

PROPRIEDADES FÍSICO-MECÂNICAS E ANTI-BIOFILME DE SELANTES AUTOADESIVOS MODIFICADOS COM MONÔMEROS METÁLICOS

ANDRESSA DA SILVA BARBOZA¹; ALEXANDRA RUBIN COCCO², CARLOS
ENRIQUE CUEVÁS SUAREZ³, EVANDRO PIVA⁴, GEELSU HWANG⁵, RAFAEL
GUERRA LUND⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
– andressahb@hotmail.com

²Faculdade de Odontologia CNEC Santo Angelo – alexandrarcocco@gmail.com

³ Autonomous University of Hidalgo State – carlosecsuarez@gmail.com

⁴PPGO, UFPel – evpiva@gmail.com

⁵Biofilm Research Lab, University of Pennsylvania - geelsuh@upenn.edu

⁶PPGO, UFPel – rafael.lund@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A formação de biofilme em materiais restauradores pode levar ao surgimento de lesões cariosas. Em especial, fóssulas e fissuras são os locais frequentemente afetados por cárie dentária devido à sua irregularidade estrutural e complexidade morfológica (LUIGI et al., 2018). Selantes de fóssulas e fissuras convencionais têm sido utilizados para impedir a invasão de microrganismos e o acúmulo de biofilme em pacientes com alto risco de cárie oclusal. No entanto, é necessário melhorar as propriedades dos selantes para simplificar os procedimentos clínicos ou evitar possíveis falhas, como o acúmulo de biofilme (PAPAGEORGIOU et al., 2017). Portanto, justifica-se a busca de agentes antibacterianos alternativos que possam inibir com maior eficácia a formação de biofilme e o seu acúmulo, impedindo a progressão de lesões de cárie nessas áreas.

Estudos demonstraram que monômeros metálicos reticulados, como metacrilato de zinco (ZM), di-n-butildimetacrilato-estanho (SN) e metacrilato de prata (AG), em uma formulação adesiva dental exibem atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* (HENN et al. 2011; COCCO et al. 2017). Estudos prévios já haviam demonstrado também que compostos organo-estânicos têm efeito antimicrobiano ((DYLAG et al. 2010; SALAM et al. 2012)). No entanto, estes monômeros metálicos ainda não foram testados quanto à incorporação em um selante de fóssulas e fissuras. Além disso, carecem estudos que avaliem o efeito anti-biofilme destes materiais em modelos multiespécies de bactérias e fungos. Logo, o objetivo deste estudo consiste na formulação e avaliação biológica de um selante de fóssulas e fissuras à base de resina autoadesiva, potencialmente antimicrobiana, contendo metacrilato de zinco (ZnM) ou di-n-butildimetacrilato-estanho (SnM), de acordo com a ISO 6874-2015.

2. METODOLOGIA

Para a formulação dos selantes experimentais à base de resina autoadesiva foi utilizado monômero ácido e outros monômeros com sílica nanométrica. Metacrilato de zinco ou di-n-butil-dimetacrilato-estanho (Gute Chemie, Karlsruhe, Alemanha) foram adicionados em duas concentrações nas formulações dando origem a quatro grupos experimentais: ZnM 2,5%; ZnM 5%; SnM 2,5%; SnM 5%. Uma composição sem a incorporação de monômeros metálicos foi testada como controle. O grau de conversão foi avaliado utilizando espectroscopia de infravermelho transformada por Fourier (Prestige21; Shimadzu,

Tóquio, Japão) equipado com um dispositivo de refletância total atenuado ($n=3$). Para o teste de resistência de união ao microcislamento (μ SBS), as amostras foram posicionadas em uma máquina de teste universal e submetidas ao teste μ SBS, com os resultados expressos em Mpa ($n=10$).

Para os ensaios de modelos de biofilme monocultura e multiespécies, foram utilizados *Streptococcus mutans* UA159, *S. oralis* ATCC 35307 e *Candida albicans* SC5314 em ambiente de microaerofilia (5% de CO₂) e a 37°C. Para os modelos de biofilme de espécies mistas, apenas o selante SnM a 5% foi testado, pois apresentou a maior eficácia contra o ensaio de monocultura de biofilme de *S. mutans*. Ao final dos períodos experimentais (44-91h), os biofilmes foram analisados quanto à biomassa (peso seco) e viabilidade bacteriana (unidades formadoras de colônias, UFC).

