

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FRANCINE DO COUTO LIMA MOREIRA

**Influência da adição de nanopartículas de prata no
efeito antibacteriano, na alteração de cor, na sorção e
solubilidade de adesivos dentários**

**Goiânia
2013**

FRANCINE DO COUTO LIMA MOREIRA

Influência da adição de nanopartículas de prata no efeito antibacteriano, na alteração de cor, na sorção e solubilidade de adesivos dentários

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Co-orientador: Prof. Dr. Lawrence Gonzaga Lopes

**Goiânia
2013**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DOUTORADO

Aluna: Francine do Couto Lima Moreira

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Co-orientador: Prof. Dr. Lawrence Gonzaga Lopes

Membros:

1. Prof. Dr. Carlos Estrela (presidente)

2. Prof. Dr. Lawrence Gonzaga Lopes

3. Prof. Dr. Júlio César Franco Almeida

4. Prof. Dr. Rogério Vieira Reges

5. Prof. Dr. Sicknan Soares da Rocha

Suplentes:

1. Profa. Dra. Ana Helena Gonçalves de Alencar

2. Prof. Dr. João Batista de Souza

Data: 26/09/2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha, Maria Clara, minha companheira de todas as horas. “Minha cor, minha flor, minha cara”. Amo sem fim!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre iluminou meus caminhos e que me sustentou com vontade e perseverança na busca dos meus ideais;

À Faculdade de Medicina e aos Professores do Curso de Doutorado em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade e pelos ensinamentos que me passaram;

Ao professor, orientador, Carlos Estrela e sua esposa Cyntia Estrela pelo auxílio, amizade e acolhimento em sua casa, durante a realização deste trabalho;

Ao professor Lawrence Gonzaga Lopes pela paciência e confiança, exemplo de mestre;

À professora Ana Helena de Alencar e às colegas Denise Ramos e Ana Paula Rodrigues, pela especial atenção, amizade e colaboração.

Às minhas mães Dunalva, Fátima e Graça, pelo incentivo dado durante toda minha caminhada;

Ao meu esposo Mário Celso, por sua compreensão, paciência, companheirismo e pelo consolo nos momentos de incerteza;

À tia Maria Klitch, pelo incentivo e colaboração;

Aos amigos e familiares pelo companheirismo e amizade;

A todos os amigos, presentes e ausentes, que torceram por mim ou que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Quadro, figuras, diagramas e tabelas	vi
Símbolos, siglas e abreviaturas	viii
Resumo	ix
Abstract	xi
1 Introdução	13
2 Objetivos	16
3 Material e métodos	17
4 Resultados	30
5 Discussão	35
6 Conclusão	41
7 Referências bibliográficas	42
Publicação	46
Anexos	63

QUADRO, FIGURAS, DIAGRAMAS E TABELAS

Quadro 1 Características dos adesivos dentários testados.

Figura 1 Matriz em aço inoxidável com geometria interna circular e dimensões de 10mmX1mm.

Figura 2 Materiais utilizados para confecção dos espécimes: A-placa de vidro, B-fita matriz de poliéster, C-matriz de aço, D-fita matriz de poliéster, E-lamínula de vidro.

Figura 3 Sobreposição dos materiais para confecção dos espécimes.

Figura 4 Posicionamento da ponteira do aparelho fotopolimerizador sobre a lamínula de vidro.

Figura 5 Desenho ilustrativo do espécime com as dimensões de 10mmX1mm

Figura 6 Superfície dos espécimes do grupo SB: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x).

Figura 7 Superfície dos espécimes do grupo SM: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x).

Figura 8 Superfície dos espécimes do grupo SBAG: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x).

Figura 9 Superfície dos espécimes do grupo SMAg: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x).

Diagrama 1 Caracterização dos grupos e subgrupos do teste antibacteriano.

Diagrama 2 Caracterização dos grupos e subgrupos do teste de sorção e solubilidade.

