

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FLÁVIA DE BRITO PEDROSO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ADESIVO ODONTOLÓGICO INOVADOR  
CONTENDO CLORETO DE 3-N-PROPILPIRIDÍNIO SILSESQUIOXANO

PONTA GROSSA

2022

FLÁVIA DE BRITO PEDROSO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ADESIVO ODONTOLÓGICO INOVADOR  
CONTENDO CLORETO DE 3-N-PROPILPIRIDÍNIO SILSESQUIOXANO

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio  
Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago e Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara (*in memoriam*)

PONTA GROSSA

2022

P372                      Pedroso, Flávia de Brito  
Desenvolvimento e avaliação de adesivo odontológico inovador contendo cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano: / Flávia de Brito Pedroso. Ponta Grossa, 2022.  
68 f.

Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Dourado Loguercio.  
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.  
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara.

1. Cobre. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Sistemas adesivos. I. Loguercio, Alessandro Dourado. II. Farago, Paulo Vitor. III. Fujiwara, Sérgio Toshio. IV. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos. V.T.

CDD: 615





Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas


ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 01/2022 DA DOUTORANDA **FLÁVIA DE BRITO PEDROSO**, REALIZADA NO DIA 1º DE AGOSTO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao primeiro dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, às 16h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência (<https://meet.google.com/ztd-cair-jrz>), sob a presidência do Professor Doutor Alessandro Dourado Loguercio, reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda **FLÁVIA DE BRITO PEDROSO**, na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituída pelo Professor Doutor Alessandro Dourado Loguercio (UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Mario Felipe Gutiérrez Reyes (Universidad de Los Andes/Chile), Marcia Fernanda de Rezende Siqueira (Universidade Sant'Ana/PR), Mona Lisa Simionatto Gomes (UNICESUMAR/PR) e Mackely Simionato (UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: **"DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ADESIVO ODONTOLÓGICO INOVADOR CONTENDO CLORETO DE 3-N-PROPILPIRIDÍNIO SILSESQUIOXANO"**. Encerrada a defesa, a banca considerou aprovado o trabalho, considerado como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

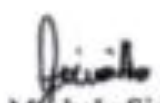
Observações (se necessário): \_\_\_\_\_ Alteração de título: sim  não

  
Alessandro Dourado Loguercio (UEPG/PR)  
Presidente

  
Mario Felipe Gutiérrez Reyes  
(Universidad de Los Andes (Chile))  
Titular

  
Marcia Fernanda de Rezende Siqueira  
(Universidade Sant'Ana/PR)  
Titular

  
Mona Lisa Simionatto Gomes  
(UNICESUMAR/PR)  
Titular

  
Mackely Simionato  
(UEPG/PR)  
Titular

Dedico este trabalho à vida...

Ao dia de hoje!

Ao momento presente!

Ele guarda todas as coisas que são  
verdadeiras para sempre!

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro, pela oportunidade concedida.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por estar aqui, pela paciência e disponibilidade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Sérgio Toshio Fujiwara (*In memoriam*), pela confiança depositada em mim desde o início da realização deste trabalho.

Aos professores membros das bancas de qualificação e defesa, por terem gentilmente aceitado o convite em participar deste momento tão importante e pelas contribuições prestadas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa por todo o conhecimento transmitido durante as disciplinas.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelas experiências e contribuições ao longo desta trajetória.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em especial aos alunos que integraram a “*Task Force One*”.

Aos funcionários e técnicos dos laboratórios, que sempre me atenderam com muito respeito e responsabilidade.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho. Pesquisa não se faz sozinho! Espero que ao longo desses anos, e do desenvolvimento deste trabalho, eu tenha podido expressar de forma adequada gratidão por toda a ajuda que recebi. Sei que todos os envolvidos fizeram o que estava dentro de suas possibilidades e não poderia ter sido diferente...

Muito obrigada!

“A ausência de esforço é vista como conformar-se com menos. Isso seria verdadeiro se aquilo que te esforças a alcançar tivesse valor. Esforçar-se intensamente por nada ainda significa não ter nada e terminar com nada. Contudo, o esforço deve ser distinguido da luta. Lutar por aquilo que tem valor... Isso nada tem a ver com o esforço.”

## RESUMO

Os avanços no conhecimento dos mecanismos envolvidos na adesão dos materiais resinosos ao substrato dentário exigem o desenvolvimento constante de novos produtos. O risco de recidiva de cárie pode ser aumentado por bactérias residuais sob a restauração, fato que permanece um desafio na Odontologia. O propósito do presente estudo foi investigar o efeito da incorporação do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ( $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ) e de sua molécula funcionalizada com íons cobre ( $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ ) em um sistema adesivo universal ambar. O  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  possui como uma de suas características principais a capacidade de adesão e filmogenia, além de uma potencial atividade antimicrobiana. A caracterização estrutural dos compostos foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e de ressonância magnética nuclear (RMN). Antes de sua incorporação ao adesivo foram realizados testes de suscetibilidade *in vitro* pelo método de disco difusão em ágar, e foi verificada a viabilidade celular pelo método colorimétrico de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)- 2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Adesivos experimentais com 0,5, 1,0 e 2,0% de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram desenvolvidos. Foi analisada a influência da incorporação dos compostos ao adesivo pela determinação do grau de conversão, utilizando espectroscopia de micro-Raman, e da resistência máxima à tração, utilizando sistema universal de ensaios - Instrom. A atividade antimicrobiana dos adesivos experimentais frente aos microorganismos *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* e *Candida albicans* foi avaliada. Foram utilizados dentes obtidos no Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa para aplicação dos sistemas adesivos à dentina e avaliação *in situ* do grau de conversão por espectroscopia de micro-Raman. Posteriormente, os dentes foram submetidos ao teste de resistência de união à microtração, verificação dos padrões de fratura na interface adesiva e avaliação da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a análise dos dados, foi utilizado o software GraphPad Prism 5. A atividade antimicrobiana e a reduzida citotoxicidade do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram confirmadas. Os adesivos experimentais mais concentrados (2,0 %) apresentaram maior grau de conversão em relação aos demais grupos testados e os valores de resistência máxima à tração foram estatisticamente semelhantes em todos os grupos. Foi confirmada a atividade antimicrobiana dos adesivos em todas as concentrações testadas.

**Palavras chave:** Cobre. Atividade antimicrobiana. Sistemas adesivos.



## ABSTRACT

Advances in knowledge of the mechanisms involved in the adhesion of resinous materials to the dental substrate need a constant development of new products. The risk of recurrence of caries may be increased by residual bacteria under restoration, a fact that remains a challenge in dentistry. The aim of the present study was to investigate the benefits of incorporating 3-n-propylpyridinium silsesquioxane chloride ( $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ) and its molecule functionalized with copper ions ( $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ ) in a universal adhesive system. The structural characterization of the compounds was performed by spectroscopy in the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR). The *in vitro* susceptibility tests of  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  and  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  were investigated by agar disc diffusion test and cell viability were performed using an [3-(4,5-dimethyliazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] colorimetric assay (MTT). Experimental adhesives with 0.5, 1.0 and 2.0% of  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  and  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  were developed. The influence of the incorporation of compounds into the adhesive system was determined by the degree of conversion, using micro-Raman spectroscopy, and the ultimate tensile strength, using the universal test system - Instron. The antimicrobial activity of experimental adhesives was tested against *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Teeth obtained from the Human Teeth Bank of the Universidade Estadual de Ponta Grossa were used for the application of adhesive systems to dentin and *in situ* evaluation of the degree of conversion by micro-Raman spectroscopy. Subsequently, the teeth were submitted to the microtensile bond strength test, verification of fracture patterns at the adhesive interface and evaluation of nanoleakage by scanning electron microscopy (SEM). The software Graphpad Prism 5.0 was used for the statistical analysis. An antimicrobial activity and reduced cytotoxicity of  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  were confirmed. There was no evidence of phase separation in the developed systems and there was no damage to their mechanical characteristics. The antimicrobial activity of the adhesives at all concentrations tested was confirmed.

**Key words:** Adhesive system. Antimicrobial activity. Copper.

## LISTA DE FIGURAS

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 -  | Fórmula estrutural do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano .....   | 24 |
| Figura 2 -  | Fluxograma ilustrativo das etapas da pesquisa .....   | 27 |
| Figura 3 -  | Procedimento geral e esquemático para o preparo de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano .....   | 28 |
| Figura 4 -  | Adesivo Ambar .....   | 32 |
| Figura 5 -  | Preparo dos corpos-de-prova .....   | 36 |
| Figura 6 -  | Protocolo resistência máxima a tração.....  | 36 |
| Figura 7 -  | Preparo da superfície da dentina.....   | 37 |
| Figura 8 -  | Aplicação dos sistemas adesivos e restauração dos dentes.....   | 39 |
| Figura 9 -  | Obtenção dos palitos dos dentes .....   | 40 |
| Figura 10 - | Sequência para o teste de microtração .....   | 41 |
| Figura 11 - | Espectro na região do infravermelho do $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ .....   | 43 |
| Figura 12 - | Espectro na região do infravermelho do $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .....   | 44 |
| Figura 13 - | Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ (VACP-MAS) de $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ e $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ .....                          | 45 |
| Figura 14 - | Espectros de RMN (DP-MAS) de $^{29}\text{Si}$ de $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ e $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ no estado sólido .....       | 46 |
| Figura 15 - | Resultados da viabilidade celular em Calu-3 e 3T3 após tratamento com o $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ ..... | 49 |
| Figura 16 - | Imagem das diferentes concentrações de $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ incorporadas ao adesivo .....          | 51 |
| Figura 17 - | Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina, obtidas em cada condição experimental, no tempo imediato.....                              | 59 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1 - Composição química do sistema adesivo ..... | 32 |
| Quadro 2 - Passo a passo do sistema adesivo .....      | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ das amostras de $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .....          | 46 |
| Tabela 2 - Deslocamento químico de RMN de $^{29}\text{Si}$ de $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .....                 | 47 |
| Tabela 3 - Resultados do teste de disco difusão em ágar do $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ .....   | 48 |
| Tabela 4 - Resultados do teste de disco difusão em ágar do $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .....   | 48 |
| Tabela 5 - Resultados do teste de disco difusão em ágar dos adesivos experimentais contendo $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ .....                                    | 51 |
| Tabela 6 - Resultados do teste de disco difusão em ágar dos adesivos experimentais contendo $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .....                | 52 |
| Tabela 7 - Grau de conversão obtido dos adesivos experimentais contendo $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ .....  | 53 |
| Tabela 8 - Grau de conversão obtido dos adesivos experimentais contendo $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .....                                    | 53 |
| Tabela 9 - Resistência máxima à tração dos grupos controle, $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ no tempo imediato ..... | 54 |
| Tabela 10 - Grau de conversão (GC, %) dos adesivos experimentais no tempo imediato .....  | 55 |
| Tabela 11 - Resistência de união à microtração dos adesivos experimentais .....   | 56 |
| Tabela 12 - Padrão de fratura da interface adesiva .....  | 57 |
| Tabela 13 - Nanoinfiltração obtida dos adesivos experimentais .....   | 58 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|       |   |
|-------|---|
| AAM   | Atividade antimicrobiana  |
| ANOVA | Análise de Variância, <i>Analysis of variance</i>               |
| B0    | Campo magnético estático forte                                  |
| COEP  | Comitê de Ética em Pesquisa                                     |
| CP    | controle positivo   |
| DMSO  | dimetilsulfóxido  |
| EROs  | espécies reativas de oxigênio                                   |
| FP    | falha prematura   |
| GC    | grau de conversão   |
| h     | hora  |
| IVTF  | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier     |
| KBr   | brometo de potássio   |
| kHz   | quilohertz  |
| LED   | diodo emissor de luz, <i>Light Emitting Diode</i>               |
| MAS   | rotação em torno do ângulo mágico, <i>Magic Angle Spinning</i>  |
| MDPB  | brometo de 1,2- metacrilóiloxidodecilpiridínio                  |
| MEV   | Microscopia Eletrônica de Varredura                             |
| MH    | ágar Mueller Hinton   |
| MHz   | mega Hertz  |
| mL    | mililitro   |
| MMP   | metaloproteinaases  |
| MPa   | mega pascal   |
| ms    | milissegundo  |
| MTT   | brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)- 2,5-difenil tetrazolium] |
| NIH   | National Institute of Health                                    |
| Nm    | nanômetros  |
| p     | valor de probabilidade  |
| pH    | potencial hidrogeniônico  |
| PPGO  | Programa de Pós-Graduação em Odontologia                        |
| ppm   | parte por milhão  |
| RMN   | Ressonância magnética nuclear                                   |
| RPM   | rotação por minuto  |

|  |  |
|--|--|
| s  | segundo  |
| SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>                                    | cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano              |
| [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> | cloreto 3-n-propilpiridínio silsesquioxano com íon Cu (II) |
| UEPG   | Universidade Estadual de Ponta Grossa                      |
| UFC  | unidade formadora de colônia                               |
| ZI   | zona de inibição   |
| α  | nível de significância                                     |
| μL   | microlitro   |
| μs   | microsegundo   |
| λ  | comprimento de onda  |
| °C   | Grau Celsius   |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 15 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 18 |
| 2.1      | GERAL.....  | 18 |
| 2.2      | ESPECÍFICOS .....   | 18 |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 19 |
| 3.1      | SISTEMAS ADESIVOS .....   | 19 |
| 3.1.1    | Sistemas adesivos antimicrobianos .....   | 21 |
| 3.2      | MECANISMOS DE ADESÃO DOS SILANOS .....  | 23 |
| 3.3      | CLORETO DE 3-N-PROPILPYRIDÍNIO SILSESQUIOXANO.....  | 24 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 26 |
| 4.1      | DESENHO EXPERIMENTAL.....   | 26 |
| 4.2      | SÍNTESE DO SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> .....  | 28 |
| 4.3      | FUNCIONALIZAÇÃO DO SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> COM ÍONS COBRE.....  | 28 |
| 4.4      | CARACTERIZAÇÃO DO SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> E DO [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> .....                                   | 29 |
| 4.4.1    | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – IVTF ( <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> - FTIR) .....                                     | 29 |
| 4.4.2    | Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN ( <i>Nuclear magnetic resonance</i> - NMR).....   | 29 |
| 4.5      | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> E DO [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> .....                            | 30 |
| 4.6      | TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DO SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> E DO [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> .....                     | 31 |
| 4.6.1    | Tratamento celular.....   | 31 |
| 4.6.2    | Viabilidade celular pelo teste de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT) ....   | 31 |
| 4.7      | INCORPORAÇÃO DO SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> E DO [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> AO SISTEMA ADESIVO.....                   | 32 |
| 4.7.1    | Avaliação da homogeneidade do adesivo.....  | 33 |
| 4.8      | TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> .....   | 33 |
| 4.8.1    | Avaliação da atividade antimicrobiana dos adesivos com SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> e [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> ..... | 33 |
| 4.9      | TESTES MECÂNICOS E GRAU DE CONVERSÃO.....   | 34 |
| 4.9.1    | Análise do grau de conversão dos sistemas adesivos <i>in vitro</i> .....  | 34 |
| 4.9.2    | Teste de resistência máxima à tração .....  | 35 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.10     | AVALIAÇÃO <i>IN SITU</i> .....   | 37        |
| 4.10.1   | Preparo dos dentes – aplicação do adesivo, restauração e obtenção dos palitos .....  | 37        |
| 4.10.2   | Análise do grau de conversão (GC) por espectroscopia em Micro-Raman .....  | 40        |
| 4.10.3   | Teste de resistência de união à microtração (RU) .....   | 41        |
| 4.10.4   | Análise de nanoinfiltração .....   | 42        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | <b>43</b> |
| 5.1      | CARACTERIZAÇÃO DO SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> E DO [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> .....  | 43        |
| 5.1.1    | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier .....  | 43        |
| 5.1.2    | Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....  | 44        |
| 5.2      | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> E DO [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> .....                              | 47        |
| 5.3      | TESTE DE VIABILIDADE CELULAR .....   | 49        |
| 5.4      | AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DO ADESIVO .....  | 50        |
| 5.5      | TESTES DE SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> .....  | 51        |
| 5.5.1    | Avaliação da atividade antimicrobiana dos adesivos contendo SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> e [Cu(SiPy <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup> ..... | 51        |
| 5.6      | TESTES MECÂNICOS E GRAU DE CONVERSÃO .....   | 52        |
| 5.6.1    | Análise do grau de conversão dos sistemas adesivos <i>in vitro</i> .....   | 52        |
| 5.6.2    | Teste de resistência máxima à tração .....   | 54        |
| 5.7      | AVALIAÇÕES <i>IN SITU</i> .....  | 55        |
| 5.7.1    | Grau de conversão .....  | 55        |
| 5.7.2    | Resistência de união à microtração (RU) .....  | 56        |
| 5.7.3    | Análise de Nanoinfiltração .....   | 57        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | <b>60</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>62</b> |



## 1 INTRODUÇÃO

Há um crescente interesse na pesquisa e desenvolvimento de produtos, de baixo custo e eficientes no impedimento da proliferação de bactérias e outros microorganismos, para fins de higiene e fins medicinais em têxteis, dispositivos, instrumentos cirúrgicos e produtos de uso odontológico. Alguns materiais, como os organossilicatos, podem ser desprovidos de efeitos nocivos e eventualmente encontrar aplicações notáveis. (CIRIMINNA *et al.*, 2013a).

O cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ( $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ) é um polímero solúvel em água e formador de filme. O  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  pode formar um filme fino estável em superfícies de substrato, como óxido de alumínio, fibras de celulose, gel de sílica e superfícies de vidro (ALFAYA e GUSHIKEM, 1999; FUJIWARA *et al.*, 2001). Este organossilicato também apresenta características adequadas de adesão e adsorção de íons, que proporcionam propriedades físico-químicas multifuncionais altamente desejáveis (CIRIMINNA *et al.*, 2013a).