Para o ensaio de citotoxicidade, fibroblastos de camundongo L929 foram mantidos em DMEM e incubados a 37°C e em ambiente de 5% de CO₂, em placas de 96 poços por 24h ($n=6$). A absorvância a 450 nm foi medida através de um leitor de microplacas (SpectraMax M5; Molecular Devices, Sunnyvale, CA), e este ensaio foi realizado duas vezes. Os ensaios de lixiviação foram realizados após 24h, 7 e 14 dias utilizando espectrometria de massa plasmática indutivamente acoplada (ICP-MS). Selantes contendo 5% de SnM foram escolhidos devido aos seus melhores resultados obtidos. A análise estatística foi realizada utilizando o software IBM SPSS Statistics 20, ANOVA e post hoc de Tukey. O teste t de Student foi aplicado para analisar o Sn lixiviado. Os resultados biológicos foram analisados através do teste T. As diferenças estatísticas foram consideradas considerando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Materiais autoadesivos representam um conceito atraente para materiais dentários, em especial na odontopediatria, uma vez que o protocolo não requer pré-tratamento das superfícies dentárias. Logo, representa uma técnica menos demorada. Neste estudo, os selantes autoadesivos de fossas e fissuras foram preparados com sucesso e a incorporação de monômeros de ZnM ou SnM não afetou suas propriedades físicas e mecânicas (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades mecânicas do selante experimental à base de resina auto-adesiva

Grupos	Resistência flexural (MPa)	Grau de conversão (%)
Controle	56,53 (± 11) ^a	50,24 (8,7) ^a
Sn 2,5%	49,98 (± 12) ^a	58,77 (1) ^a
Sn 5%	59,24 (± 16) ^a	57,16 (2,1) ^a
Zn 2,5%	48,71 (± 15) ^a	55,60 (0,7) ^a
Zn 5 %	61,21 (± 7) ^a	59,91 (1,86) ^a

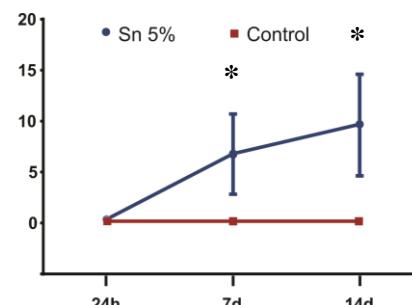


Figura 1. Liberação de estanho dos materiais experimentais controle e Sn5%.

Além disso, a inclusão de monômeros de metacrilatos metálicos funcionalizados capazes de copolimerizar em um material compósito ativado por luz pode representar uma estratégia de desenvolvimento para obter um material que promova uma atividade antimicrobiana de longo prazo (CHENG et al., 2013). No entanto, os ensaios de lixiviação mostraram que houve lixiviação de Sn do selante após 7 dias. Entretanto, quando comparada a concentração de Sn lixiviado do selante após 7 dias e 14 dias, as médias não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 1). Como as concentrações de Sn representam

uma forma de lixiviação de polímeros em forma de metal, pode-se hipotetizar que o efeito antibiofilme possa ocorrer não apenas pelo contato com o material, mas também pela estrutura do biofilme ligada ao material (RUYTER, 1995).

Embora a adição de metacrilatos de Zn e Sn não melhore as propriedades físicas, químicas e mecânicas, o metacrilato de Sn fornece um efeito protetor antibiofilme, reduzindo o peso seco de biofilme obtido nos modelos de espécies únicas e de espécies mistas. Além disso, o selante contendo Sn 5% apresentou valores mais altos de pH, estatisticamente diferentes do controle ($p < 0,05$) (Tabela 2). O modo de ação dos compostos Sn foi descrito em termos de ligação de hidrogênio com os centros ativos dos constituintes celulares, resultando em uma interferência nos processos celulares normais (BAUL, 2008). No entanto, como o Sn 5% inibiu o crescimento de microrganismos, pode-se supor que a produção de enzima microbiana esteja sendo afetada; portanto, os microrganismos são menos capazes de metabolizar nutrientes (BAUL, 2008).

Tabela 2 – Média e desvio padrão do pH e peso seco nos ensaios de formação de biofilme

Grupos (n=4)	Espécies Isoladas						Espécies mistas			
	<i>S. mutans</i>		<i>S. oralis</i>		<i>C. albicans</i>		<i>S. mutans</i> e <i>S. oralis</i>		<i>S. mutans</i> e <i>C. albicans</i>	
	pH	Peso seco	pH	Peso seco	pH	Peso seco	pH	Peso seco	pH	Peso seco
Zn 2.5%	4,55 (±0,03) ^a	2,18 (±0,23) ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
Zn 5%	4,65 (±0,05) ^a	2,15 (±0,01) ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
Sn 2.5%	5,44 (±0,09) ^b	0,74 (±0,35) ^b	-	-	-	-	-	-	-	-
Sn 5%	6,68 (±1,06) ^c	0,31 (±0,04) ^c	6,5 (±0,4) ^a	0,1 (0,1) ^a	6,8 (±0,1) ^a	0,02 (±0,02) ^a	6,3 (±0,9) ^a	0,46 (±0,3) ^a	6,6 (0,3) ^a	0,41 (0,4) ^a
Controle	4,54 (±0,001) ^a	2,11 (±0,43) ^a	5,7 (0,9) ^b	1,0 (0,4) ^b	6,8 (±0,1) ^a	0,65 (±0,1) ^b	5,0 (±0,7) ^b	3,9 (±0,7) ^b	4,4 (0,1) ^b	2,64 (0,7) ^b

