; DHILLON, J.K. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. **Indian Journal of Pediatrics**, [S. l.], v.85, n.3, p.202-206, 2018.

MCEVOY, B.; ROWAN, N.J. Terminal sterilization of medical devices using vaporized hydrogen peroxide: a review of current methods and emerging opportunities. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v.127, n.5, p.1403-1420, 2019.

MOHANTY, S.; MISHRA, S.; JENA, P.; JACOB, B.; SARKAR, B.; SONAWANE, A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v.8, n.6, p.916-924, 2012.

NANDA, A.; SARAVANAN, M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. **Nanomedicine**, v.5, n.4, p.452-546, 2009.

NISKA, K.; KNAP, N.; KĘDZIA, A.; JASKIEWICZ, M.; KAMYSZ, W.; INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. Capping agent-dependent toxicity and antimicrobial activity of silver nanoparticles: An in vitro study. Concerns about potential application in dental practice. **International Journal of Medical Sciences**, v.13, n.10, p.772-782, 2016.

NORONHA, V.T.; PAULA, A. J.; DURÁN, G.; GALEMBECK, A.; COGO-MÜLLER, K.; FRANZ-MONTAN, M., *et al.* Silver nanoparticles in dentistry. **Dental Materials**, v.33, n.10, p.1110-1126, 2017.

PADOVANI, G.C.; FEITOSA, V. P.; SAURO, S.; TAY, F. R.; DURÁN, G.; PAULA, A. J., *et al.* Advances in dental materials through nanotechnology: Facts, perspectives and toxicological aspects. **Trends in Biotechnology**, v.33, n.11, p. 621-636, 2015.

PAIVA, L.; FIDALGO, T.K.S.; COSTA, L.P.; MAIA, L.C.; BALAN, L.; ANSELME, K., *et al.* Antibacterial properties and compressive strength of new one-step preparation silver nanoparticles in glass ionomer cements (NanoAg-GIC). **Journal of Dentistry**, [S. l.], v.69, p.102-109, 2018.

PALMER, G.; JONES, F.H.; BILLINGTON, R.W.; PEARSON, G.J. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. **Biomaterials**, v.25, n.23, p.5423–5431, 2004.

PENDRYS, D.G. Resin-Modified Glass-Ionomer Cement (RM-GIC) may Provide Greater Caries Preventive Effect Compared with Composite Resin, but High-Quality Studies are Needed. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, [S. l.], v.11, n.4, p.180-182, 2011.

PRABHU, S.; POULOSE, E.K. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v.2, n.1, p.1-10, 2012.

RADZIG, M.A.; NADTOCHENKO, V. A.; KOKSHAROVA, O. A.; KIWI, J.; LIPASOVA, V. A.; KHMEL, I. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.102, p.300-306, 2013.

RAFFI, M.; HUSSAIN, F.; BHATTI, T.M.; AKHTER, J.I.; HAMEED, A.; HASAN, M.M. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against E. coli ATCC-15224. **Journal of Materials Science and Technology**, v.24, n.2, p.192-196, 2008.

RAO, A; RAO, A; SUDHA, P. Fluoride rechargability of a non-resin auto-cured glass ionomer cement from a fluoridated dentifrice: an in vitro study. **J Indian Soc Pedod Prev Dent**, [S. l.], v.29, n.3, p.202-204, 2011.

SOUZA, M.I.A.V.; AZEVEDO, E.R.; SANTOS-PINTO, L.A.M.; ZUANON, Â.C.C. Resistência à tração diametral de cimentos de ionômero de vidro submetidos à aplicação de ondas de ultrassom. **Revista de Odontologia da Unesp**, [S. l.], v.42, n.3, p.172-175, 2013.

SILVA, F.W.G.P.; DE QUEIROZ, A.M.; DE FREITAS, A.C.; ASSED, S. Glass Ionomer cement in pediatric dentistry. **Scientific-Clinical Odontology**, [S. l.], v.10, n.1, p.13-17, 2011.

TAKAMIYA, A.S.; MONTEIRO, D.R.; GORUP, L.F.; SILVA, E.A.; DE CAMARGO, E.R.; GOMES-FILHO, J. E., *et al.* Biocompatible silver nanoparticles incorporated in acrylic resin for dental application inhibit *Candida albicans* biofilm. **Materials Science and Engineering: C**, [S. l.], v.118, p.1-8, 2021.