Alguns estudos têm investigado seu uso como material adsorvente (MAGOSSO *et al.*, 2009) para preparação de eletrodos (ALFAYA *et al.*, 2000; MUXEL *et al.*, 2007) e sensores (FUJIWARA *et al.*, 2002). Além disso, o  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  pode sofrer alterações estruturais para a obtenção de compostos híbridos orgânico-inorgânicos, que desempenham um papel importante no fornecimento de uma plataforma química para a descoberta de novos materiais (CIRIMINNA *et al.*, 2013b).

Estudos recentes em microbiologia têm se concentrado no cobre e seu uso como íon antimicrobiano na assistência à saúde (ARENDSSEN, THAKAR, *et al.*, 2019). Íons metálicos, dentre eles cobre, prata, zinco e ouro, são de grande interesse na odontologia por suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas reconhecidas. Resultados promissores com o emprego do cobre têm sido demonstrados e, em comparação com a prata, além da fácil disponibilidade e do baixo custo (USMAN *et al.*, 2013), promove maior efeito antibacteriano (FOLEY e BLACKWELL, 2003).

O efeito antimicrobiano do cobre é bem conhecido por contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio e induzir a peroxidação lipídica nas membranas das bactérias (MATHEWS *et al.*, 2015). Adicionalmente, a ruptura de enzimas bacterianas e membranas celulares podem ser alcançadas por polímeros carregados positivamente, com menor suscetibilidade à resistência bacteriana e citotoxicidade (JIAO *et al.*, 2019). Logo, as propriedades antimicrobianas de amplo espectro de um novo composto híbrido orgânico-inorgânico contendo o organossilicato  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e o cobre parecem ser uma melhoria

inovadora na batalha contra infecções associadas aos cuidados de saúde (ARENDSSEN, VIG, *et al.*, 2019).

Os avanços no conhecimento dos mecanismos e dos fenômenos envolvidos na adesão dos materiais resinosos ao substrato dentário têm exigido o desenvolvimento constante de novos produtos, com o objetivo de melhorar suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas. Por muitos anos a principal falha na odontologia restauradora foi a adesão do material resinoso ao substrato dental. Essa deficiência acarretava, principalmente, em infiltração marginal e cárie secundária, fatores estes que reduziam o sucesso da restauração (DA SILVA LIMA *et al.*, 2021).

Neste sentido, alguns antimicrobianos livremente dispersos em sistemas adesivos, tais como antibióticos, fluoretos e glutaraldeído foram avaliados exaustivamente (BAPNA *et al.*, 1988; MOEN *et al.*, 2012). No entanto, estes agentes livremente dispersos podem favorecer a redução da resistência de união da restauração ao elemento dental (GURGAN *et al.*, 1999; MOEN *et al.*, 2012).

O risco de recidiva de cárie pode ser aumentado por bactérias residuais sob a restauração, fato este que permanece como um desafio na odontologia (MANHART, JUERGEN *et al.*, 2002; FEUERSTEIN, OSNAT *et al.*, 2007; WALTER *et al.*, 2007). A fim de evitar esta situação adversa, sistemas adesivos devem apresentar uma atividade antibacteriana para a inativação de bactérias que entram nesta interface levando à microinfiltração (IMAZATO *et al.*, 1998) melhorando a durabilidade da interface de união dente-restauração, que é a área mais susceptível à degradação no meio bucal (FEUERSTEIN, OSNAT *et al.*, 2007).

Trabalhos atuais têm sido realizados para avaliar o uso de monômeros antibacterianos à base de amônio quaternário em materiais odontológicos (MAKVANDI *et al.*, 2018). Apesar do seu uso em sistemas adesivos poder ser considerado como uma abordagem praticável, alguns trabalhos relatam suas limitações, como tempo reduzido de atividade antimicrobiana e citotoxicidade em células pulpareas humanas devido ao seu baixo peso molecular, o que pode comprometer a sua segurança clínica (IMAZATO *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2007).

Assim, novos agentes antimicrobianos são necessários e muito trabalho tem sido dedicado ao desenvolvimento de compostos eficientes e com menor suscetibilidade ao desenvolvimento de resistência bacteriana (CARMONA-RIBEIRO e DE MELO CARRASCO, 2013).

Além da potencial atividade antimicrobiana, o  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  possui como uma de suas características principais a capacidade de filmogenia e de aderência (ALFAYA, R.V.S. *et al.*,

1998). Sua incorporação ao sistema adesivo poderia contribuir para maior longevidade clínica de restaurações adesivas. Desta forma, o presente estudo busca investigar as atividades do composto de amônio quaternário cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (designado como SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>) e os benefícios da funcionalização de sua molécula com de íons cobre no adesivo dentinário.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Desenvolver e avaliar um sistema adesivo odontológico inovador contendo SiPy+Cl<sup>-</sup> e [Cu(SiPy+Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Sintetizar o SiPy+Cl<sup>-</sup> e funcionalizar com íons cobre [Cu(SiPy+Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>;

Avaliar a atividade antimicrobiana e a viabilidade celular do SiPy+Cl<sup>-</sup> e do [Cu(SiPy+Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>;

Realizar a caracterização do SiPy+Cl<sup>-</sup> e do [Cu(SiPy+Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>;

Incorporar o SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e o [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> ao sistema adesivo comercial Ambar Universal;

Investigar as propriedades antimicrobianas do adesivo Ambar Universal contendo 0,5 %, 1,0 % e 2,0 % de SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e de [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>;

Analisar *in vitro* a influência da incorporação do SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e do [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> ao sistema adesivo experimental;

Analisar *in situ* a influência da incorporação do SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e do [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> ao sistema adesivo experimental;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 SISTEMAS ADESIVOS

O princípio fundamental de adesão aos tecidos dentais baseia-se em um processo de troca, em que o material inorgânico do substrato dental é substituído por monômeros resinosos. Este processo é composto por duas fases: a primeira consiste na remoção de minerais do substrato e a segunda envolve a infiltração e polimerização de monômeros resinosos através das porosidades previamente criadas no esmalte e da hibridização na dentina (NAKABAYASHI *et al.*, 1982).

A adesão aos substratos dentais ocorre principalmente por meio da interação micromecânica do agente de união com o esmalte e as fibrilas colágenas expostas na dentina. Para que se consiga esta união, é necessária a aplicação de um agente ácido que favoreça a desmineralização da camada superficial da dentina. Em seguida, a região antes ocupada por mineral é submetida à permeação de monômeros hidrofílicos (*primer*) e posterior polimerização de monômeros hidrofóbicos contidos no adesivo (*bond*). Assim, o embricamento mecânico forma uma camada híbrida ácido-resistente, estrutura responsável pela ancoragem do material restaurador resinoso, que visa o selamento da interface adesivo/dentina, minimizando a penetração de bactérias, suas endotoxinas, fluidos e eletrólitos (NAKABAYASHI *et al.*, 1982; ANCHIETA *et al.*, 2015).

Uma inovação (2011) na odontologia adesiva foi a introdução dos sistemas adesivos universais. São conhecidos como sistemas adesivos multiuso, porque eles podem ser usados para estratégias adesivas de condicionamento e enxágue, autocondicionamento e condicionamento seletivo, mantendo a filosofia *all in one* (ROSA *et al.*, 2015). Esses adesivos contêm monômeros que são hidrofílicos, hidrofóbicos e neutros em uma única formulação. Foi demonstrado que esta combinação forma uma ligação satisfatória entre a superfície hidrofílica dos tecidos dentinários e a superfície hidrofóbica das resinas compostas (DIONYSOPOULOS *et al.*, 2022).

Como os monômeros ácidos desses adesivos já foram introduzidos como *primers* para outros substratos além da resina (ou seja, ligas, cerâmica policristalina), um tratamento multimodo tem sido instruído para esses produtos. Em alguns sistemas adesivos, um agente silano foi incorporado para compatibilidade com materiais vitrocerâmicos, proporcionando assim um agente de acoplamento universal (HANABUSA *et al.*, 2012; PERDIGAO *et al.*, 2012).

O objetivo final dos sistemas adesivos é proporcionar uma efetiva e durável união ao substrato dental pela formação de uma camada híbrida adequada, repercutindo em longevidade para o procedimento restaurador (NAKABAYASHI *et al.*, 1982; MANHART, J. *et al.*, 2002).

Estudos *in vivo* demonstraram que a resistência de união de sistemas adesivos tende a diminuir ao longo do tempo, podendo ser observadas alterações na camada híbrida, afetando negativamente a longevidade das restaurações (HASHIMOTO *et al.*, 2000; 2001). Com o envelhecimento no meio bucal, processos mecânicos, térmicos e químicos degradam a camada híbrida, tornando-a mais suscetível à deterioração da ligação e infiltração bacteriana (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2017; BETANCOURT *et al.*, 2019).

A redução nos valores de resistência de união, pela degradação da interface resina/dentina, tem sido atribuída à deterioração combinada de colágeno exposto e polímeros resinosos, principalmente os monômeros altamente hidrofílicos (HASHIMOTO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2005). O mecanismo de degradação envolve problemas como: inadequada penetração do monômero adesivo na zona de dentina desmineralizada, subpolimerização, sorção de água, degradação resinosa e atividade colagenolítica que contribui para a degradação do colágeno (HASHIMOTO *et al.*, 2000; HASHIMOTO *et al.*, 2010).

Além disso, a interface adesiva pode ser influenciada pelas propriedades do substrato, pela composição química do adesivo, pela umidade oral com outros contaminantes, como sangue e saliva, e pela habilidade do operador (DABBAGH *et al.*, 2022). Apesar de todos os avanços tecnológicos, a estabilidade desta união ainda se apresenta como uma potencial limitação (SALZ e BOCK, 2010), interferindo na durabilidade das restaurações adesivas (DE MUNCK *et al.*, 2005).

Para tratar a falha de restaurações de resina composta devido à microinfiltração, cárie, degradação do colágeno dentinário e hidrólise da resina, vários métodos inovadores têm sido aplicados (ZHOU *et al.*, 2019) e várias modificações dos sistemas adesivos dentinários têm sido propostas. Diferentes combinações de adesivos e materiais restauradores resultaram em diferentes entradas, proliferação e viabilidade bacterianas a interface, indicando um processo de degradação interfacial dependente do material e do modo adesivo (HUANG *et al.*, 2018). A deterioração das interfaces resina-dentina é modulada pela inibição de metaloproteinases (MMP), o uso de materiais antimicrobianos e modo de adesão (HUANG *et al.*, 2018). Essas modificações visam eliminar as bactérias cariogênicas por meio da incorporação de agentes antimicrobianos, inibir a atividade colagenolítica de enzimas e hidrólise de resinas com adição de agentes anti-enzimáticos, e reduzir a desmineralização dos tecidos dentários, incorporando

agentes de remineralização (DIONYSOPOULOS *et al.*, 2022). Entretanto, adesivos com apenas uma atividade específica não os resolve de maneira eficaz. Assim, sistemas adesivos de múltiplas funções são cada vez mais desejados (ZHOU *et al.*, 2019).

### 3.1.1 Sistemas adesivos antimicrobianos

A cárie secundária, ou recorrente, é considerada uma das principais causas da falha das restaurações. Os subprodutos bacterianos ácidos podem infiltrar não apenas a interface adesiva, mas também o tecido dentário na periferia, criando uma zona marginal desmineralizada e, assim, promovendo rapidamente a ocorrência da cárie. A este respeito, foi sugerido que uma resistência aumentada da interface resina dentina ao ácido poderia retardar de maneira eficaz a progressão da cárie secundária (BAKRY *et al.*, 2007).

Sabendo que os procedimentos adesivos não conseguem prevenir o desenvolvimento de lesões de cárie adjacentes à restauração e são igualmente incapazes de eliminar o biofilme por completo (GARCIA-GODOY *et al.*, 2010), um recurso seria o desenvolvimento de materiais dentários com propriedades antimicrobianas, no intuito de reduzir o acúmulo de biofilme na interface da restauração, sem prejudicar as propriedades mecânicas do material, tornando a interface menos vulnerável à degradação (CHEN *et al.*, 2012).

Com o objetivo de promover uma atividade antimicrobiana, a adição de vários agentes na composição dos sistemas adesivos foi sugerida. A maioria dos agentes antimicrobianos utilizados supostamente elimina as bactérias remanescentes da cavidade do dente e previnem a formação de placa microbiana nas margens da restauração. Alguns desses agentes antimicrobianos são os sais de amônio quaternário, a clorexidina, a hesperidina e a doxiciclina (DIONYSOPOULOS *et al.*, 2022).

O uso de monômero quaternário de amônio em sistemas adesivos pode ser considerado como uma abordagem praticável e trabalhos têm sido feitos para avaliar esses monômeros antibacterianos em resinas odontológicas (IMAZATO *et al.*, 2003). Um exemplo é o brometo de 1,2-metacrilóiloxidodecílpiridínio (MDPB) que foi sintetizado pela primeira vez há mais de 20 anos e demonstrou atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii*. (IMAZATO *et al.*, 1992, 1999). Este monômero foi incorporado em um sistema adesivo e está disponível comercialmente como Clearfil™ Protect Bond (IMAZATO *et al.*, 2006).

Feuerstein *et al.* (2007) realizaram um estudo para investigar as propriedades antibacterianas imediatas e duradouras de quatro sistemas adesivos autocondicionantes,

incluindo Clearfil™ Protect Bond, por 14 dias, sendo que este sistema exibiu um efeito antibacteriano por apenas sete dias. Além disso, nenhum sistema adesivo mostrou efeito antibacteriano contra *S. mutans* em 14 dias, sugerindo que as moléculas de MDPB que não foram polimerizadas foram lixiviadas para fora do sistema adesivo, o que conduz a um efeito antibacteriano superior, mas em um intervalo de tempo reduzido.

Os compostos de quaternário de amônio imobilizados representam uma classe poderosa de monômeros bioativos que podem ser fundamentais no desenvolvimento de materiais dentários com reduzido crescimento bacteriano (MAKVANDI *et al.*, 2018). Existem vários tipos de compostos de amônio quaternário antimicrobianos na literatura. Ainda assim, alguns trabalhos relatam suas limitações, sua incorporação ao adesivo pode alterar a estrutura do monômero, seu grau de conversão, a sorção de solvente e as propriedades de resistência (MAKVANDI *et al.*, 2018).

O uso de compostos de amônio quaternário de baixo peso molecular como MDPB podem ter citotoxicidade em células pulpares humanas, o que pode comprometer a segurança clínica de seu uso (IMAZATO *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2007). Adicionalmente, o uso de grandes quantidades pode resultar em citotoxicidade significativa para células de fibroblastos. Portanto, a concentração selecionada para a sua aplicação deve equilibrar os efeitos antibacterianos considerando a sua citotoxicidade (MAKVANDI *et al.*, 2018).

O uso de íons metálicos, dentre eles o cobre, a prata, o zinco e o ouro, são de grande interesse na odontologia por suas propriedades antimicrobianas e antifúngicas reconhecidas. Resultados promissores com o emprego do cobre têm sido demonstrados. Em comparação com a prata, além da fácil disponibilidade e do baixo custo (USMAN *et al.*, 2013), o cobre promove maior efeito antibacteriano contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (FOLEY e BLACKWELL, 2003).

Em um estudo conduzido na Universidade de Osaka, no Japão, submeteram-se bactérias gram positivas (*S. aureus*) e gram negativas (*E. coli*) a 21 metais elementares, dos quais o cobre e a prata apresentaram taxas de morte 5 a 10 vezes maiores que outros metais, demonstrando serem fortes biocidas (KAWAKAMI *et al.*, 2008).

Diversos mecanismos podem explicar a inativação de vírus e bactérias pelo cobre, dentre eles a inativação por contato (SOUSA *et al.*, 2021). Foi considerado que no cobre e no ferro, os pares de íons oxidados compartilham potenciais redox semelhantes. Fundamentado nas espécies reativas de oxigênio (EROs), podem causar danos irreparáveis aos componentes celulares quando expostos a esses íons. Além disso, especificamente para os íons de cobre, o mecanismo de morte de citotocinas foi hipotetizado como ocorrendo à medida que as células



absorvem grandes quantidades desses íons, deslocando agrupamentos de  $4\text{Fe-S}_4$ , resultando em desidratases (KAWAKAMI *et al.*, 2008).

Com respeito ao mecanismo de ação, sugere-se ainda, que o cobre limita o crescimento bacteriano por inibição da glicólise pela oxidação dos grupos tiol de várias enzimas, reduzindo a produção de ácido (OPPERMANN e JOHANSEN, 1980). A atuação do íon controla a formação de glucano pela glucose transferase e interrompe reações metabólicas importantes por bactérias anaeróbias orais (DAVEY e EMBERY, 1992).

### 3.2 MECANISMOS DE ADESÃO DOS SILANOS

O termo silano, por definição estrita, pode se referir ao composto químico de fórmula  $\text{SiH}_4$ , hidreto do grupo 14 análogo ao metano ( $\text{CH}_4$ ) e derivado do silício. No entanto, esse termo em particular, refere-se a uma grande quantidade de compostos com quatro substituintes no silício (MATINLINNA *et al.*, 2018).

A força de adesão do silano varia de acordo com os diferentes materiais. A adesão mais forte é obtida com a sílica, o quartzo e o vidro, que formam fortes ligações de siloxano ( $\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$ ), através da condensação de grupos hidroxila na superfície do substrato. Uma adesão mais suave é obtida com metais puros ou ligas metálicas, formando ligações  $\text{Si} - \text{O} - \text{M}$  (PLUEDDEMANN, 1970).