Letras minúsculas semelhantes nas colunas indicam diferenças não significativas entre os materiais experimentais ($p < 0,05$).

Além disso, é importante enfatizar que os selantes de fissuras e fissuras autoadesivos preparados por nosso grupo de pesquisa não mostraram efeito citotóxico contra fibroblastos (Figura 2). Outros estudos também encontraram os mesmos resultados quando da adição de metacrilato de Sn 1% (COCCO et al., 2017) e metacrilato de Zn 5% em sistemas adesivos (HENN et al., 2011). No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar os efeitos de nossos materiais experimentais em outras linhas celulares, como fibroblastos gengivais humanos, fibroblastos de polpa dentária/células-tronco e células epiteliais gengivais.

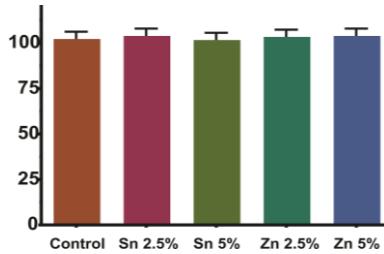


Figura 3. Citocompatibilidade dos materiais experimentais após 24h de exposição celular.

4. CONCLUSÕES

Todos os materiais apresentaram propriedades químicas, físicas e mecânicas satisfatórias com relação a ISO 6874-2015. Os selantes autoadesivos

de fóssulas e fissuras modificados com Sn 5% demonstraram efeitos antibacteriano e antifúngico nos modelos de biofilme de espécies únicas e mistas. Sn 5% pode representar um agente potencial para prevenir a formação dos principais biofilmes que causam a doença cárie dentária.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUL, T.S.B. Antimicrobial activity of organotin(iv) compounds: A review. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 22, p. 195–204, 2008.
- CHENG, L.; WEIR, M.D.; ZHANG, K.; AROLA, D.D.; ZHOU, X.; XU, H.H. Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. **Journal Dentistry**, v. 41, n. 4, p. 345-355, 2013.
- COCCO, A.R.; DA ROSA, W.L.O.; PERALTA, S.L.; MASKE, T.T.; DA SILVA, A.F.; HARTWIG, A.C.; MESKO, M.F.; PIVA, E.; LUND, R.G. New adhesive system based in metals cross-linking methacrylate. **Journal Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 77, p. 519-526, 2017.
- DYLAG, M.; PRUCHNIK, H.; PRUCHNIK, F.; MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; ULASZEWSKI, S. Antifungal activity of organotin compounds with functionalized carboxylates evaluated by the microdilution bioassay in vitro. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 373-383, 2010.
- HENN, S.; NEDEL, F.; DE CARVALHO, R.V.; LUND, R.G.; CENCI, M.S.; PEREIRA-CENCI, T.; DEMARCO, F.F.; PIVA, E. Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 22, n. 8, p. 1797-1802, 2011.
- ISO 6874 - 2015. **Dentistry — polymer-based pit and fissure sealants**. ISO (the international organization for standardization), 2015.
- PAGLIA, L.; FERRAZANO, G.; BERETTA, M. **The role of pit and fissure sealants in the prevention of dental caries**. In: Pit and Fissure Sealants Springer, Cham. (pp. 35-50), 2018.
- PAPAGEORGIOU, S.N.; DIMITRAKI, D.; KOTSANOS, N.; BEKES, K.; VAN WAES, H. Performance of pit and fissure sealants according to tooth characteristics: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v. 66, p. 8-17, 2017.
- RUYTER, I.E. Physical and chemical aspects related to substances released from polymer materials in an aqueous environment. **Advanced Dental Research**, v. 9, p. 334, 1995.
- SALAM, M.A.; AFFAN, M.A.; SAHA, R.; AHMAD, F.B.; SAM., N. Synthesis, characterization and in vitro antibacterial studies of organotin(iv) complexes with 2-hydroxyacetophenone-2-methylphenylthiosemicarbazone (h(2)dampt). **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2012:698491, 2012.