Tabela 1 Valores de média e desvio padrão (dp) de densidade óptica do meio de cultura dos espécimes contaminados por *S. mutans*.

Tabela 2 Valores de média e desvio padrão (dp) de alteração de cor dos adesivos dentários SB e SM, pelo sistema CIELab, após adição de nanoprata.

Tabela 3 Valores de média e desvio padrão (dp) de sorção e solubilidade, obtidos em água (A) e etanol a 75% (E) .

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
SB	Adper™ Single Bond 2
SM	Adper™ Scotchbond Multi-uso
LED	Light-emitting diode
A	Água deionizada
E	Etanol a 75%
Ag	Prata
NAg	Nanopartículas de prata
Ag⁺	Íon prata
BHI	Brain-heart infusion
min	Minuto
h	Hora
nm	Nanômetro
mL	Mililitro
°C	Grau Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M1	Massa 1
M2	Massa 2
M3	Massa 3
V	Volume
W	Sorção
S	Solubilidade
dp	Desvio padrão
<i>p</i>	Nível de significância
ATCC	American type culture collection
ISO	International standardization for organization
US FDA	United States food and drug administration

RESUMO

Objetivo: avaliar a influência da adição de nanopartículas de prata (NAg) no efeito antibacteriano, na alteração de cor, na sorção e solubilidade de adesivos dentários. **Material e métodos:** para tanto foram analisados quatro grupos de adesivos dentários: SB - Adper™ Single Bond 2 sem adição de NAg; SM - Adper™ Scotchbond Multi-uso sem adição de NAg; SB_{Ag} – SB com adição de 0,1% de NAg; SM_{Ag} - SM com adição de 0,1% de NAg. Cento e trinta e dois espécimes dos adesivos foram confeccionados segundo a norma da ISO 4049:2010, com geometria interna circular nas dimensões de 10mmX1mm. Após diferentes períodos de contaminação dos espécimes com *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) (1min; 5min; 1h; 6h e 24h), o efeito antibacteriano foi analisado por meio de densidade óptica e a presença/ausência de bactérias na superfície dos espécimes por microscopia eletrônica de varredura (2500x e 5000x). Avaliou-se também a alteração de cor (ΔE) dos espécimes após a adição da NAg, utilizando espectrofotômetro com base no sistema CIELab. Os testes de sorção e solubilidade (ISO 4049:2010) foram realizados para verificar a qualidade polimérica dos materiais. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, para comparações múltiplas, com $p=0,05$, para todos os testes, exceto para análise do ΔE que foi submetido à correlação de Pearson ($p=0,01$). **Resultados:** não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de densidade óptica dos meios de cultura utilizados para armazenar os espécimes contaminados

com *S. mutans*, mesmo com a adição de NAg ($p>0,05$). Ambos os adesivos sofreram alteração de cor significativa, posterior à adição da nanop prata em sua composição ($p<0,01$). Quanto aos valores de sorção e solubilidade não foram observadas diferenças estáticas quanto à adição de NAg nos adesivos estudados ($p>0,05$). **Conclusão:** a adição de nanopartículas de prata, pura, em pó a 0,1%, nos adesivos dentários não conferiu efeito antibacteriano ao material, causou alteração de cor e não interferiu nos valores de sorção e solubilidade dos mesmos.

ABSTRACT

Aim: to evaluate the influence of silver nanoparticles to antibacterial effect, color change, sorption, and solubility of dental adhesives. **Material and methods:** they were analysed four groups of dental adhesives: SB - Adper™ Single Bond 2 without adding NAg, SM - Adper™ Scotchbond Multi-use without adding NAg; SBAg - SB with addition of 0.1% of NAg ; SMAG - SM with addition of 0.1% of NAg. One hundred and thirty two specimens of the adhesives were prepared according to the standard of ISO 4049:2010, with circular geometry dimensions of 10mmx1mm. After different periods of specimens contamination with *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) (1min; 5min; 1h; 6h, e 24h) the antimicrobial activity was observed by bacterial growth (optical density), and the presence/absence of bacteria on the specimens surface by Scanning Electron Microscopy (2500x e 5000x). Also evaluated the color change of specimens after adding NAg through the CIELab system, and sorption and solubility tests (ISO 4049:2010) were performed to verify the polymeric quality of materials. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test for multiple comparisons, with $p=0.05$ for all tests, except for analysis of ΔE what underwent Pearson`s correlation ($p=0.01$). **Results:** there were no statistical differences between the values of optical density of the culture broth used to store the specimens contaminated with *S. mutans*, even with the addition of NAg ($p>0.05$). Both adhesives have significant change in color, after the addition of nanosilver in its composition ($p<0.01$). No statistical differences were observed