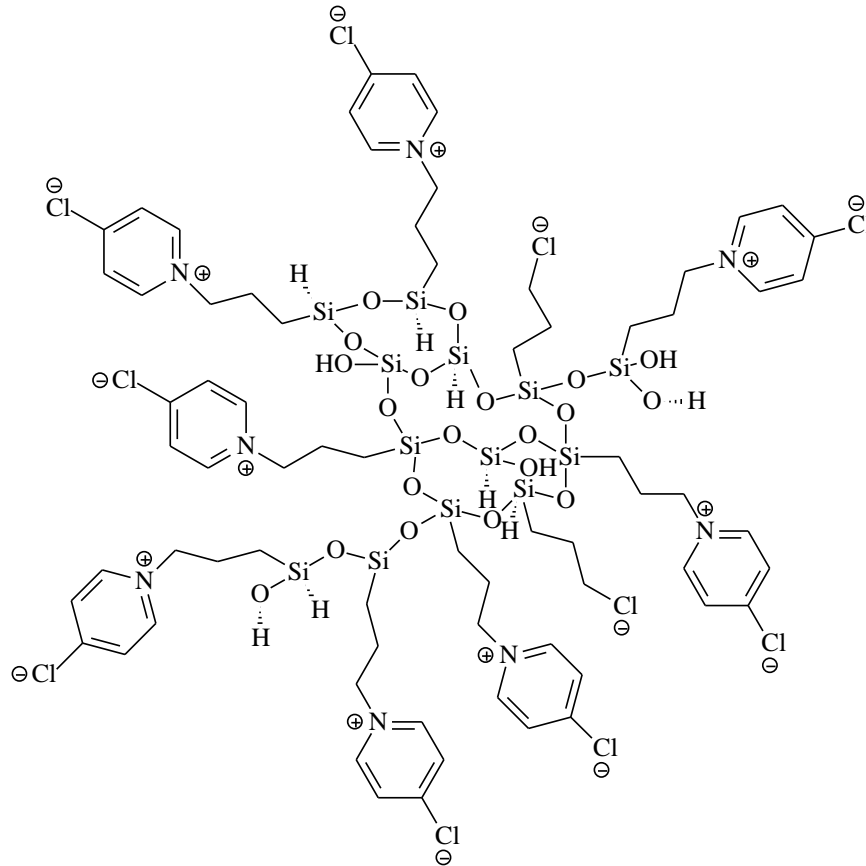
O silano é ativado por ácido para formar grupos silanol que reagem com os grupos hidroxila (OH) da superfície do substrato por uma reação de condensação (substrato  $\text{Si-OH} + \text{HO} \Rightarrow$  substrato  $\text{Si-O}$ ) quando aplicado sobre uma superfície tratada (LUNG *et al.*, 2012).

A reação entre os grupos organofuncionais do silano (com uma ligação  $\text{C} = \text{C}$ ) e os grupos funcionais dos monômeros contendo a ligação  $\text{C} = \text{C}$  é induzida pelos radicais livres reativos gerados pela fotoativação dos componentes iniciadores na matriz da resina. O iniciador na resina composta se decompõe em radicais livres reativos e de alta energia após irradiação com a luz azul visível (400 a 500 nm). As espécies reativas reagem com as ligações  $\text{C} = \text{C}$  no monômero de resina ou na molécula de silano para gerar radicais livres reativos. A reação entre os radicais livres reativos dos monômeros da resina e das moléculas de silano forma uma nova ligação  $\text{C} - \text{C}$  sigma. Como resultado o composto de resina e a superfície do substrato são conectados pelo agente de acoplamento do silano (MATINLINNA *et al.*, 2018).

### 3.3 CLORETO DE 3-N-PROPILPIRIDÍNIO SILSESQUIOXANO

Designado como  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ , o cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano é um composto piridínio solúvel em água e com elevada capacidade de troca iônica (Figura 1).

Figura 1 – Fórmula estrutural do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano



Fonte: O autor

Sua principal característica é a capacidade de filmogenia e de aderência. Além disso, apresenta uma vantagem adicional que é a sua estabilidade química, mesmo quando dissolvido em água e estocado por longo período de tempo (ALFAYA, R.V.S. *et al*, 1998).

Não há na literatura artigos que versem sobre a utilização do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  em sistemas adesivos de uso odontológico, embora a atenção dos pesquisadores esteja voltada à investigação de compostos quaternários de amônio e ele possua características favoráveis ao seu emprego nestes sistemas.

O cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano ( $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ ) é um polieletrólito solúvel em água com propriedades diversas, dentre elas a adsorção de íons metálicos (como os íons

$\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ), alta capacidade de troca iônica e excelente capacidade de formação de filmes em diferentes substratos (FUJIWARA *et al.*, 2001).

Considerando a estrutura química demonstrada anteriormente (Figura 1), podem estar envolvidos vários mecanismos de adsorção de metais. Em síntese, a troca iônica de grupos Si-OH com os íons metálicos, a fisissorção por meio de interação de van der Waals das cadeias alquil de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  com os íons metálicos e a complexação aniônica dos cloretos de íons metálicos aniônicos com os grupos nitrogenados  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  (RIBICKI *et al.*, 2020).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

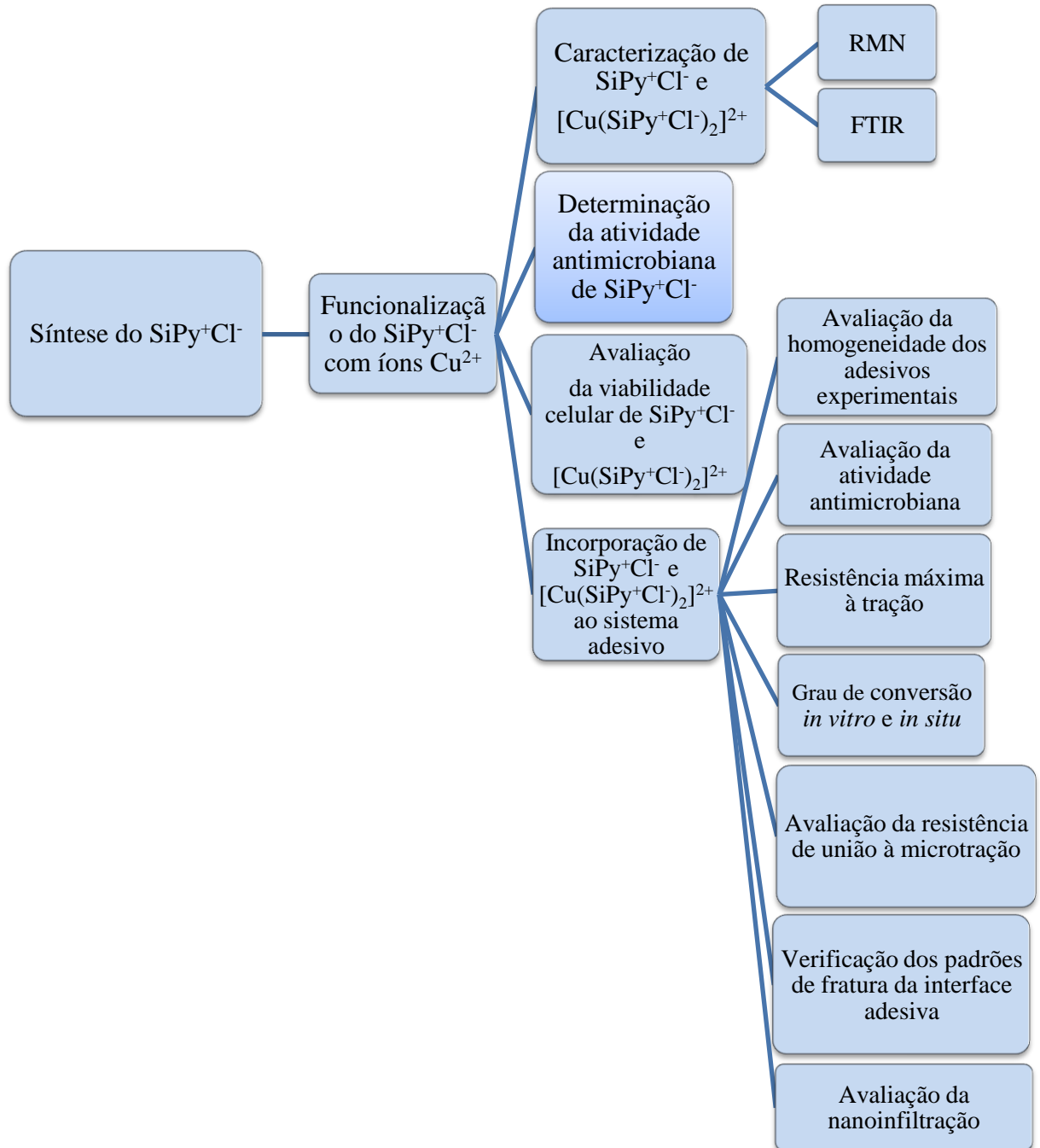
### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa iniciou com a síntese do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ . Posteriormente, foi realizada a sua funcionalização com cobre (II), obtendo-se o cloreto cúprico de 3-n-propilpiridínio-silsesquioxano,  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ . Para a caracterização do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e do  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foi realizada espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). O *screening* inicial foi finalizado com a avaliação da atividade antimicrobiana e viabilidade celular dos dois polieletrólitos.

Os compostos foram incorporados ao adesivo Ambar, obtendo-se adesivos experimentais em diferentes concentrações. A homogeneidade dos adesivos experimentais foi avaliada, bem como a influência da incorporação dos compostos ao adesivo. O grau de conversão foi avaliado *in vitro* por espectroscopia de micro-Raman e a determinação da resistência máxima à tração realizada em sistema universal de ensaios. Adicionalmente, foi avaliada a atividade antimicrobiana e antifúngica dos adesivos experimentais por testes de disco difusão em ágar.

Foram utilizados quarenta dentes, obtidos no Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para aplicação dos sistemas adesivos à dentina e avaliação *in situ* do grau de conversão por espectroscopia de micro-Raman. Posteriormente, os dentes foram submetidos ao teste de resistência de união à microtração, verificação dos padrões de fratura na interface adesiva e avaliação da nanoinfiltração por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma ilustrativo das etapas da pesquisa



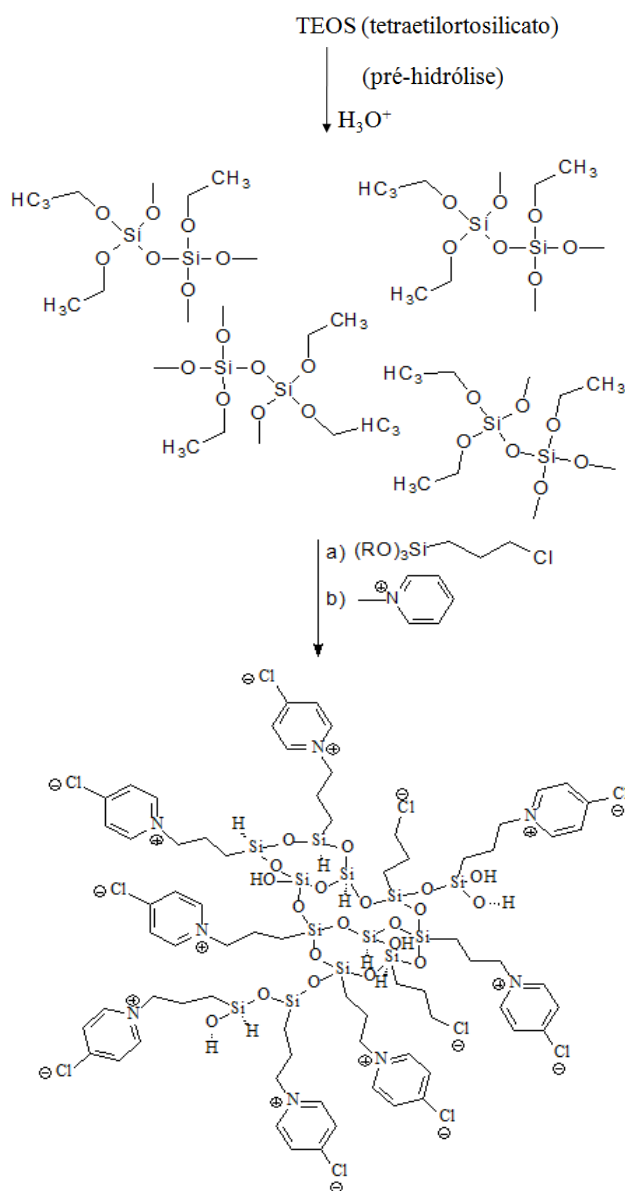
Fonte: o autor

## 4.2 SÍNTESE DO $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$

O derivado de silsesquioxano, denominado  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ , foi preparado pelo método de processamento sol-gel (ALFAYA *et al.*, 2001). O procedimento de obtenção consistiu basicamente na pré-hidrólise ácida do tetraetilortosilicato em solução de etanol e na presença de água, seguida da adição do grupo orgânico piridina, sintetizado segundo procedimento semelhante ao descrito na literatura (GUSHIKEM *et al.*, 2008; RIBICKI *et al.*, 2018).

Todos os reagentes foram utilizados em grau analítico, sem purificação adicional e as soluções foram preparadas com água de um sistema Millipore Milli-Q. O procedimento geral e esquemático de preparação dos polímeros está ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Procedimento geral e esquemático para o preparo de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano



Fonte: O autor

### 4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DO $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ COM ÍONS COBRE

A incorporação dos íons cobre ao  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  foi promovida por meio de imobilização. A capacidade de troca do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  ( $2,8 \text{ mmol.g}^{-1}$ ), permitiu a imobilização de  $1,4 \text{ mmol.g}^{-1}$  de  $\text{Cu (II)}$ .

Foi pesado 1,007 gramas (equivalente a  $0,2 \text{ mmol.g}^{-1}$ ) e adicionado à solução aquosa de cloreto de cobre ( $0,237 \text{ g}$  de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{PM} = 170,48$ ), utilizando metade da capacidade de troca do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ . Após 48 horas a solução foi rotaevaporada para obtenção do produto final  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ E DO $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$

#### 4.4.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – IVTF (*Fourier transform infrared spectroscopy - FTIR*)

O  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e o  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando  $4 \text{ mg}$  da amostra e  $196 \text{ mg}$  de KBr grau espectroscópico ( $2\% \text{ m/m}$ ), no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu),  $32 \text{ scans.min}^{-1}$ , resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.4.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN (*Nuclear magnetic resonance - NMR*)

Para a elucidação estrutural, os espectros RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^{29}\text{Si}$  no estado sólido foram registrados em equipamento BRUCKER AVANCE DRX-400 usando rotação em torno do ângulo mágico (MAS) padrão de  $4 \text{ mm}$  à temperatura ambiente. O campo magnético estático forte ( $B_0$ ) foi de  $9,4\text{T}$  e as frequências de ressonância correspondentes para  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  e  $^1\text{H}$  são  $79,488 \text{ MHz}$ ,  $100,625 \text{ MHz}$  e  $400,132 \text{ MHz}$ , respectivamente. As amostras de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram colocadas em rotores de zircônia e submetidas a uma rotação de  $13 \text{ kHz}$ .

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi obtido utilizando a técnica de polarização cruzada de amplitude variável e rotação no ângulo mágico (*Variable Amplitude Cross Polarization - Magic Angle Spinning - VACP-MAS*), de forma que os principais parâmetros de valores da sequência de pulsos ficam assim resumidos: o tempo de contato de  $1 \text{ ms}$ , o tempo de

reciclagem de 3 s, o número de *scans* é de 20400 e o tempo de aquisição de 15,98 ms. O padrão externo utilizado foi o carbono da carbonila (CH<sub>2</sub>) da Glicina ( $\delta_{\text{iso}}=43.5$ ) (YE *et al.*, 1993).

O espectro de RMN de <sup>29</sup>Si foi obtido utilizando a Polarização Direta com giro no ângulo mágico (Direct Polarization - Magic Angle Spinning - DP-MAS NMR), de forma que os principais parâmetros de valores da sequência de pulsos ficam assim resumidos: tempo de pulso de 2  $\mu$ s, tempo de reciclagem de 1 s, o número de *scans* de 76400 e o tempo de aquisição de 16,58 ms. O padrão externo utilizado foi a Caulinita ( $\delta_{\text{iso}} = -91.5$  ppm) (BARRON *et al.*, 1983).

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> E DO [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>

Para confirmar o potencial antimicrobiano do SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e do [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> foi realizado o teste de disco difusão em Ágar anteriormente à sua incorporação ao adesivo.

Brevemente, placas contendo Ágar Mueller-Hinton (MH) suplementado com 5 % de sangue de ovelha foram inoculadas com suspensão padronizada do microorganismo (0,5 na escala Mc Farland,  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL). Após 15 minutos, discos de papel filtro esterilizados, com diâmetro de 6 mm e espessura de 1,5mm, impregnados com 20  $\mu$ L de soluções de diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 2,0%) de SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> e de [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> foram fixados nas placas com distância de 3 cm um do outro. O diâmetro da zona de inibição de crescimento em torno de cada disco foi determinado em milímetros após 24 horas de incubação em condições microaerofílicas a  $35 \pm 0,5$  °C. Os testes foram realizados em triplicata (PUPO *et al.*, 2013).

O teste foi realizado com *Streptococcus mutans*, um representante gram negativo (*Escherichia coli*), um representante gram positivo (*Staphilococcus aureus*) e um fungo (*Candida albicans*). Como controle positivo foram utilizados a Gentamicina (gram positivos e negativos), Cloranfenicol (*S. mutans*) e Fluconazol (*Candida albicans sp*) (CLSI, 2016) e como controle negativo foi utilizado solução salina (cloreto de sódio 0,9 %).