TANG, S.; ZHENG, J. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v.7, n.13, p.1-10, 2018.

TAMAYO, L.; PALZA, H.; BEJARANO, J.; ZAPATA, P. A. Polymer composites with metal nanoparticles: synthesis, properties, and applications. In: **Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles**. Elsevier, p.249-286, 2019.

TEIXEIRA, A.B.V.; MOREIRA, N.C.S.; TAKAHASHI, C.S.; SCHIAVON, M.A.; ALVES, O.L.; REIS, A.C. Cytotoxic and genotoxic effects in human gingival fibroblast and ions release of endodontic sealers incorporated with nanostructured silver vanadate. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.109, n.9, p.1380-1388, 2021.

THURNHEER, T.; BELIBASAKIS, G.N. Effect of sodium fluoride on oral biofilm microbiota and enamel demineralization. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v.89, p.77-83, 2020.

TIAN, B.; CHEN, W.; DONG, Y.; MARYMONT, J.V.; LEI, Y.; KE, Q., *et al.* Silver nanoparticle-loaded hydroxyapatite coating: structure, antibacterial properties, and capacity for osteogenic induction in vitro. **RSC Advances**, v.6, n.11, p.8549-8562, 2016.

TÜZÜNER, T.; DIMKOV, A.; NICHOLSON, J.W. The effect of antimicrobial additives on the properties of dental glass-ionomer cements: a review. **Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica**, [S. l.], v.5, n.1, p.9-21, 2019.

UNEMO, M.; NICHOLAS, R.A. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. **Future Microbiol**, [S. l.], v.7, n.12, p.1401-1422, 2012.

WENG, Y.; GUO, X.; GREGORY, R.; XIE, D. A novel antibacterial dental glass-ionomer cement. **European Journal of Oral Sciences**. v.118, n.5, p.531-534, 2010.

WILSON, A.D.; KENT, B.E. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. **British Dental Journal**, [S. l.], v.132, n.4, p.133-135, 1972.

World Health Organization: Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis, 2017.

XIE, D.; WENG, Y.; GUO, X.; ZHAO, J.; GREGORY, R.L.; ZHENG, C. Preparação e avaliação de um novo cimento de ionômero de vidro com funções antibacterianas. **Dental Materials**, v.27, n.5, p.487-496, 2011.

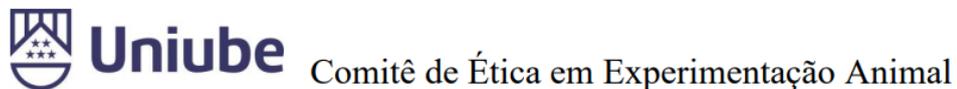
YESILYURT, C.; ER, K.; TASDEMIR, T.; BURUK, K.; CELIK, D. Antibacterial activity and físicas properties of glass-ionomer cements contain antibiotics. **Operative Dentistry**, v.34, n.1, p.18-23, 2009.

YIN, I.X.; ZHANG, J.; ZHAO, I.S.; MEI, M.L.; LI, Q.; CHU, C.H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v.15, p.2555-2562, 2020.

ZHANG, Y.; CHEN, Y.; HUANG, L.; CHAI, Z.; SHEN, L.; XIAO, Y. The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified Poly-methyl methacrylate-based dental resin. **Scientific Reports**, [S. l.], v.7, n.1, p.1-13, 2017.

ZOHURIAAN-MEHR, M.J; KABIRI, K. Superabsorbent polymer materials: a review. **Iranian Polymer Journal**, v.17, n.6, p.451-477, 2008.

ANEXO



Ofício CEEA-002/2021

Uberaba, 08 de abril de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 002/2021 relativo ao projeto intitulado “**Análise das propriedades mecânicas e biológicas de cimentos de ionômero de vidro modificados com vanadato de prata nanoestruturado**” que tem como responsável a **Profª. Dr. Denise Tornavoi de Castro**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 002/2021 related to the project entitled “**Analysis of the mechanical and biological properties of glass ionomer cements modified with nanostructured silver vanadate**”, under the supervision of **Profª. Dr. Denise Tornavoi de Castro**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,



Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE