

## AValiação DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE UM ADESIVO EXPERIMENTAL COM ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA, POR MEIO DA TÉCNICA DE CRESCIMENTO DO BIOFILME

Marina Struncova Fernandes<sup>1\*</sup>, Igor Studart Medeiros<sup>2</sup>, Koiti Araki<sup>3</sup>, Sérgio Hiroshi Toma<sup>3</sup>, Ivana Barbosa Suffredini<sup>4</sup>, Maristela Dutra-Correa<sup>5</sup>

1. Estudante de IC de Odontologia da Universidade Paulista – UNIP
2. Depto. De Biomateriais e Biologia Oral – FOUSP
3. Grupo de Nanotecnologia Supramolecular do Instituto de Química da USP
4. Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade do Laboratório de Extração - UNIP
5. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – UNIP / Orientadora

### Resumo:

O efeito antimicrobiano de *primers* e adesivos com nanopartículas de prata (NanoAg) foi avaliado. As NanoAg foram incorporadas ao *primer* e ao adesivo Scotchbond Multi-Purpose-SBMP com 50, 100, 150, 200 e 250ppm e estabilizadas com PVAET ou PVA. Com o PVA só foi possível incorporar as NanoAg no *primer*. Os espécimes foram confeccionados com uma matriz de teflon, esterilizados (Óxido de Etileno) e submetidos à técnica de crescimento do biofilme. Após o crescimento, foi realizada a leitura da absorbância (540nm). Os resultados do PVAET apresentaram normalidade e homocedasticidade ( $p=0,211$ ). A análise estatística (ANOVA/Dunnett) não demonstrou diferença entre os grupos, nem entre os grupos e o controle. Os resultados do PVA apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o SBMP e PVA 250ppm. As NanoAg estabilizadas pelo PVAET não foram suficientes para inibir o biofilme. Entretanto, os grupos PVAET 200/250ppm apresentaram tendência de redução, confirmada pelo grupo PVA 250ppm.

**Autorização legal:** Para o desenvolvimento desta pesquisa não foi necessária autorização legal.

**Palavras-chave:** Adesivos dentinários; Nanopartículas de prata; Biofilme.

**Apoio financeiro:** Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** Universidade Paulista - UNIP

### Introdução:

A atual busca pela estética trouxe a necessidade de se trabalhar com materiais

estéticos, uma vez que o sorriso branco tornou-se sinônimo de sucesso profissional e social. No entanto, a adesão dos biomateriais odontológicos aos tecidos duros dentais precisa ser investigada minuciosamente, uma vez que a interface entre o material restaurador e o dente é o ponto mais vulnerável da restauração.

A contração de polimerização dos compósitos restauradores e as forças mecânicas incidentes sobre o local restaurado podem comprometer e fragilizar a interface dente/biomaterial, em decorrência da formação de *gaps* que contribuem para o insucesso e falência da restauração (Carvalho *et al.*, 2012). Além disso, outros fatores podem contribuir negativamente sobre a restauração, como a hidrólise da matriz resinosa, a ação das metaloproteinases (MMPs) sobre o colágeno exposto e a contaminação por bactérias provenientes da infiltração marginal ou remanescentes da dentina cariada. (Kermanshahi *et al.*, 2010).

Dessa forma, com o intuito de minimizar falhas e a presença de bactérias após o preparo cavitário e sua consequente contaminação, autores (Ahn *et al.*, 2009) propuseram a adição de agentes antimicrobianos aos sistemas adesivos.

Recentemente, Ahn *et al.* (2009) sugeriram a adição de nanopartículas de prata em adesivos ortodônticos, com a finalidade de usufruir do mecanismo de ação antimicrobiana da prata, através do contato direto com as bactérias. Foi demonstrado que a incorporação de nanopartículas de prata promoveu efeito antimicrobiano aos adesivos, sem comprometimento das propriedades físicas do material (Ahn *et al.*, 2009).

Contudo, algumas dificuldades em relação à adição de nanopartículas de prata em biomateriais odontológicos são observadas, principalmente, quanto à

aglomeração das nanopartículas e heterogeneidade em sua distribuição (Curtis *et al.*, 2009).

Para minimizar essas dificuldades, Dutra-Correa *et al.* (2015) propuseram a síntese de nanopartículas de prata funcionalizadas diretamente no sistema adesivo.

A produção desses sistemas adesivos com NanoAg mostrou potencial antimicrobiano, uma vez que as NanoAg poderão ser associadas a outros materiais odontológicos, mantendo suas características físicas e químicas.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito antimicrobiano de *primers* e adesivos com Nanopartículas de Prata incorporadas, por meio do ensaio antimicrobiano pela técnica de crescimento do Biofilme.

### Metodologia:

Adesivos experimentais foram desenvolvidos em parceria da UNIP com a USP (FOUSP e IQ).

As nanopartículas de prata (NanoAg) foram incorporadas ao *primer* e adesivo do sistema adesivo comercial de 3 passos (SBMP-3M ESPE), com concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250ppm de NanoAg estabilizadas com PVAET e PVA. Entretanto, com o estabilizante PVA só foi possível a inclusão das NanoAg ao *primer*. O SBMP sem NanoAg foi o Controle.

Os efeitos antimicrobianos foram avaliados pela técnica de crescimento do Biofilme com *Streptococcus mutans* ATCC 25175™ (American Type Culture Collection – ATCC®, Microbiologicals, St. Cloud, MN, USA).