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste de ANOVA de uma via seguido do teste de Scheffe (5 % de significância). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. A avaliação foi realizada utilizando o programa Graphpad – Prism Stat, versão 5,0 (San Diego, CA, EUA).



#### 4.6 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR DO $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ E DO $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular Calu-3, um modelo de células tumorais, e 3T3, modelo de células normais, cultivadas em meio incolor RPMI 1640, em pH 7,4, contendo 5% de soro fetal bovino, suplementado com  $24 \text{ mmol.L}^{-1}$  de bicarbonato de sódio,  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  de L-glutamina,  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de piruvato de sódio,  $10000 \text{ U.L}^{-1}$  de penicilina, e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa umidificada com atmosfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  de temperatura.

##### 4.6.1 Tratamento celular

As células Calu-3 e 3T3 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço e incubadas por 24 h em meio de cultura. Para a avaliação da citotoxicidade, as linhagens celulares foram incubadas com as amostras de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  a 50, 250, 500, 1000, 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por 72 h a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ . Os testes foram obtidos usando o procedimento de diluição em série (quando possível) e foram realizados como quatro experimentos independentes ( $n = 4$  por ensaio).

##### 4.6.2 Viabilidade celular pelo teste de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT)

O ensaio de redução do MTT avalia a atividade da desidrogenase mitocondrial celular, responsável pela redução deste composto que passa da coloração amarela para um composto de cor violeta chamado formazan, E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-1,3-difenilformazan.

Após 72 h dos tratamentos, 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT a  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram adicionados aos poços como método padrão (MOLINARO *et al.*, 2009). As culturas foram então incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 2 h, protegidas da luz, até o aparecimento de cristais de formazan, insolúveis em água. O sobrenadante foi então removido e para a solubilização dos cristais, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) (ALPER *et al.*, 2021). A leitura espectrofotométrica de absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 550 nm em um leitor de microplacas  $\mu\text{Quant}$  (BioTek, Winooski, VT, EUA). Para calcular a viabilidade celular, a Equação 1 foi usada.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (\text{absorbância do teste} / \text{absorbância do controle}) \times 100 \quad (1)$$

#### 4.7 INCORPORAÇÃO DO $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ E DO $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ AO SISTEMA ADESIVO

O  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e o  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram incorporadas a um sistema adesivo simplificado, de apresentação em frasco único, disponível comercialmente, adesivo Ambar [FGM]. A Figura 4 mostra o adesivo utilizado no estudo e o Quadro 1 mostra a sua composição detalhada.

Figura 4 - Adesivo Ambar



Fonte: FGM: Dental Group, Joinvile, SC, Brasil, 2022. Disponível em: <https://fgmdentalgroup.com/produtos-estetica/ambar>. Acessado em: 15, jul 2022.

Quadro 1 - Composição química do sistema adesivo

| Sistema adesivo | Composição  |
|-----------------|---|
| AMBAR           | <p>Ingredientes ativos: MDP (10- metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato) monômeros metacrílicos, co-iniciadores e estabilizantes.</p> <p>Ingredientes inativos: carga inerte (nanopartículas de sílica) e veículo (etanol).</p> |

Fonte: FGM: Dental Group, Joinvile, SC, Brasil, 2022. Disponível em: <https://fgmdentalgroup.com/produtos-estetica/ambar>. Acessado em: 15, jul 2022.

Inicialmente, um estudo piloto foi realizado utilizando diversas concentrações de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  no sistema adesivo. Observou-se a degradação, mudança de coloração e geleificação em concentrações superiores a 2,0 %, impossibilitando a sua utilização. À vista disso, optou-se pela utilização do sistema adesivo com incorporação dos compostos nas seguintes concentrações (p/v): 0 % (controle, adesivo comercial); 0,5; 1,0 e 2,0%.

Foram pesadas em balança analítica (AW220, Shimadzu, Kyoto, JPN) as massas exatas de 0,15 g de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ , e adicionadas aos adesivos por agitação (12 h) em um misturador Speedmix (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) resultando em uma concentração final de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  no sistema adesivo de 0,5; 1,0 e 2,0 % (p/v) após fotopolimerização. Dessa forma, os referidos compostos foram incorporados ao sistema adesivo disponível comercialmente.

#### 4.7.1 Avaliação da homogeneidade do adesivo

Soluções de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  (previamente dissolvidos em água) foram adicionadas ao adesivo Âmbar Universal, em eppendorfs, resultando em concentrações finais de 0,5; 1,0 e 2,0 %. Os eppendorfs foram agitados em vórtex durante 10-15 segundos. Com auxílio de microscópio eletrônico, 30 segundos após a incorporação das soluções ao adesivo, foram registradas as imagens das diferentes concentrações (STANISLAWCZUK et al., 2011).

### 4.8 TESTES DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO*

#### 4.8.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos adesivos com $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$

As propriedades antibacterianas do adesivo Ambar Universal contendo diferentes concentrações de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram investigadas por meio de testes de suscetibilidade *in vitro*, pelo método de disco-difusão em Ágar (LU et al., 2007).

Cada disco de papel filtro esterilizado (diâmetro: 6 mm, espessura: 1,5 mm) foi tratado com 20  $\mu\text{L}$  de adesivo com diferentes concentrações de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  ou controles negativo e positivo, fotopolimerizados com LED por 20 s (LED radii-cal, SDI, São Paulo, Brasil) em ambos os lados. Após fotopolimerização, os discos foram colocados em MH suplementado com 5 % de sangue de ovelha inoculados com o microorganismo, como descrito anteriormente. O diâmetro da zona de inibição total de crescimento em torno de cada disco foi determinado em milímetros após 24 h de incubação em condições microaerofílicas a  $35 \pm 0,5$  °C. Os testes foram realizados em triplicata.

O teste foi realizado com *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* (representante gram negativo), *Staphilococcus aureus* (representante gram positivo) e *Candida albicans*. Como controle positivo foram utilizados a Gentamicina (gram positivos e negativos), Cloranfenicol (*S. mutans*) e Fluconazol (*Candida albicans*) (CLSI, 2016).

Os resultados foram avaliados estatisticamente por ANOVA de uma via seguido do teste de Scheffe (5 % de significância). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. A avaliação foi realizada utilizando o programa Graphpad – Prism Stat, versão 5,0 (San Diego, CA, EUA).

#### 4.9 Testes mecânicos e grau de conversão

##### 4.9.1 Análise do grau de conversão dos sistemas adesivos *in vitro*

O grau de conversão foi verificado por meio de espectroscopia de micro-Raman (Senterra equipment, Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha) (GUZMAN-ARMSTRONG *et al.*, 2003). Antes das análises, o equipamento foi calibrado para redefinir o zero utilizando padrões de silício com valores de coeficientes conhecidos. As análises foram realizadas sob os seguintes parâmetros: laser de Neônio com 532 nm de comprimento de onda a 5 mW de potência; resolução espacial de  $\approx 3 \mu\text{m}$ ; resolução espectral de  $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$ , com 10 segundos de tempo de acumulação e 5 coadições, em magnificação de 20X para um laser de  $\approx 1 \mu\text{m}$  de diâmetro.

Os sistemas adesivos experimentais avaliados foram: Ambar Universal contendo 0,5, 1 e 2 % de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ , Ambar Universal contendo 0,5, 1 e 2 % de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  e Ambar Universal (controle). Para obter os dados de grau de conversão, três amostras foram feitas dos sistemas adesivos não-polimerizados e polimerizados. Uma gota de cada sistema adesivo ( $n = 3$ ) foi aplicada sobre uma lâmina de vidro para obtenção dos espectros dos sistemas adesivos não-polimerizados. Outra lâmina de  $2 \text{ cm}^2$  foi colocada em cima da gota, a polimerização foi realizada por 20 segundos, com um aparelho fotopolimerizador LED (Radii-cal, SDI, São Paulo, Brasil; irradiância de  $600 \text{ mW/cm}^2$ ) e os espectros dos sistemas adesivos polimerizados foram, então, obtidos.

A leitura e interpretação foram feitas transferindo os dados obtidos para o programa OriginPro 9,0 (Origin Lab Corporation, Northampton, EUA). Na análise do espectro foi considerado o intervalo de  $1660$  a  $1590 \text{ cm}^{-1}$ , para a observação dos picos de maior absorvância (%A) no mesmo comprimento de onda (nm), sinais em  $1608$  e  $1638 \text{ cm}^{-1}$ , característicos das ligações vinílicas aromáticas do bisfenol e alifáticas do grupamento funcional metacrilato. As alturas dos picos nestes sinais foi medida usando uma linha base tangenciando o espectro nos respectivos números de onda. O pico aromático a  $1610 \text{ cm}^{-1}$  foi

utilizado como padrão interno. Com estes dados, o grau de conversão foi determinado através da Equação 2.

$$\text{GC (\%)} = [1 - (\text{R polimerizada} / \text{R não polimerizada})] \times 100 \quad (2)$$

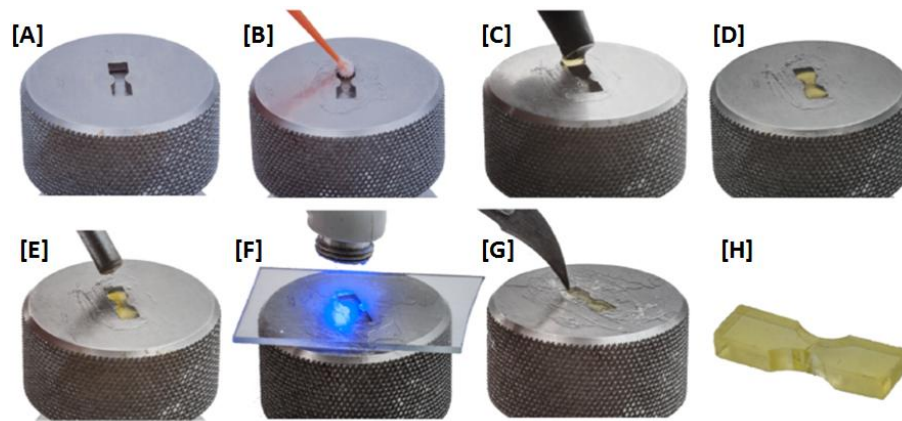
Onde, GC = grau de conversão;

R = intensidade da banda alifática/ intensidade da banda aromática.

#### 4.9.2 Teste de resistência máxima à tração

Corpos-de-prova do sistema adesivo (n = 10) com cada concentração (0; 0,5; 1,0 e 2,0 %) de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram confeccionados em uma matriz metálica em forma de ampulheta (10 mm de comprimento x 2 mm de largura x 1 mm de profundidade; Odeme Prod. Odont. Ltda, Joaçaba, SC, Brasil). Após lubrificação das superfícies da matriz com K-Y® Gel (Johnson & Johnson, Estados Unidos), uma tira de poliéster foi colocada em contato com a base. Devidamente posicionada sobre a base, a matriz foi encaixada e os adesivos foram gotejados nos orifícios até o completo preenchimento. Todas as bolhas de ar visíveis foram cuidadosamente removidas com o auxílio de um microaplicador (Cavibrush® FGM, Prod Odont. Ltda, Joinvile, SC, Brasil). Aplicou-se jato de ar durante 20 segundos a uma distância de aproximadamente 10 cm para evaporação do solvente. A seguir, foi posicionada uma lâmina de vidro lubrificada com K-Y® Gel sobre a matriz. Seguiu-se a fotoativação com um aparelho fotopolimerizador a base de LED, por 20 segundos com uma intensidade de  $1200 \text{ mW/cm}^2$  (Radii-cal, SDI, Bayswater, Victoria, Austrália), com densidade de energia adotada em  $4,8 \text{ J/cm}^2$ . Após a polimerização, os corpos-de-prova foram retirados da matriz cuidadosamente com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, e as rebarbas de adesivo que permaneceram ao redor foram removidas (Figura 5)

Figura 5 - Preparo dos corpos-de-prova



Fonte: Banco de imagens PPGO

(\*) [A] matriz metálica em forma de ampulheta; [B] lubrificação prévia da matriz; [C] adesivo dispensado; [D] completo preenchimento; [E] jato de ar - evaporação do solvente; [F] lâmina de vidro lubrificada sobre a matriz e fotoativação (20 s); [G] remoção do corpo-de-prova; [H] corpo-de-prova confeccionado.

Os corpos-de-prova ( $n = 5$ ) foram testados, imediatamente (24 h) após a confecção, e individualmente mensurados com paquímetro digital e fixados em garras de Geraldeli, com aplicação de cola de cianoacrilato gel (Loctite Superbonder Power Easy Gel, Henckel, SP, Brasil) nas extremidades. Após a polimerização da cola, o conjunto garra–corpo-de-prova foi acoplado ao sistema universal de ensaios (Instron; Canton, Massachussets, USA) e testado por tração a uma velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 100 N, até o rompimento da interface (STANISLAWCZUK *et al.*, 2014) (Figura 6).

Figura 6 - Protocolo resistência máxima a tração



Fonte: Banco de imagens PPGO/UEPG

(\*) [A] corpos-de-prova; [B] mensuração com paquímetro digital; [C] cola de cianoacrilato gel; [D] corpo-de-prova fixado na garra de Geraldeli; [E] Máquina de ensaios universais - Instron; [F] conjunto garra + corpo-de-prova acoplado na máquina de ensaios universais.

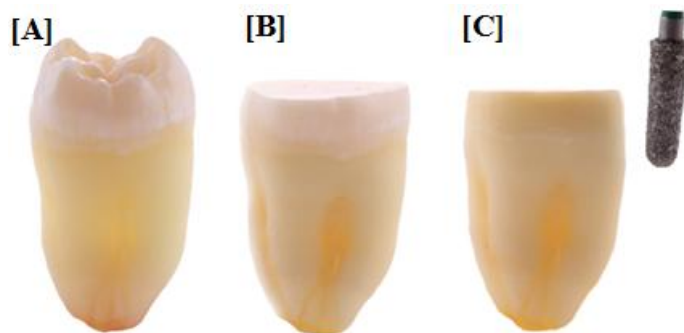
## 4.10 AVALIAÇÃO *IN SITU*

### 4.10.1 Preparo dos dentes – aplicação do adesivo, restauração e obtenção dos palitos

Trinta e cinco molares humanos livres de cárie, obtidos do Banco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, de pacientes com idades entre 18 e 35 anos, foram utilizados. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Os dentes foram desinfetados em cloramina 0,5 % e armazenados em água destilada trocada semanalmente até sua utilização, em um prazo máximo de até 3 meses após extração. Com o auxílio de uma politriz (Arotec E, Cotia, São Paulo, Brasil) e usando lixa de carbetto de silício de granulação #180, sob irrigação constante, foi retirado o esmalte oclusal e planificada a superfície dos molares até exposição da dentina. As bordas periféricas de esmalte foram totalmente desgastadas com pontas diamantadas no 4137 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) em alta rotação e irrigação constante, deixando unicamente tecido dentinário, como ilustra a Figura 7. A seguir, as superfícies de dentina foram polidas manualmente sob irrigação por 60 s para a padronização da parede dentinária dos canais reticulares - *smear layer*, utilizando lixas de carbetto de silício de granulação #600 (Extec, Enfield, Connecticut, EUA).

Figura 7 - Preparo da superfície da dentina



Fonte: Banco de imagens PPGO/UEPG

(\*) [A] dente hígido; [B] superfície oclusal planificada e em dentina; [C] desgaste de todas as bordas periféricas de esmalte.

Os sistemas adesivos foram aplicados segundo as indicações do fabricante (Quadro 2) e fotoativados por 10 s.

Quadro 2 – Passo a passo do sistema adesivo

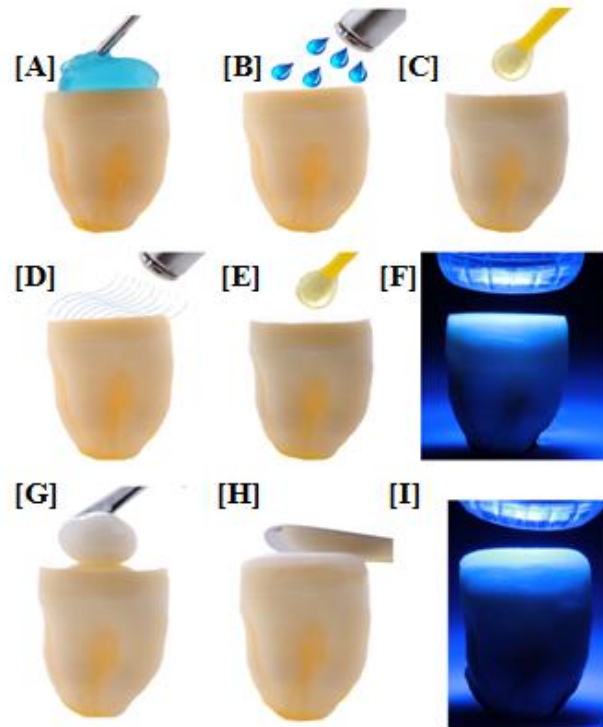
| <b>Sistema adesivo</b> | <b>Modo de utilização</b>  |
|------------------------|--|
| AMBAR APS              | <p>A superfície a ser restaurada é limpa e então condicionada com ácido fosfórico a 37 % por 15 segundos;</p> <p>A cavidade é lavada com água em abundância e seca até que esteja úmida, e não desidratada;</p> <p>Com auxílio de um microaplicador, o adesivo é aplicado esfregando a primeira gota por 10 segundos. Em seguida, nova camada de adesivo é aplicada na mesma superfície por mais 10 segundos;</p> <p>Aplica-se então jato de ar por 10 segundos;</p> <p>O adesivo deve ser fotopolimerizado por 10 segundos e então, procede-se a restauração.</p> |

Fonte: FGM: Dental Group, Joinville, SC, Brasil, 2022. Disponível em: <https://fgmdentalgroup.com/produtos-estetica/ambar>. Acessado em: 15, jul 2022.