on the values of sorption and solubility differences as the addition of NAg in studied adhesives ($p>0.05$). **Conclusion:** addition of 0.1% pure silver nanopowder in dental adhesive did not confer antibacterial effect to the material, cause material color changes and did not affect the values of sorption and solubility.

1 INTRODUÇÃO

A lesão de cárie secundária representa um frequente problema bucal e constitui a principal razão para a substituição de restaurações diretas na odontologia restauradora (SARRETT, 2007; SAKU *et al.*, 2010). As resinas compostas têm sido o material preferencialmente usado pelos cirurgiões dentistas, devido às suas características estéticas e por ser de aplicação direta (FERRACANE, 2011). Embora as propriedades físicas e mecânicas das resinas compostas terem sido significativamente melhoradas, ainda apresentam a tendência em acumular mais biofilme em sua superfície do que os outros materiais restauradores (BEYTH *et al.*, 2007).

Os sistemas adesivos têm por função estabelecer a união entre resina composta e estrutura dentária, de forma a oferecer suporte ao selamento marginal e à retenção de restaurações (WANG & SPENCER, 2003). O emprego de sistemas restauradores de aplicação direta (adesivos dentários e resinas compostas) com menor susceptibilidade à aderência bacteriana e que expressam potencial antibacteriano favorece na prevenção de lesões de cárie secundária e, para isso, mudanças na composição de materiais destinados às restaurações têm sido realizadas (BÜRGUERS *et al.*, 2009).

A nanopartícula de prata (NAg) tem sido usada em baixas concentrações com o objetivo de conferir propriedade antibacteriana a diversos materiais, sem no entanto alterar suas características mecânicas (MONTEIRO *et al.*, 2009). A prata é um metal conhecido pela atividade antimicrobiana contra bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e até alguns vírus, mas sua ação é proporcional à sua capacidade de liberar íons bioativos (Ag^+) (LANSDOWN, 2002). As NAg são insolúveis, geralmente apresentam tamanho menor que 100nm e podem ser produzidas por uma variedade de métodos (WEIR *et al.*, 2008). O mecanismo de ação da nanop prata na eliminação de bactérias pode ocorrer pela interação com elementos da membrana celular bacteriana, causando danos estruturais, forçando a dissipação de prótons e, finalmente, a morte celular; pela reação de íons bioativos Ag^+ com o fosfato das moléculas de DNA bacteriano inativando sua duplicação, e/ou pela reação com proteínas contendo enxofre, induzindo a inibição de funções enzimáticas respiratórias (LANSDOWN, 2006). Assim, estudos têm mostrado que a adição de solução coloidal de NAg em concentrações de 0,3% a 0,6% em volume (BÜRGUERS *et al.*, 2009) ou de 0,05% a 0,1% em peso (ZHANG *et al.*, 2012) de sal de NAg, aos materiais resinosos tem levado à diminuição da aderência bacteriana ao material e proporcionado efeito antibacteriano contra *S.mutans*.

Materiais estéticos de aplicação direta devem apresentar biocompatibilidade e propriedade antibacteriana, sem que haja prejuízo em suas características física, química e mecânica (KASRAEI & AZARSINA, 2012). Diversos fatores, podem influenciar o grau de conversão monômero/polímero alcançado com a fotopolimerização, o qual, quando incompleto, resulta em monômeros residuais (FERRACANE, 2006). Esta característica, além de contribuir para a degradação do material de união, pode causar agressão ao tecido pulpar (SPAHL *et al.*, 1998).