### Cultura de bactérias

Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis.

### Preparo do meio - Brain Heart Infusion (BHI)

O BHI (Oxoid®, Hampshire, United Kingdom) foi preparado segundo indicações do fabricante, em frasco de vidro com tampa, após a pesagem do pó e adição de água destilada grau Milli-Q (Millipore®) dissolvido e esterilizado em autoclave.

### Preparação dos espécimes

Os espécimes (6/grupo) foram confeccionados em formato de disco, com auxílio de matriz de teflon, com dimensões de 5mm X 1mm.

O *primer* foi aplicado, seco com jato de ar (5s) e, na sequência, o adesivo foi aplicado e fotopolimerizado (10s). A resina composta foi

inserida em incremento único e fotopolimerizada (20s).

Após a preparação, os espécimes foram esterilizados com óxido de etileno. (Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

### Crescimento de biofilme

Esta técnica foi adaptada de Castilho *et al.* (2013) com microplacas de 24 poços (Costar, Tewksbury, USA).

No 1º dia, 1mL de BHI + sacarose (5%) foi inoculado com *S. mutans* com 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Desta suspensão 1mL foi adicionado aos poços, contendo os espécimes com a face do *primer* para cima.

As microplacas foram mantidas em estufa a 37°C/24h. No segundo dia, os meios + sacarose (1mL/poço) foram trocados sem mover os espécimes, que permaneceram por mais 24h/37°C.

Decorrido este período, os espécimes foram retirados e colocados em novas placas (24 poços) com 1mL de soro fisiológico, permanecendo em agitador (5min) para remover células mortas.

Os espécimes foram então removidos, e colocados em novas placas, nas quais foram adicionados 1mL de MTT 0,5mg/mL (Zhang *et al.*, 2012) em PBS (tampão fosfato-salino) e armazenadas em estufa 37°C/1h com 5% CO<sub>2</sub>.

Após esse período, os espécimes foram transferidos para novas placas e 1mL/poço de DMSO (Dimetilsulfóxido) foi adicionado, para solubilizar os cristais de formazano. As placas foram colocadas sobre um agitador (20min) em temperatura ambiente e em escuro.

Em seguida, 200µL da solução de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços para a leitura da absorbância (Leitor de Elisa - BioTek, EpochELx800, Sellex Inc., Washington DC, USA) com comprimento de onda de 540nm.

### Resultados e Discussão:

Para o PVAET, os dados apresentaram normalidade e homocedasticidade ( $p=0,211$ ). A Análise de Variância (ANOVA one-way) demonstrou que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p=0,083$ ). O teste de Dunnett não verificou diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais com o grupo controle SBMP ( $p>0,05$ ).

Os resultados do PVA apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos SBMP e PVA 250ppm ( $p>0,0767$ ).

De acordo com Thaweboon, S e

Thaweboon, B (2016), o efeito das NanoAg sobre a adesão de *S. mutans* à estrutura dental não foi efetivo, por outro lado, afirma que houve inibição no desenvolvimento do biofilme.

A grande vantagem das NanoAg é que elas podem ser aplicadas na área médica como controle antimicrobiano, pois são inibidores efetivos sobre diversos microrganismos (Kim *et al.*, 2007).

Quanto ao modo de ação, as micropartículas de prata agem pela liberação de íons (Sondi *et al.*, 2004), por outro lado, as NanoAg por contato.

### Conclusões:

As NanoAg incorporadas ao *primer* e adesivo do SBMP e estabilizadas pelo PVAET não foram suficientes para inibir o biofilme. Contudo, os grupos PVAET 200 e 250ppm apresentaram tendência na redução do biofilme. Por outro lado, o grupo PVA 250ppm confirmou esta tendência, uma vez que apresentou diferença estatisticamente significativa entre este grupo e o SBMP.

### Referências bibliográficas:

AHN, SJ. *et. al.* Experimental antimicrobial orthodontic adhesive using nanofillers and silver nanoparticles. Dent Mater 2009, v.25, p.206-13.

CARVALHO, RM. *et.al.* Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. Dent Mater 2012, v.28, p.72–86.

CASTILHO, AL. *et.al.* New trends in dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. Braz Oral Res 2013, v.27, n.2, p.109-15.

CURTIS, AR. *et.al.* The mechanical properties of nanofilled resin-based composites: characterizing discrete filler particles and agglomerates using a micromanipulation technique. Dent Mater 2009, v.25, n.2, p.180-87.

DUTRA-CORREA, M. *et.al.* Relatório Final de Pós-Doutorado / FOU SP 2015.

KERMANSHAHI, S. *et.al.* Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. J Dent Res 2010, v.89, n.9, p.996-1001.

KIM, JS. *et.al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology,

biology and medicine 2007, v.3, n.1, p.95-101.

SONDI, I; SONDI, BS. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 2004, v.275, n.1, p.177-182.

THAWEBOON, S; THAWEBOON B. Adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans* on dental sealant incorporated with silver-nanoparticle. In: Advanced Materials, Mechanical and Structural Engineering. Proceedings of the 2nd International Conference of Advanced Materials, Mechanical and Structural Engineering, (AMMSE 2015) Print ISBN: 978-1-138-02908-8. eBook ISBN: 978-1-315-64468-4. DOI: 10.1201/b19934-3

ZHANG, K. *et.al.* Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. Dent Mater 2012, v.28, p.842-852.

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 2013, v.41, n.5, p. 464-74.