Cinco dentes foram utilizados para cada grupo experimental. Após os procedimentos adesivos todos os dentes foram restaurados, com uma resina composta microhíbrida de restauração (Opallis, FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil). Três incrementos de 1 mm de resina foram adicionados, sendo cada incremento fotoativado por 40 segundos. Este procedimento foi realizado por um único operador e está ilustrado na Figura 8.



Figura 8 – Aplicação dos sistemas adesivos e restauração dos dentes

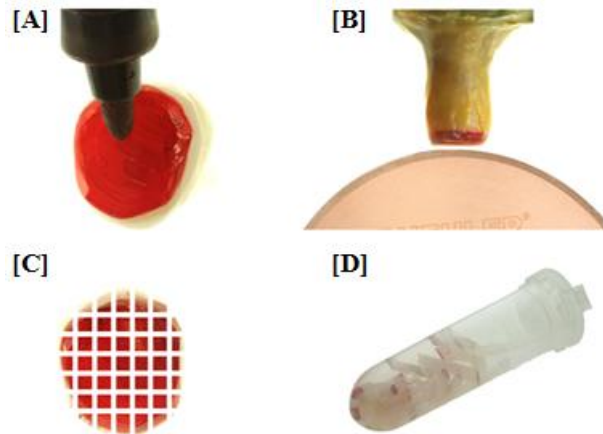


Fonte: Banco de imagens PPGO/UEPG

(\*) [A] condicionamento ácido; [B] lavagem e secagem; [C] aplicação do adesivo; [D] secagem para evaporação do solvente; [E] aplicação de segunda camada do adesivo; [F] fotoativação; [G] aplicação da resina composta; [H] adaptação do incremento; [I] fotoativação do incremento.

Os dentes restaurados foram armazenados em água destilada a 37 °C por 24 h e levados a uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA). Com ajuda de um disco diamantado (15 HC-4in, Buehler Ltd., Lake Bluff, Illinois, EUA), sob irrigação a 300 rpm, os dentes foram seccionados em cortes perpendiculares no eixo “x” e outra no eixo “y”, obtendo-se espécimes no formato de “palitos” com uma área de secção transversal de  $0,8 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  (Figura 9). O número de falhas prematuras (FP) por dente durante a preparação dos palitos foi registrada. A área de secção transversal foi medida com um paquímetro digital e registrada para o subsequente cálculo de microtração (Digimatic Caliper, Mitutoyo, Kanagawa, Tóquio, Japão). A metade dos palitos de cada dente foi selecionada aleatoriamente para serem testados imediatamente, IM (24 h).

Figura 9 - Obtenção dos palitos dos dentes



Fonte: Banco de imagens PPGO/UEPG

(\*) [A] superfície oclusal das coroas de resina compostas pintadas com caneta marcadora permanente de cores diferentes para identificação dos palitos de cada grupo; [B] dente fixado com cera pegajosa ao dispositivo da máquina de corte montada com um disco diamantado; [C] duas seqüências perpendiculares de corte, uma no eixo x e outra no eixo y, permitiram a obtenção dos palitos para o teste de resistência de união; [D] eppendorfs com palitos de cada dente em água destilada.

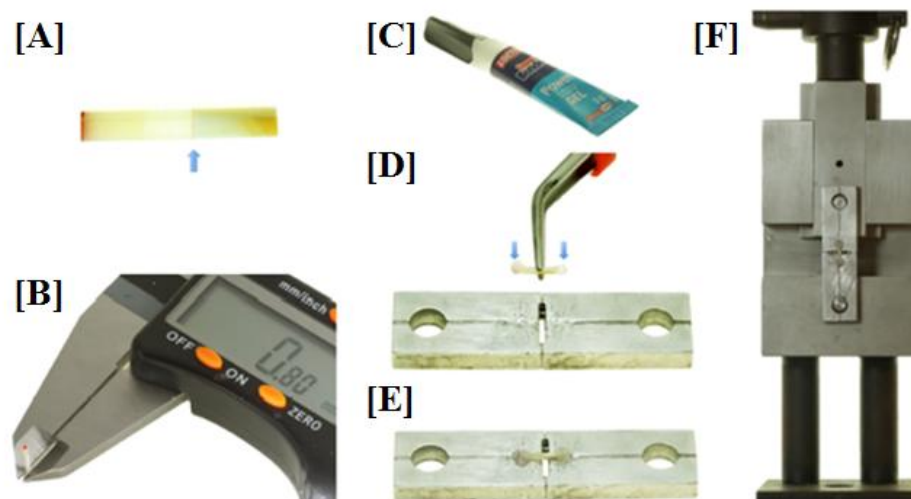
#### 4.10.2 Análise do grau de conversão (GC) por espectroscopia em Micro-Raman

Os palitos selecionados para análise do grau de conversão foram submetidos a um polimento com lixas d'água de granulação de 1500 e 2000 por um período de 30 s, sob irrigação com água. Em seguida, foram lavados em cuba ultrassônica por 15 min e armazenados em água destilada, a 37 °C, por 24 h. Para análise do GC, os palitos foram levados ao espectrômetro de Raman (Brunk Optic GmbH, Ettlingen, Badem-Württemberg, Alemanha), que foi calibrado a zero e uma amostra de silicone foi usada para os valores coeficientes. Os espécimes foram avaliados sob os seguintes parâmetros: laser de Neônio com 632 nm (vermelho) de comprimento de onda a 20 mW de potência, resolução espacial de  $\approx 3 \mu\text{m}$ , resolução espectral de  $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$  com 30 segundos de tempo de acumulação e 3 co-adições em magnificação de 100x (Olympus UK, London, UK) para um laser de  $\approx 1 \mu\text{m}$  de diâmetro. Os espectros obtidos foram da interface adesiva de sítios na região da camada híbrida e obteve-se uma imagem digital de cada sítio.

#### 4.10.3 Teste de resistência de união à microtração (RU)

Os palitos obtidos foram colados individualmente em garras de Geraldeli (Odeme Biotechnology, Joaçaba, Santa Catarina, Brasil) (PERDIGÃO *et al.*, 2002) aplicando em cada um dos extremos do palito cola de cianocrilato gel (Loctite Superbonder Power Easy Gel, Henckel, São Paulo, São Paulo, Brasil), que permite o controle da aplicação, de forma a não contaminar a interface dente-restauração. Após o tempo de polimerização da cola, as garras com os palitos foram acopladas na máquina de ensaios universal (Instron 3343; Instron Norwood, Mass, EUA) e estes foram testados por tração a uma velocidade de 0,5 mm/min com célula de carga de 100 N até rompimento da interface (Figura 10).

Figura 10 - Sequência para o teste de microtração



Fonte: banco de imagens PPGO/UEPG

(\*) [A] interface adesiva entre dente e restauração, indicada pela seta, em uma vista lateral do palito; [B] mensuração da largura e da espessura do mesmo palito, com paquímetro digital, para o cálculo da área da interface adesiva; [C] cola de cianocrilato em gel; [D] aplicação da cola nas extremidades do palito, protegendo a interface com a pinça; [E] posicionamento do palito nas garras de microtração deixando a interface adesiva no espaço central da garra; [F] adaptação das garras na máquina de ensaios universais após a polimerização da cola.

Utilizando uma lupa estereoscópica com 100x de magnificação (Olympus SZ40, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão), a falha de cada palito foi classificada segundo o tipo de fratura como: adesiva, falha na interface adesiva dente/restauração; coesiva em dentina, falha exclusivamente em dentina; coesiva em resina, falha exclusivamente em resina composta;

adesiva/mista, falha na interface adesiva dente/restauração, mas que incluiu falha coesiva dos substratos vizinhos; falhas prematuras, palitos que quebraram antes dos testes.

#### 4.10.4 Análise de nanoinfiltração

Três palitos de cada grupo experimental, que não foram utilizados para o teste de resistência de união, foram selecionados aleatoriamente para a análise da nanoinfiltração com a finalidade de observar a qualidade da interface de união. Os palitos foram imersos individualmente em solução aquosa de nitrato de prata amoniacal 50 % em peso (pH = 7,0), em um recipiente escuro, protegido da luz, por 24 horas. Após esse período, os palitos foram lavados abundantemente com água destilada e imersos em solução reveladora por 8 horas, sob luz fluorescente, para que houvesse redução dos íons de prata ao longo das microporosidades na interface de união (TAY *et al.*, 2002).

Depois de revelados, e novamente lavados com água destilada, os palitos foram fixados em *stubs* de alumínio. Foi realizado um polimento com uso de lixas d'água em granulações de 1000, 1200, 1500, 2000 e 4000 (3M), seguido de polimento final com discos de feltro com pasta diamantada, sob constante irrigação com água. As amostras foram lavadas em cuba após o polimento por 15 minutos. O excesso de água foi removido e as amostras foram colocadas em dessecador com sílica coloidal por 24 horas.

Após esse período, as amostras foram metalizadas com ouro e levadas ao microscópio eletrônico de varredura [MEV] (SSX 550, Shimadzu, Tóquio, Japão). De forma a padronizar a aquisição da imagem, foram obtidas três fotomicrografias de cada amostra. A primeira na região central do palito e as demais em direção a ambas as extremidades, 0,5 mm à esquerda e 0,5 mm à direita da primeira imagem, com um aumento de 500x e 2000x a 15 kV de tensão. Somente a prata infiltrada na interface adesiva foi considerada. A porcentagem relativa de nanoinfiltração dentro das áreas de adesivos e camadas híbridas foi medida em todas as imagens usando o software de domínio público Image J, um pacote de software de processamento de imagens baseado em Java desenvolvido nos Estados Unidos da América no National Institute of Health (NIH).

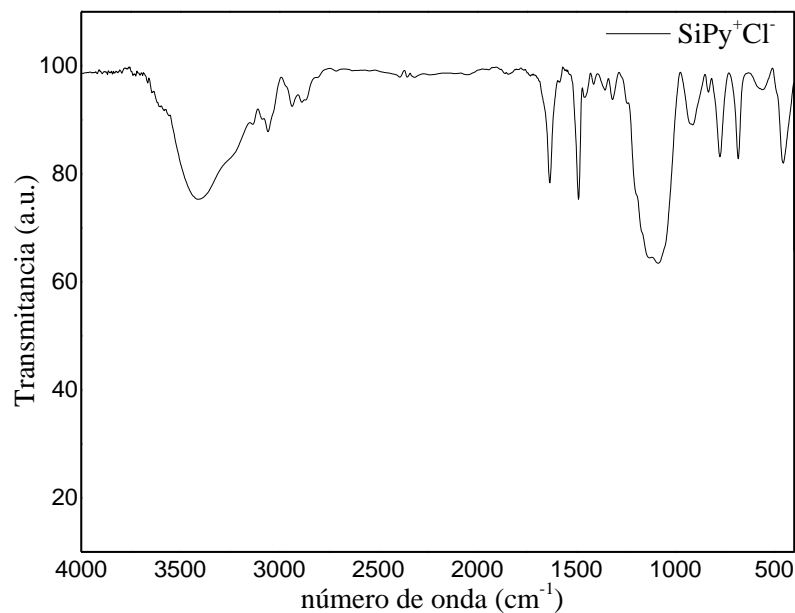
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ E DO $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$

#### 5.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

O espectro na região do infravermelho de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  está representado na Figura 11.

Figura 11 - Espectro na região do infravermelho do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$

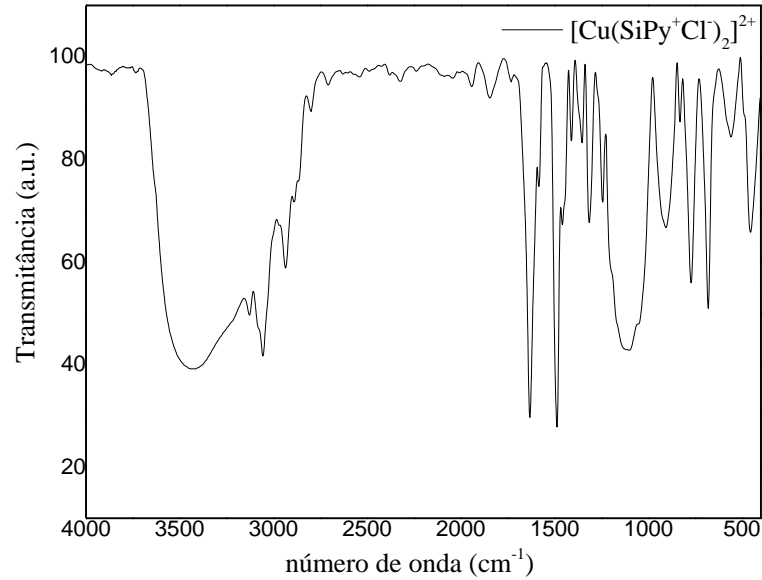


Fonte: O autor

Pode-se observar uma banda intensa e larga em  $1082 \text{ cm}^{-1}$  e outras duas bandas em  $775 \text{ cm}^{-1}$  e em  $457 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 11) que são atribuídas respectivamente ao modo de estiramento assimétrico e simétrico do esqueleto Si-O-Si e ao modo de deformação SiOSi do grupo Si-O-Si (JAFFRÈS e E. MORRIS, 1998; BENVENUTTI *et al.*, 2009; DE MENEZES, E. W. *et al.*, 2012). O espectro ainda apresenta as bandas vibracionais características do anel piridínio em  $1633 \text{ cm}^{-1}$  e  $1489 \text{ cm}^{-1}$ , cujos valores são similares aos apresentados na literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 2005; BI *et al.*, 2014).

A Figura 12 representa o espectro na região do infravermelho de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .

Figura 12 - Espectro na região do infravermelho do  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$



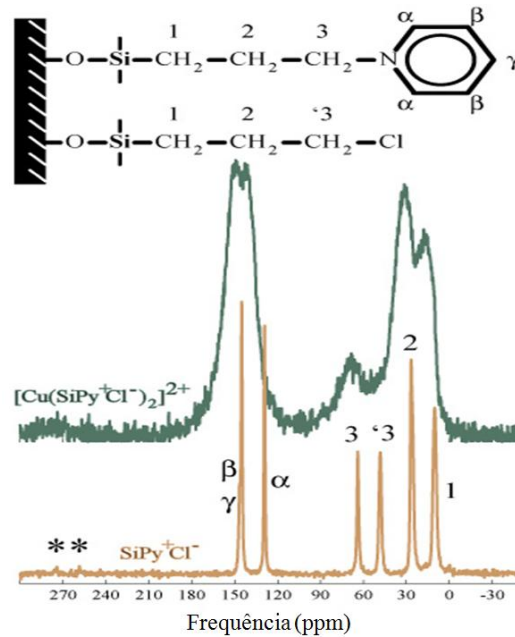
Fonte: O autor

Pode ser constatado, que as bandas do anel piridínio apresentaram um deslocamento, de 1633 e 1489  $\text{cm}^{-1}$  para 1631 e 1483  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 12). Essas alterações são típicas da coordenação do metal aos átomos de nitrogênio (SILVERSTEIN et al., 2005).

### 5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  de estado sólido, exibido na Figura 13, identifica seis principais deslocamentos químicos para os sinais de carbono denominados  $\text{C}_{1,2,3,3}$  e  $\text{C}_{\alpha, \beta, \gamma}$  e indicados no desenho da fórmula estrutural na parte superior da figura.

Figura 13 - Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (VACP-MAS) de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  e  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$



Fonte: O autor

(\*) o símbolo asterisco representa as bandas laterais

O sinal em 10,26 ppm, e seu sinal de deslocamento em 18,02 ppm, estão associados ao carbono  $\text{C}_1$  que está próximo ao núcleo Si. O sinal em 26,72 ppm (e sua contraparte deslocada em 31,40 ppm) corresponde ao carbono  $\text{C}_2$  flanqueado em ambos os lados por dois núcleos de carbono (ALFAYA e GUSHIKEM, 1999; DE MENEZES, ELIANA W., LIMA, EDER C., *et al.*, 2012).

O sinal de deslocamento em 63,94 ppm (e sua contraparte deslocada em 68,20 ppm) é atribuído à função modificada do carbono  $\text{C}_3$ , diretamente ligado ao nitrogênio, e o deslocamento em 48,26 ppm corresponde ao carbono  $\text{C}_3$ , do grupo 3-cloropropil ligado ao polímero de silício (MÜLLER *et al.*, 2000; DE MENEZES, ELIANA W., LIMA, EDER C., *et al.*, 2012). A presença desses sinais é um indicativo da pequena proporção de grupos cloropropil não reagentes ainda presentes no  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  (DE MENEZES, ELIANA W., NUNES, MICHAEL R., *et al.*, 2012).

O sinal de deslocamento em 129 ppm (e sua contraparte deslocada em 142,90 ppm) está relacionado ao carbono  $\text{C}_\alpha$  e o sinal em 145,10 ppm (contraparte deslocada em 149,30 ppm) está relacionado a ambos os carbonos  $\text{C}_\beta$  e  $\text{C}_\gamma$  (ALFAYA e GUSHIKEM, 1999; DE MENEZES, ELIANA W., LIMA, EDER C., *et al.*, 2012). Os sinais químicos de  $^{13}\text{C}$  estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  das amostras de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ 

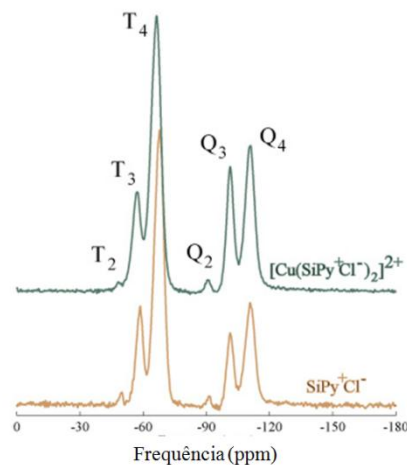
| Ambiente químico | Deslocamento químico (ppm) |  |              |              |
|------------------|----------------------------|--|--------------|--------------|
|                  | $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ | $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ | Referência 1 | Referência 2 |
| 1                | 10,26                      | 18,02  | 9,4          | 10           |
| 2                | 26,72                      | 31,40  | 25,4         | 26           |
| 3                | 48,26                      | —  |              | 49           |
| 3                | 63,94                      | 68,20  | 63,9         | 65           |
| A                | 129,10                     | 142,90   | 129,2        | 129          |
| $\beta, \gamma$  | 145,10                     | 149,30   | 145,1        | 145          |

Fonte: O autor

(\*) Os deslocamentos químicos são apoiados por estudos anteriores que discutem desenvolvimentos químicos semelhantes (não os mesmos); Referência 1 (DE MENEZES, E. W. *et al.*, 2012); Referência 2 (ALFAYA e GUSHIKEM, 1999); As marcações de carbono estão relacionadas ao desenho da estrutura molecular (Figura 13).

Um campo baixo, linha ampla e efeitos de ruído são destacados como outra assinatura coletiva dos deslocamentos químicos  $^{13}\text{C}$  da amostra  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ . Esses efeitos são gerados pela proximidade de átomos eletronegativos na rede de ligação. Qualquer átomo, radical, molécula ou íon induzem um deslocamento químico das linhas espectrais. Neste caso, a presença do íon Cu (II) faz com que as linhas espectrais sejam deslocadas à esquerda do espectro. (JACOBSEN, 2007).

Um típico espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ , apresentado na Figura 14, mostra os sinais de deslocamento obtidos, que estão resumidos na Tabela 2.

Figura 14 - Espectros de RMN (DP-MAS) de  $^{29}\text{Si}$  de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  e  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  no estado sólido

Fonte: O autor



Tabela 2 - Deslocamento químico de RMN de  $^{29}\text{Si}$  de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ 

| Ambiente químico | Deslocamento Químico (ppm) |  |              |              |              |
|------------------|----------------------------|--|--------------|--------------|--------------|
|                  | $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ | $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ | Referencia 1 | Referencia 2 | Referencia 3 |
| T <sub>2</sub>   | -49,87                     | -48,20   |              | -49          | -50          |
| T <sub>3</sub>   | -58,56                     | -57,10   | -57          | -58          | -59          |
| T <sub>4</sub>   | -67,85                     | -66,35   | -65          | -68          | -68          |
| Q <sub>2</sub>   | -91,75                     | -90,80   |              | -86*         | -91          |
| Q <sub>3</sub>   | -101,30                    | -101,30  | -101         | -101         | -101         |
| Q <sub>4</sub>   | -110,80                    | -111,00  | -110         | -110         | -111         |

Fonte: O autor

(\*) Os deslocamentos químicos são apoiados por estudos anteriores que discutem desenvolvimentos químicos semelhantes (não os mesmos); Referencia 1 (RIBICKI *et al.*, 2018); Referencia 2 (ALFAYA e GUSHIKEM, 1999); Referencia 3 (DE MENEZES, E. W. *et al.*, 2012).

Os deslocamentos químicos de  $^{29}\text{Si}$  observados para ambas as amostras são atribuídos ao silício (caractere em negrito) nos seguintes ambientes: o sinal  $^{29}\text{Si}$  do ambiente químico  $\text{R-Si}(\text{OR}')(\text{OH})(\text{OSi}\equiv)$  marcado por T<sub>2</sub> é identificado em -49,87 ppm, onde R' pertence ao esqueleto de celulose (ALFAYA; GUSHIKEM, 1999); O sinal  $^{29}\text{Si}$  do ambiente químico  $\text{RSi}(\text{OH})(\text{OSi}\equiv)_2$  marcado por T<sub>3</sub> é identificado em -58,56 ppm, o sinal  $^{29}\text{Si}$  do ambiente químico  $\text{RSi}(\equiv\text{SiO})_3$  unidade do cluster de silsesquioxano marcado por T<sub>4</sub> é identificado em -67,85 ppm. Esses deslocamentos químicos estão relacionados aos ambientes químicos do tipo T para os núcleos de  $^{29}\text{Si}$ .

Existem outros três ambientes químicos do tipo Q, como pode ser observado para o ambiente químico  $(\equiv\text{SiO})_2\text{Si}(\text{OH})_2$  rotulado como Q<sub>2</sub> a 91,75 ppm e predominantemente dois picos em -101,3 e -110,8 ppm que são atribuídos a sinais de superfície puros e que correspondem a ambientes químicos de  $(\equiv\text{SiO})_3\text{Si}(\text{OH})$  e  $(\equiv\text{SiO})_4\text{Si}$  marcados como Q<sub>3</sub> e Q<sub>4</sub>, respectivamente (RIBICKI, ARIANE CAROLINE *et al.*, 2018).

## 5.2 Atividade antimicrobiana do $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e do $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$

Os diâmetro das zonas de inibição total de crescimento observados, expressos em milímetros (média  $\pm$  desvio padrão), nas diferentes concentrações de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  estão resumidos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Resultados do teste de disco difusão em ágar do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ 

|                              | $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ (%) |                           |                           |              |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|
|                              | 0,5                            | 1                         | 2                         | CP           |
| <i>Staphilococcus aureus</i> | 8,66 ± 1,15 <sup>b</sup>       | 12,33 ± 0,58 <sup>a</sup> | 13,67 ± 1,15 <sup>a</sup> | 19,66 ± 0,58 |
| <i>Escherichia coli</i>      | 12,67 ± 1,52 <sup>a</sup>      | 18 ± 1 <sup>b</sup>       | 22,33 ± 0,6 <sup>c</sup>  | 20 ± 0       |
| <i>Streptococcus mutans</i>  | 11,56 ± 0,57 <sup>a</sup>      | 15,67 ± 0,58 <sup>b</sup> | 18 ± 1 <sup>c</sup>       | 19,66 ± 0,58 |

Fonte: O autor

(\*) Resultados expressos pela média do diâmetro (mm) da zona de inibição (ZI) ± desvio padrão de experimentos independentes em triplicata; CP = controle positivo. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diâmetros da ZI.

Tabela 4 - Resultados do teste de disco difusão em ágar do  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ 

|                              | $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ (%) |                           |                           |              |
|------------------------------|--|---------------------------|---------------------------|--------------|
|                              | 0,5  | 1                         | 2                         | CP           |
| <i>Staphilococcus aureus</i> | 10,67 ± 0,58 <sup>a</sup>                          | 11,33 ± 1,15 <sup>a</sup> | 13,0 ± 1,64 <sup>a</sup>  | 19,66 ± 0,58 |
| <i>Escherichia coli</i>      | 12,0 ± 0,6 <sup>a</sup>                            | 19,33 ± 0,57 <sup>b</sup> | 23,0 ± 1,0 <sup>c</sup>   | 20 ± 0       |
| <i>Streptococcus mutans</i>  | 12,33 ± 1,15 <sup>a</sup>                          | 16,0 ± 1,0 <sup>b</sup>   | 19,67 ± 0,57 <sup>c</sup> | 19,66 ± 0,58 |

Fonte: O autor

(\*) Resultados expressos pela média do diâmetro (mm) da zona de inibição (ZI) ± desvio padrão de experimentos independentes em triplicata; CP = controle positivo. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diâmetros da ZI.

Em geral,  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  proporcionou um efeito antibacteriano notável contra as bactérias testadas. Na concentração mais alta (2 %) a atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. mutans* foi semelhante à observada para o controle positivo. A funcionalização do cobre não apresentou efeito incremental sobre a atividade antimicrobiana. O efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano foi dependente da dose para as três concentrações testadas.

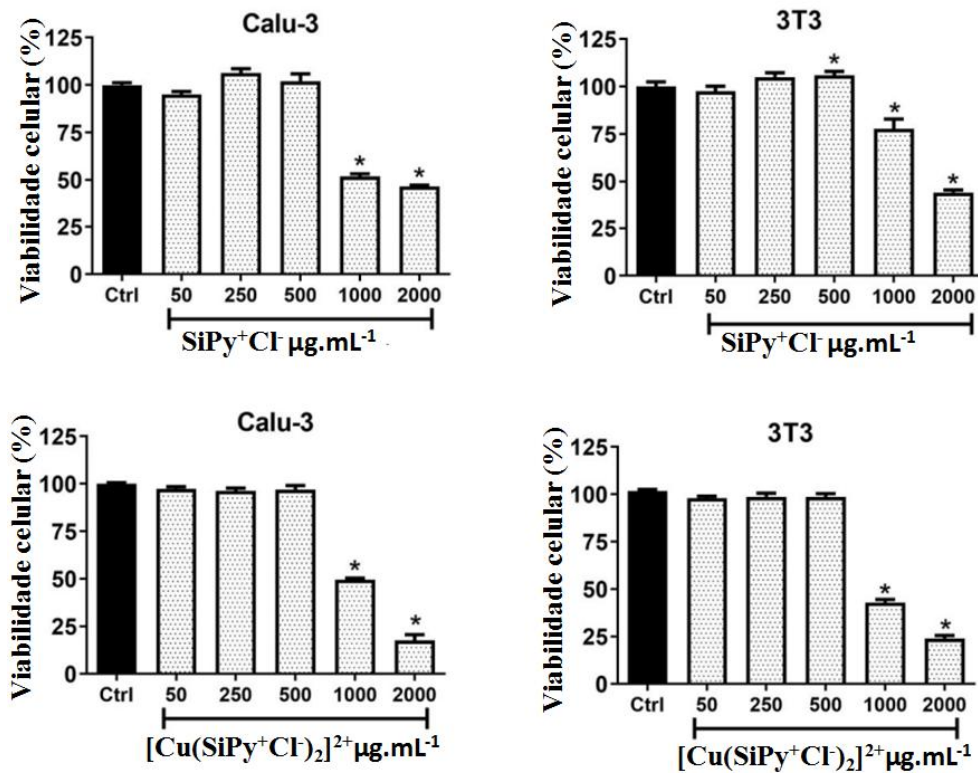
O sal de amônio quaternário e os íons de cobre podem causar a morte bacteriana. O  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e o  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  causam o rompimento da membrana celular através da ligação de seus cátions de amônio a sítios aniônicos na camada externa das bactérias. O cobre pode se ligar a grupos amina e carboxílicos na superfície do microorganismo modificando suas membranas celulares (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Essa interação rompe as camadas lipídicas circundantes e desencadeia o extravazamento de conteúdo intracelular (JIAO *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2021).

Como controle negativo, neste teste, foi utilizado o adesivo sem a incorporação dos compostos, não houve zona de inibição de crescimento.

### 5.3 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A fim de projetar novas estratégias para o manejo da aderência e colonização microbiana no meio bucal, é essencial investigar a citocompatibilidade desses materiais (RUDNIK *et al.*, 2020; STERZENBACH *et al.*, 2020). Neste sentido, a Figura 15 representa a viabilidade celular de linhagens celulares Calu-3 e 3T3 pelo ensaio MTT após seu tratamento com  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  em diferentes concentrações, por 72 h.

Figura 15 – Resultados da viabilidade celular em Calu-3 e 3T3 após tratamento com o  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$



Fonte: O autor

(\*) Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos independentes (n = 16). Os asteriscos denotam níveis de significância em relação ao controle, p < 0,05.

O  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  proporcionou uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular para ambas as linhagens celulares Calu-3 (43% e 45%) e 3T3 (22% e 56%) em concentrações de 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A funcionalização com cobre demonstrou o mesmo efeito citotóxico para  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ , reduzindo a viabilidade celular em 1000 e 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Assim, a presença de cobre não afetou a citotoxicidade em relação à matéria-prima nas mesmas condições.

Os adesivos autocondicionantes dentários são geralmente tóxicos para as células pulpares, resultando em uma diminuição de 26-35 % na atividade metabólica celular. LANZA *et al.* (2009) avaliaram através do MTT a difusão transdentária e a citotoxicidade de adesivos autocondicionantes comercialmente disponíveis contra células odontoblásticas. Observou-se que a redução da viabilidade celular promovida pelos sistemas autocondicionantes variou de 28 a 48%.

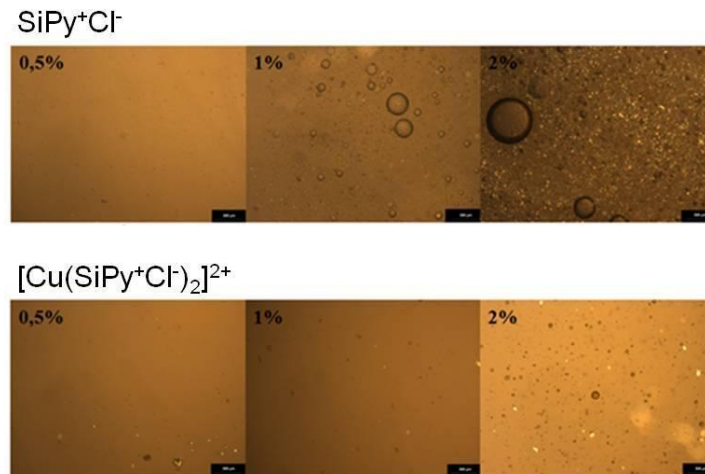
Diversos estudos têm sido aplicados para avaliar a citotoxicidade de sistemas adesivos e seus componentes. Esses materiais não devem ter efeitos prejudiciais sobre as estruturas dentárias, apresentando biocompatibilidade aliada à durabilidade (ŞENGÜN *et al.*, 2011) e sendo capazes de evitar infiltração bacteriana e selar cáries dentárias (CAVALCANTI *et al.*, 2010). No entanto, o contato direto dos sistemas adesivos sobre o tecido pulpar deve ser evitado, pois isto pode provocar uma reação inflamatória intensa e persistente sobre as células (CAVALCANTI *et al.*, 2010; ELIAS *et al.*, 2015).

Através do padrão de morte celular, pode-se avaliar a citotoxicidade dos materiais. As células apoptóticas são removidas por fagocitose, ocasionando uma moderada resposta inflamatória, sendo a necrose causadora de uma resposta inflamatória mais grave e danos para os tecidos circundantes (BIANCHI *et al.*, 2013). Pode-se então, após esses testes, direcionar os cuidados que devem ser realizados na utilização e aplicação desses materiais em procedimentos clínicos (COSTA e HEBLING, 2013).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA HOMOGENEIDADE DO ADESIVO

Após incorporação das diferentes concentrações do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e do  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  aos adesivos observou-se que seu aspecto se manteve homogêneo e translúcido, não sendo evidenciada separação de fases, como mostra a Figura 16.

Figura 16 - Imagem das diferentes concentrações de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  incorporadas ao adesivo



Fonte: O autor

## 5.5 TESTES DE SUSCETIBILIDADE IN VITRO

### 5.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos adesivos contendo $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ e $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$

Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição total de crescimento, zona de inibição (ZI) expressa em milímetros (média  $\pm$  desvio padrão), obtidos com os adesivos contendo diferentes concentrações de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  estão resumidos nas Tabelas 5 e 6. Todos adesivos experimentais avaliados (0,5 %, 1 % e 2 %) apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microorganismos representantes gram positivo (*Staphilococcus epidermidis*) e negativo (*Escherichia coli*) testados.

Tabela 5 - Resultados do teste de disco difusão em ágar dos adesivos experimentais contendo  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$

| Microorganismo               | $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$   |                               |                               | CP |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----|
|                              | 0,50%                        | 1%                            | 2%                            |    |
| <i>Staphilococcus aureus</i> | 10 $\pm$ 1 <sup>a</sup>      | 10,66 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup> | 12,66 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup> | 19 |
| <i>Escherichia coli</i>      | 8,33 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup> | 9,66 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>  | 13,33 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup> | 20 |
| <i>Streptococcus mutans</i>  | 6,66 $\pm$ 0,57              | 7,67 $\pm$ 0,57               | 11,33 $\pm$ 0,57              | 0  |

Fonte: O autor

Resultados expressos pela média  $\pm$  desvio padrão; CP = controle positivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diâmetros das ZI.

Tabela 6 - Resultados do teste de disco difusão em ágar dos adesivos experimentais contendo  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$

| Microorganismo               | $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ |                    |                   |    |
|------------------------------|--|--------------------|-------------------|----|
|                              | 0,50 %   | 1 %                | 2 %               | CP |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | $10,67 \pm 0,58^a$                             | $11,33 \pm 1,15^a$ | $13,0 \pm 2,64^a$ | 19 |
| <i>Escherichia coli</i>      | $8,0 \pm 0^a$                                  | $9,33 \pm 0,57^a$  | $14,0 \pm 1,0^b$  | 20 |
| <i>Streptococcus mutans</i>  | $7,33 \pm 0,57$                                | $8,66 \pm 0,57$    | $11,33 \pm 0,57$  | 19 |

Fonte: O autor

Resultados expressos pela média  $\pm$  desvio padrão; CP = controle positivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diâmetros das ZI.

Não foi observada diferença estatística significativa entre os halos de inibição de crescimento total de *Staphylococcus aureus* apresentados pelos adesivos experimentais nas diferentes concentrações de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .

Os adesivos experimentais contendo 2 %  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  apresentaram halos de inibição de crescimento total de *Escherichia coli* maiores, com diferença estatística significativa, quando comparados aos halos de inibição formados pelos adesivos com concentrações de 0,5 e 1 %.

Em nenhuma das concentrações, de ambos os adesivos experimentais testados, houve inibição do crescimento de *Candida albicans sp.*

## 5.6 Testes mecânicos e grau de conversão

### 5.6.1 Análise do grau de conversão dos sistemas adesivos *in vitro*

O grau de conversão depende da composição química e das condições de polimerização (BAROUDI *et al.*, 2007) e afeta a estabilidade química (PONGPRUEKSA *et al.*, 2018), propriedades mecânicas e comportamento biológico dos sistemas adesivos (SANTERRE *et al.*, 2001).

Os valores médios, obtidos por meio de micro-Raman, do grau de conversão, em %, e respectivos desvios-padrão dos adesivos incorporados com  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Grau de conversão obtido dos adesivos experimentais contendo  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ 

| <b>Adesivo</b> | <b>GC <math>\pm</math> dp</b> |
|----------------|-------------------------------|
| 0 % (controle) | 75,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>   |
| 0,5 %          | 74,3 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>   |
| 1,0 %          | 75,1 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>   |
| 2,0 %          | 73,0 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>   |

Fonte: O autor

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais indicam resultados estatisticamente similares (ANOVA, seguida de Tukey,  $p \geq 0,05$ ).

Não houve diferença estatística significativa entre o adesivo controle (0 %) e os adesivos experimentais nas diferentes concentrações analisadas.

Os valores médios, obtidos por meio de micro-Raman, do grau de conversão, em %, e os respectivos desvios-padrão dos adesivos incorporados com  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Grau de conversão obtido dos adesivos experimentais contendo  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ 

| <b>Adesivo</b> | <b>GC <math>\pm</math> dp</b> |
|----------------|-------------------------------|
| 0 % (controle) | 75,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>   |
| 0,50 %         | 83,6 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>   |
| 1,0 %          | 82,3 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>   |
| 2,0 %          | 82,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>   |

Fonte: O autor

(\*) Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (ANOVA, seguida de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Foi observada diferença estatística significativa quando comparado o adesivo controle (0%) aos adesivos contendo  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ , que apresentaram valores médios mais elevados. Entretanto, os valores do grau de conversão dos adesivos experimentais mostraram-se estatisticamente semelhantes, independentemente da concentração do composto presente no adesivo.

### 5.6.2 Teste de resistência máxima à tração

Os resultados da média de resistência em MPa e desvios padrão, testados após 24 h (IM) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 9 - Resistência máxima à tração dos grupos controle,  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  no tempo imediato

| <b>Adesivo</b>  | <b>24 horas</b>    |
|---|--------------------|
| <b>controle (0 %)</b>   | $27,9 \pm 2,53^a$  |
| <b><math>\text{SiPy}^+\text{Cl}^-</math></b>                  |                    |
| <b>0,5 %</b>  | $30,39 \pm 5,21^a$ |
| <b>1,0 %</b>  | $31,19 \pm 3,49^a$ |
| <b>2,0 %</b>  | $32,93 \pm 3,42^a$ |
| <b><math>\text{SiPy}^+\text{Cl}^- - \text{Cu}^{2+}</math></b> |                    |
| <b>0,5 %</b>  | $28,63 \pm 4,02^a$ |
| <b>1,0 %</b>  | $29,96 \pm 3,84^a$ |
| <b>2,0 %</b>  | $31,48 \pm 4,97^a$ |

Fonte: O autor

(\*) Letras iguais indicam resultados estatisticamente semelhantes (ANOVA, seguida de Tukey,  $p \geq 0,05$ ).

Não foi observada diferença estatística significativa nos resultados obtidos quando comparados os adesivos experimentais testados entre si e também em relação ao controle.



## 5.7 AVALIAÇÕES IN SITU

### 5.7.1 Grau de conversão

Na Tabela 10 apresentam-se os valores de média e desvio padrão do grau de conversão dos diferentes sistemas adesivos avaliados.

Tabela 10 – Grau de conversão (GC, %) dos adesivos experimentais no tempo imediato

| <b>Adesivo</b>   | <b>GC (%)</b>              |
|--|----------------------------|
| <b>Controle</b>  | 40,94 ± 1,61 <sup>a</sup>  |
| <b>SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup></b>                                |                            |
| <b>0,5 %</b>   | 31,20 ± 3,69 <sup>b</sup>  |
| <b>1,0 %</b>   | 35,84 ± 6,57 <sup>ab</sup> |
| <b>2,0 %</b>   | 34,05 ± 7,93 <sup>ab</sup> |
| <b>[Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup></b> |                            |
| <b>0,5 %</b>   | 50,64 ± 2,80 <sup>c</sup>  |
| <b>1,0 %</b>   | 42,86 ± 5,06 <sup>c</sup>  |
| <b>2,0 %</b>   | 40,38 ± 8,18 <sup>a</sup>  |

Fonte: O autor

(\*) Valores expressos como média (%) ± desvio padrão. Letras iguais indicam valores estatisticamente semelhantes (ANOVA, seguida de Tukey,  $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados obtidos, a maior média (50,64 % ± 2,80) foi observada no adesivo contendo 0,5 % de [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> e a menor média (31,20 % ± 3,69) foi observada no adesivo contendo 0,5 % de SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, ambos apresentaram diferença estatística significativa quando comparados entre si e ao grupo controle (40,94 % ± 1,61).

Os adesivos contendo 1 e 2 %, tanto de SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> quanto de [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, apresentaram-se estatisticamente semelhantes quando comparados ao adesivo controle. Quando a comparação foi feita entre os adesivos do mesmo grupo, os valores de GC apresentaram-se estatisticamente semelhantes para as diferentes concentrações de SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>. Por outro lado, no grupo de [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, as concentrações de 0,5 e 1 % mostraram-se semelhantes quando comparadas entre si, mas ambas diferiram com significância estatística quando comparados ao adesivo de 2 %.

### 5.7.2 Resistência de união à microtração (RU)

Os valores de resistência de união à microtração estão expressos na tabela 11.

Tabela 11 – Resistência de união à microtração dos adesivos experimentais

| <b>Adesivo</b>   | <b>RU (MpA)</b>           |
|--|---------------------------|
| <b>Controle</b>  | 31,90 ± 3,96 <sup>a</sup> |
| <b>SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup></b>                                |                           |
| <b>0,5 %</b>   | 28,90 ± 5,65              |
| <b>1,0 %</b>   | 31,60 ± 7,21              |
| <b>2,0 %</b>   | 29,69 ± 5,17              |
| <b>[Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup></b> |                           |
| <b>0,5 %</b>   | 22,16 ± 5,95 <sup>a</sup> |
| <b>1,0 %</b>   | 23,24 ± 2,46 <sup>a</sup> |
| <b>2,0 %</b>   | 20,88 ± 5,73 <sup>a</sup> |

Fonte: O autor

Resultado expresso como média (MpA) ± desvio padrão, letras iguais representam diferença estatística significativa (ANOVA, seguida de Tukey,  $p \geq 0,05$ ).

Foi constatado que não houve variação estatisticamente significativa nos valores de RU dos diferentes adesivos contendo SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> quando comparados ao grupo controle. As pequenas alterações na composição do adesivo provavelmente não são relevantes o suficiente para se traduzir em uma diferença significativa na resistência de união imediata.

Apesar disso, deve-se notar a redução estatisticamente significativa dos valores de RU nos adesivos contendo [Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> em relação ao grupo controle.

Os sistemas adesivos universais apresentam desempenhos diferentes na adesão à dentina quando comparados entre si. A capacidade de união dos adesivos universais e os modos de falha são dependentes do material. Ainda, em alguns casos observam-se diferenças entre a capacidade de união dentinária dos adesivos universais em relação aos materiais padrão ouro (CARDOSO *et al.*, 2019).

É provável que essas diferenças possam ser importantes na adesão em longo prazo, o que deve ser avaliado. Sobretudo, a maioria dos autores concorda que a avaliação da resistência de união à microtração é fundamental para avaliar a resistência de união e, conseqüentemente, a possível longevidade da união resina-dentina (CHEN *et al.*, 2022).

Os padrões de fratura (RU) para dentina e esmalte estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Padrão de fratura da interface adesiva

| Adesivo  | PF (%) |      |     |      |     |     |     |
|--|--------|------|-----|------|-----|-----|-----|
|  | A      | R    | D   | CD   | CR  | M   | P   |
| <b>Controle</b>  | 80,40  | 10,9 | 6,5 |      |     |     |     |
| <b>SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup></b>                                |        |      |     |      |     |     |     |
| <b>0.5 %</b>   | 95,60  | 2,20 |     |      |     |     |     |
| <b>1.0 %</b>   | 97,70  | 2,30 |     |      |     |     |     |
| <b>2.0 %</b>   | 100,00 |      |     |      |     |     |     |
| <b>[Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup></b> |        |      |     |      |     |     |     |
| <b>0.5 %</b>   | 96,60  |      |     | 3,40 |     |     |     |
| <b>1.0 %</b>   | 89,6   |      |     | 2,6  | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| <b>2.0 %</b>   | 96,3   |      |     | 3,70 |     |     |     |

Fonte: O autor

(\*) Resultados expressos em porcentagem; A = adesiva, R = resina, D = dentina, CD = coesão em dentina, CR = coesão em resina, M = mista, P = palito

As fraturas adesivas predominaram em todos os grupos e não ocorreram falhas pré-teste. Embora atualmente os sistemas adesivos tenham sido significativamente melhorados, a interface adesiva continua sendo a área mais fraca das restaurações resinosas (CHEN *et al.*, 2022).

### 5.7.3 Análise de Nanoinfiltração

As médias de nanoinfiltração (%) e os respectivos desvios-padrão estão representados na Tabela 13, para cada sistema adesivo e para cada grupo.

Tabela 13 – Nanoinfiltração obtida dos adesivos experimentais

| <b>Adesivo</b>   | <b>N (%)</b>              |
|--|---------------------------|
| <b>Controle</b>  | 6,90 ± 2,06               |
| <b>SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup></b>                                |                           |
| <b>0,5 %</b>   | 13,27 ± 1,44 <sup>a</sup> |
| <b>1,0 %</b>   | 8,05 ± 2,19               |
| <b>2,0 %</b>   | 2,85 ± 0,49 <sup>a</sup>  |
| <b>[Cu(SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup></b> |                           |
| <b>0,5 %</b>   | 4,85 ± 0,58               |
| <b>1,0 %</b>   | 5,92 ± 2,22               |
| <b>2,0 %</b>   | 4,90 ± 2,33               |

Fonte: O autor

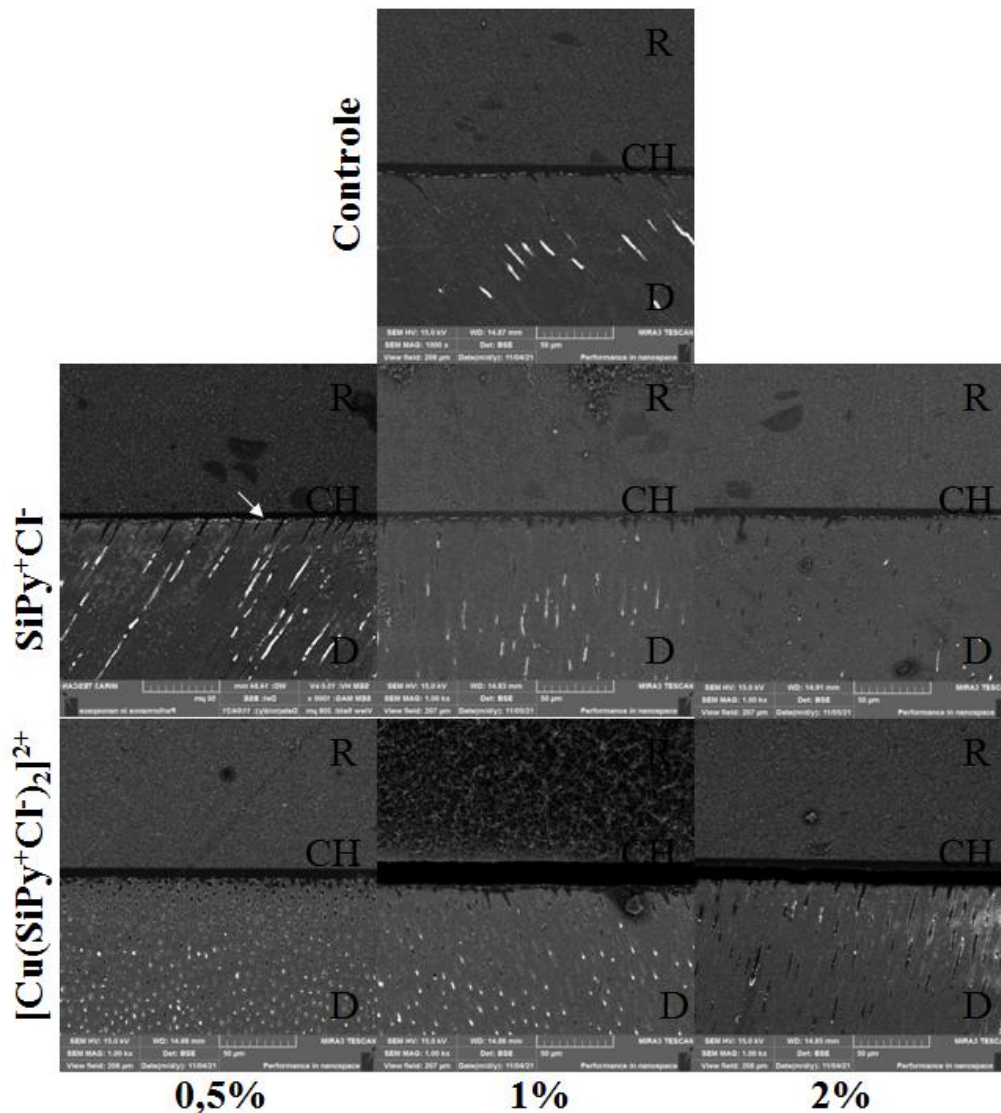
Resultados expressos em média (%) ± desvio padrão; letras iguais representam diferença estatística significativa (Kruskal-Wallis seguido de Dun,  $p < 0,05$ )

Uma vez que os resultados não apresentaram normalidade de distribuição de valores e que a variância não foi homogênea, para detectar as diferenças entre os grupos quanto à nanoinfiltração (quantitativo) optou-se por realizar teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney e, pós-teste de Dunn.

Os adesivos de SiPy<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> nas concentrações 0,5 % e 2,0 % apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados entre si. Os demais adesivos experimentais avaliados obtiveram porcentagens de nanoinfiltração semelhantes, sem diferenças estatísticas significativas.

As imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da camada híbrida, formada pelos sistemas adesivos sobre dentina humana, avaliadas quanto à nanoinfiltração em tempo imediato são apresentadas na Figura 17.

Figura 17 - Imagens (MEV) representativas da interface de união à dentina, obtidas em cada condição experimental, no tempo imediato



Fonte: O autor

(\*) R = resina; CH = camada híbrida; D = dentina; a seta indica a deposição de nitrato de prata

A nanoinfiltração foi manifestada em extensão variável no interior das camadas híbridas avaliadas. Ainda, observou-se que as nanoporosidades estavam presentes na base da camada híbrida, ou seja, na dentina desmineralizada e não preenchida completamente durante o procedimento de união.

Estudos morfológicos mostram que a resistência adesiva e a habilidade de selamento dos sistemas adesivos não estão relacionadas à espessura da camada híbrida, mas sim à qualidade do substrato dentinário (MIYAZAKI *et al.*, 2003).

## 6 CONCLUSÕES

A síntese e funcionalização do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  foi realizada de forma satisfatória, como verificado pela caracterização por IVTF e RMN.

A atividade antimicrobiana do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  foram confirmadas pelos testes de disco difusão em ágar realizados frente aos microorganismos *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus*. Entretanto, não apresentaram atividade antifúngica (*Candida albicans*).

Nos testes de viabilidade celular o  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  mostraram-se citotóxicos para as linhagens celulares testadas apenas em concentrações superiores a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Os testes devem ser realizados também nos adesivos após a incorporação do composto.

Diante dos resultados obtidos, nota-se que a incorporação do  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e do  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  ao sistema adesivo universal não alterou sua homogeneidade, sem evidenciação de separação de fases nas soluções.

Os adesivos experimentais apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microorganismos gram positivos e gram negativos testados. Novos testes que contribuam para elucidar o perfil antimicrobiano dos adesivos experimentais, como o de formação de biofilme e concentração inibitória mínima, deverão ser realizados.

Não houve diferença no GC das diferentes concentrações dos adesivos experimentais contendo  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$ , mesmo quando comparados ao controle e avaliados *in vitro*. Os adesivos contendo  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  apresentaram maiores valores médios de GC quando comparados ao controle, embora estatisticamente semelhantes entre si nas diferentes concentrações testadas. Na avaliação do GC *in situ*, os resultados foram semelhantes ao controle para os adesivos nas concentrações de 1 % e 2 % de  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  e de  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$ .

Os testes mecânicos de resistência máxima à tração mostraram que a incorporação dos compostos ao adesivo Ambar universal não comprometeu suas características mecânicas. Deve ser avaliado se esta característica se mantém ao longo do tempo.

Foi constatado pela avaliação *in situ* de RU que não houve variação entre os diferentes adesivos contendo  $\text{SiPy}^+\text{Cl}^-$  quando comparados ao grupo controle. Apesar disso, notou-se redução de RU nos adesivos contendo  $[\text{Cu}(\text{SiPy}^+\text{Cl}^-)_2]^{2+}$  em relação ao grupo controle. Os padrões de fratura foram avaliados e em todos os grupos predominaram as fraturas adesivas.

Considerando as limitações do estudo, os resultados mostram que esta incorporação pode ser uma opção adequada pelas propriedades físicas, mecânicas e biológicas

apresentadas. Entretanto, a continuidade da avaliação do perfil antimicrobiano dos adesivos experimentais e testes mecânicos para avaliar a manutenção de suas características em longo prazo devem ser considerados.

## REFERÊNCIAS

- ALFAYA, R.V.S.; GUSHIKEM, Y.; ALFAYA, A.A., **Processo de preparação do polieletrólito cloreto de 3-n-propilpiridínio ligado a uma estrutura de silsesquioxano**, Patente INPI No. PI9803053-1, 1998 (BR 9803053-A, 2001).
- ALFAYA, R. V. S. *et al.* Ion Selective Electrode for Potentiometric Determination of Saccharin Using a Thin Film of Silsesquioxane 3-n-Propylpyridinium Chloride Polymer Coated-Graphite Rod. **Analytical Letters**, v. 33, n. 14, p. 2859-2871, 2000/01/01 2000.
- ALFAYA, R. V. S.; GUSHIKEM, Y. Aluminum Oxide Coated Cellulose Fibers Modified with n-Propylpyridinium Chloride Silsesquioxane Polymer: Preparation, Characterization, and Adsorption of Some Metal Halides from Ethanol Solution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 213, n. 2, p. 438-444, 1999/05/15/ 1999.
- ALPER, M. *et al.* Assessment of antioxidant and cytotoxic Activities and Identification of Phenolic Compounds of *Centaurea solstitialis* and *Urospermum picroides* from Turkey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 2021.
- ANCHIETA, R. B. *et al.* Effect of partially demineralized dentin beneath the hybrid layer on dentin-adhesive interface micromechanics. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 4, p. 701-7, Feb 26 2015.
- ARENDSSEN, L. P.; THAKAR, R.; SULTAN, A. H. The Use of Copper as an Antimicrobial Agent in Health Care, Including Obstetrics and Gynecology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, Sep 18 2019.
- ARENDSSEN, L. P. *et al.* Impact of copper compression stockings on venous insufficiency and lipodermatosclerosis: A randomised controlled trial. **Phlebology**, v. 34, n. 4, p. 224-230, May 2019.
- BAKRY, A. S. *et al.* Effect of Er: YAG laser treatment on the microstructure of the dentin/adhesive interface after acid-base challenge. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 9, n. 6, p. 513, 2007.
- BAPNA, M. S.; MURPHY, R.; MUKHERJEE, S. Inhibition of bacterial colonization by antimicrobial agents incorporated into dental resins. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 15, n. 5, p. 405-11, Sep 1988.
- BAROUDI, K. *et al.* Shrinkage behaviour of flowable resin-composites related to conversion and filler-fraction. **Journal of Dentistry**, v. 35, n. 8, p. 651-655, 2007/08/01/ 2007.
- BARRON, P. F. *et al.* Detection of two silicon environments in kaolins by solid-state <sup>29</sup>Si NMR. **Nature**, v. 302, n. 5903, p. 49-50, 1983/03/01 1983.
- BEDRAN-RUSSO, A. *et al.* An overview of dental adhesive systems and the dynamic tooth-adhesive interface. **Dental Clinics**, v. 61, n. 4, p. 713-731, 2017.
- BENVENUTTI, E. V. *et al.* Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, p. 1926-1933, 2009.



- BETANCOURT, D.; BALDION, P.; CASTELLANOS, J. Resin-dentin bonding interface: Mechanisms of degradation and strategies for stabilization of the hybrid layer. **International journal of biomaterials**, v. 2019, 2019.
- BI, Y.-T.; LI, Z.-J.; LIU, T.-S. Preparation and characterization of Octa(aminophenyl)silsesquioxane–aldehyde organic/inorganic hybrid aerogel. **European Polymer Journal**, v. 58, p. 201-206, 2014/09/01/ 2014.
- BIANCHI, L. *et al.* Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 101, n. 8, p. 1498-1507, 2013.
- CARDOSO, G. C. D. *et al.* Bond stability of universal adhesives applied to dentin using etch-and-rinse or self-etch strategies. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, p. 467-475, 2019.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.; DE MELO CARRASCO, L. D. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 5, p. 9906-9946, 05/10
- CARVALHO, R. M. *et al.* A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. **Biomaterials**, v. 26, n. 9, p. 1035-42, Mar 2005.
- CAVALCANTI, B. N.; BÄRSCHNEIDER, L. R.; MARQUES, M. M. Cytotoxicity of substances leached from a conventional and a self-etching adhesive system on human pulp fibroblasts Citotoxicidade de substâncias liberadas de sistemas adesivos. **Braz Dent Sci**, v. 13, n. 2, p. 10-14, 2010.
- CHEN, H. *et al.* Comparison of bond strength of universal adhesives using different etching modes: A systematic review and meta-analysis. **Dental Materials Journal**, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2022.
- CHEN, L.; SHEN, H.; SUH, B. I. Antibacterial dental restorative materials: a state-of-the-art review. **American Journal of Dentistry**, v. 25, n. 6, p. 337-346, 2012.
- CIRIMINNA, R. *et al.* The Sol-Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. **Chemical Reviews**, v. 113, 06/19 2013a.
- CIRIMINNA, R. *et al.* The Sol–Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 8, p. 6592-6620, 2013/08/14 2013b.
- CLSI, C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical Lab Standards Institute**, 2016.
- COSTA, C. A. D. S.; HEBLING, J. Avaliação in vitro de sistemas adesivos de dentina aplicados sobre células odontoblastóides. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 1, p. 97-106, 2013.
- DA SILVA LIMA, A. *et al.* O papel do 10-MDP no processo da adesão. **Revista Eletrônica Acervo Odontológico**, v. 3, p. e5759-e5759, 2021.
- DABBAGH, S. *et al.* Effect of Intraoral Humidity on Dentin Bond Strength of Two Universal Adhesives: An In Vitro Preliminary Study. **Coatings**, v. 12, n. 5, p. 712, 2022.

- DAVEY, H.; EMBERY, G. Metal ions in oral hygiene products. **Clinical and Biological Aspects of Dentifrices**. pp165-172. New York: Oxford Medical Publications, p. 416-424, 1992.
- DE MENEZES, E. W. *et al.* Ionic silica based hybrid material containing the pyridinium group used as an adsorbent for textile dye. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 378, n. 1, p. 10-20, Jul 15 2012.
- DE MENEZES, E. W. *et al.* Ionic silica based hybrid material containing the pyridinium group used as an adsorbent for textile dye. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 378, n. 1, p. 10-20, 2012/07/15/ 2012.
- DE MENEZES, E. W. *et al.* Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO<sub>2</sub> surface applied on the electrooxidation of nitrite. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 12, p. 3703-3713, 2012/12/01 2012.
- DE MUNCK, J. *et al.* A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 2, p. 118-32, Feb 2005.
- DIONYSOPOULOS, D.; GERASIMIDOU, O.; PAPADOPOULOS, C. Current modifications of dental adhesive systems for composite resin restorations: a review in literature. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 36, n. 5, p. 453-468, 2022.
- ELIAS, S. T. *et al.* Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, n. 2, p. 160-168, 2015.
- FEUERSTEIN, O. *et al.* Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, n. 3, p. 349-354, 2007/03/01/ 2007.
- FEUERSTEIN, O. *et al.* Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **Journal of the American Dental Association**, v. 138, n. 3, p. 349-54; quiz 396-8, Mar 2007.
- FOLEY, J.; BLACKWELL, A. Ion release from copper phosphate cement and influence on *Streptococcus mutans* growth in vitro: a comparative study. **Caries Research**, v. 37, n. 6, p. 416-424, 2003.
- FUJIWARA, S. T. *et al.* Adsorption of FeCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub> and ZnCl<sub>2</sub> on silsesquioxane 3-n-propylpyridiniumchloride polymer film adsorbed on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> coated silica gel. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 178, n. 1, p. 135-141, 2001/03/15/ 2001.
- FUJIWARA, S. T.; PESSÔA, C. A.; GUSHIKEM, Y. Copper (II) tetrasulpho-phthalocyanine entrapped in a propylpyridiniumsilsesquioxane polymer immobilized on a SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> surface: use for eletrochemical oxidation of ascorbic acid. **Analytical Letters**, v. 35, n. 7, p. 1117-1134, 2002/07/22 2002.
- GARCIA-GODOY, F. *et al.* Long-term degradation of enamel and dentin bonds: 6-year results in vitro vs. in vivo. **Dental Materials**, v. 26, n. 11, p. 1113-1118, 2010.
- GURGAN, S.; BOLAY, S.; KIREMITCI, A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 26, n. 10, p. 836-40, Oct 1999.

- GUSHIKEM, Y.; BENVENUTTI, E. V.; KHOLIN, Y. V. Synthesis and applications of functionalized silsesquioxane polymers attached to organic and inorganic matrices. **Pure and Applied Chemistry**, v. 80, n. 7, p. 1593-1611, 2008.
- GUTIÉRREZ, M. F. *et al.* The role of copper nanoparticles in an etch-and-rinse adhesive on antimicrobial activity, mechanical properties and the durability of resin-dentine interfaces. **Journal of Dentistry**, v. 61, p. 12-20, 2017.
- GUZMAN-ARMSTRONG, S.; ARMSTRONG, S.; QIAN, F. Relationship between nanoleakage and microtensile bond strength at the resin-dentin interface. **Operative Dentistry**, v. 28, n. 1, p. 60-66, 2003.
- HANABUSA, M. *et al.* Bonding effectiveness of a new 'multi-mode' adhesive to enamel and dentine. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 6, p. 475-484, 2012.
- HASHIMOTO, M. *et al.* Ten-years degradation of resin-dentin bonds. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 4, p. 404-10, Aug 2010.
- HASHIMOTO, M. *et al.* In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1385-91, Jun 2000.
- HASHIMOTO, M *et al.* Resin-tooth adhesive interfaces after long-term function. **American Journal of Dentistry**, v. 14, n. 4, p. 211-5, Aug 2001.
- HUANG, B. *et al.* Biodegradation of resin–dentin interfaces is dependent on the restorative material, mode of adhesion, esterase or MMP inhibition. **Dental Materials**, v. 34, n. 9, p. 1253-1262, 2018.
- IMAZATO, S. *et al.* Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. **Biomaterials**, v. 20, n. 9, p. 899-903, May 1999.
- IMAZATO, S. *et al.* Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion-promoting monomer. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 39, n. 4, p. 511-5, Mar 15 1998.
- IMAZATO, S. *et al.* Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. **Dental Materials**, v. 19, n. 4, p. 313-9, Jun 2003.
- IMAZATO, S. *et al.* In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. **Dental Materials**, v. 22, n. 6, p. 527-32, Jun 2006.
- JACOBSEN, N. E. **NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology**. John Wiley & Sons, 2007. ISBN 0470173343.
- JAFFRÈS, P.-A.; E. MORRIS, R. Synthesis of highly functionalised dendrimers based on polyhedral silsesquioxane cores †. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, n. 16, p. 2767-2770, 1998.
- JIAO, Y. *et al.* Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. **International journal of oral science**, v. 11, n. 3, p. 28-28, 2019.
- KAWAKAMI, H. *et al.* Antibacterial Properties of Metallic Elements for Alloying Evaluated with Application of JIS Z 2801:2000. **ISIJ International**, v. 48, n. 9, p. 1299-1304, 2008.

- LANZA, C. R. M. *et al.* Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 6, p. 533-543, 2009.
- LU, G.; WU, D.; FU, R. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, n. 4, p. 355-366, 4// 2007.
- LUNG, C. Y. K.; KUKK, E.; MATINLINNA, J. P. Shear bond strength between resin and zirconia with two different silane blends. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 70, n. 5, p. 405-413, 2012/09/01 2012.
- MAGOSSO, H. A. *et al.* Adsorption of metal ions on novel 3-n-propyl (methylpyridinium) silsesquioxane chloride polymers surface: study of heterogeneous equilibrium at the solid-solution interface. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 744-752, 2009.
- MAKVANDI, P. *et al.* Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: A systematic review. **Dental Materials**, v. 34, n. 6, p. 851-867, 2018.
- MANHART, J.; GARCIA-GODOY, F.; HICKEL, R. Direct posterior restorations: clinical results and new developments. **Dental Clinics of North America**, v. 46, n. 2, p. 303-39, Apr 2002.
- MANHART, J.; GARCÍA-GODOY, F.; HICKEL, R. Direct posterior restorations: clinical results and new developments. **Dental Clinics**, v. 46, n. 2, p. 303-339, 2002.
- MATHEWS, S.; KUMAR, R.; SOLIOZ, M. Copper Reduction and Contact Killing of Bacteria by Iron Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6399-6403, 2015.
- MATINLINNA, J. P.; LUNG, C. Y. K.; TSOI, J. K. H. Silane adhesion mechanism in dental applications and surface treatments: A review. **Dental Materials**, v. 34, n. 1, p. 13-28, Jan 2018.
- MIYAZAKI, M. *et al.* Determination of residual double bonds in resin–dentin interface by Raman spectroscopy. **Dental Materials**, v. 19, n. 3, p. 245-251, 2003.
- MOEN, B. *et al.* Subminimal inhibitory concentrations of the disinfectant benzalkonium chloride select for a tolerant subpopulation of Escherichia coli with inheritable characteristics. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 4, p. 4101-23, 2012.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 4: EPSJV 2009.**
- MÜLLER, C. *et al.* Titania–silica epoxidation catalysts modified by polar organic functional groups. **Journal of Catalysis**, v. 189, n. 1, p. 221-232, 2000.
- MUXEL, A. *et al.* Silsesquioxane 3-n-Propylpyridinium Chloride: A New Polymer for the Potentiometric Analysis of Cr(VI) in Electroplating and Leather Industry Wastes. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 18, p. 572-576, 01/01 2007.
- NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 265-73, May 1982.

- OPPERMANN, R. V.; JOHANSEN, J. R. Effect of fluoride and non-fluoride salts of copper, silver and tin on the acidogenicity of dental plaque in vivo. **European Journal of Oral Sciences**, v. 88, n. 6, p. 476-480, 1980.
- PERDIGÃO, J. *et al.* In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 14, n. 1, p. 31-38, 2002.
- PERDIGAO, J.; SEZINANDO, A.; MONTEIRO, P. C. Laboratory bonding ability of a multi-purpose dentin adhesive. **American Journal of Dentistry**, v. 25, n. 3, p. 153-8, Jun 2012.
- PLUEDDEMANN, E. P. Adhesion Through Silane Coupling Agents. **The Journal of Adhesion**, v. 2, n. 3, p. 184-201, 1970/07/01 1970.
- PONGPRUEKSA, P. *et al.* Polymerization efficiency affects interfacial fracture toughness of adhesives. **Dental Materials**, v. 34, n. 4, p. 684-692, 2018/04/01/ 2018.
- PUPPO, Y. M. *et al.* An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 24, n. 12, p. 1443-1458, 2013.
- RIBICKI, A. C. *et al.* Sol gel synthesis of 3-n-propyl(4-aminomethyl)pyridinium silsesquioxane chloride and the enhanced electrocatalytic activity of LbL films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 87, n. 1, p. 216-229, 2018/07/01 2018.
- RIBICKI, A. C. *et al.* Synthesis and Characterization of Hybrid Polymer Based on Functionalized Silica as Efficient Adsorbent for Heavy Metal Ions from Aqueous Solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 2049-2057, 2020.
- ROSA, W. L. D. O. D.; PIVA, E.; SILVA, A. F. D. Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 7, p. 765-776, 2015/07/01/ 2015.
- RUDNIK, L. A. C. *et al.* Co-loaded curcumin and methotrexate nanocapsules enhance cytotoxicity against non-small-cell lung cancer cells. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1913, 2020.
- SALZ, U.; BOCK, T. Testing adhesion of direct restoratives to dental hard tissue-a review. **Journal of Adhesive Dentistry**, v. 12, n. 5, 2010.
- SANTERRE, J. P.; SHAJII, L.; LEUNG, B. W. Relation of Dental Composite Formulations To Their Degradation and the Release of Hydrolyzed Polymeric-Resin-Derived Products. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 12, n. 2, p. 136-151, 2001.
- ŞENGÜN, A. *et al.* Cytotoxicity evaluation of dentin bonding agents by dentin barrier test on 3-dimensional pulp cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 112, n. 3, p. e83-e88, 2011.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2005. x, 502 p. ISBN 0471393622 (acid-free paper)
- SOUSA, B. C. *et al.* On the emergence of antibacterial and antiviral copper cold spray coatings. **Journal of Biological Engineering**, v. 15, n. 1, p. 8, 2021/02/24 2021.

STANISLAWCZUK, R. *et al.* Effect of tetracycline on the bond performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. **Braz Oral Res**, v. 25, n. 5, p. 459-465, 2011.

STANISLAWCZUK, R. *et al.* Mechanical properties and modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives. **Dental Materials**, v. 30, n. 4, p. 392-9, Apr 2014.

STERZENBACH, T. *et al.* Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 12, p. 4237-4260, 2020.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; YOSHIYAMA, M. Two Modes of Nanoleakage Expression in Single-step Adhesives. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 7, p. 472-476, 2002.

USMAN, M. S. *et al.* Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4467, 2013.

WALTER, R. *et al.* In vitro inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. **Operative Dentistry**, v. 32, n. 4, p. 388-93, Jul-Aug 2007.

YE, C. *et al.* Carbon-13 chemical shift anisotropies of solid amino acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 699-704, 1993.

ZHOU, W. *et al.* Modifying Adhesive Materials to Improve the Longevity of Resinous Restorations. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 3, Feb 8 2019.