A degradação química é geralmente causada pelos processos de oxidação e hidrólise, nos quais a água apresenta papel fundamental. (FERRACANE, 2006) Este fato ocorre devido aos fenômenos de sorção e solubilidade aos quais os materiais resinosos estão sujeitos, principalmente, em decorrência de sua composição (ÖRTENGREN *et al.*, 2001).

O grau de conversão monômero/polímero dos materiais resinosos além de influenciar a degradação química atua diretamente nas propriedades físicas e estabilidade química dos materiais adesivos (RUEGGEBERG & CRAIG, 1988). Quanto maior esse grau, melhores são as propriedades como estabilidade de cor, dureza superficial, módulo de elasticidade, resistência flexural e ao desgaste (LOVELL *et al.*, 2003). Com relação às propriedades mecânicas, estas dependem do tipo de cadeia polimérica e densidade de ligações cruzadas formadas durante o processo de polimerização (YAP *et al.*, 2004).

Assim, com o objetivo de prevenir as lesões de cárie secundárias e a troca excessiva de restaurações é importante que os materiais estéticos de aplicação direta sejam biocompatíveis, tenham propriedade antibacteriana, sem que haja interferência em suas características física, química e mecânica (KASRAEI & AZARSINA, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da adição de nanopartículas de prata no efeito antibacteriano, na alteração de cor, na sorção e solubilidade de adesivos dentários.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito antibacteriano dos adesivos Adper™ Single Bond 2 e Adper™ Scotchbond Multi-uso, sem e com adição de NAg, sobre o *S.mutans*, por meio de crescimento bacteriano (densidade óptica);
- Analisar a alteração de cor dos adesivos dentários com a adição de NAg, por meio de espectrofotometria;
- Verificar os valores de sorção e solubilidade dos adesivos dentários adicionados de NAg.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo laboratorial *in vitro* foram confeccionados 132 espécimes de adesivos dentários submetidos aos seguintes métodos experimentais: teste antibacteriano, microscopia eletrônica de varredura, avaliação da alteração de cor e testes de sorção e solubilidade.

3.1. INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Dois adesivos dentários foram testados neste estudo: Adper™ Single Bond 2 (3M-ESPE, St. Paul, MN, USA), Adper™ Scotchbond Multi-uso, (3M-ESPE, St. Paul, MN, USA) (Quadro 1). Cada material teve em sua composição a incorporação de NAg na matriz polimérica. Os materiais foram manipulados de acordo com as orientações da ISO 4049:2010, no que se refere à confecção dos espécimes.

Quadro 1 Descrição dos adesivos dentários testados

Material	Classificação	Passos	Fabricante	Lote	Composição
Adper™ Single Bond 2 (SB)	Condicionamento e aplicação (<i>all-etch</i>)	2	3M ESPE, St Paul, MN, USA	N345818 2015-01	Água Etanol Bis-GMA HEMA Canforquinona Dimetacrilatos
Adper™ Scotchbond Multi-uso (SM)	Condicionamento e aplicação (<i>all-etch</i>)	3	3M ESPE, St Paul, MN, USA	N335871 2014-09	Bis-GMA HEMA Canforquinona Dimetacrilatos Triaminas

A NAg, em pó, com pureza de 100% e partículas no tamanho de 20nm (US Research Nanomaterials, Inc, Houston, TX, USA), após ser dosada e

pesada foi adicionada aos frascos de adesivo em proporção de 0,1% em peso, a seguir, os frascos foram agitados em um aparelho de ultrassom, por 3 ciclos de 10 minutos para completa dispersão do metal no material, segundo o fabricante (US Research Nanomaterials, Inc, Houston, TX, USA).

Assim, no presente estudo foram estabelecidos quatro grupos diferentes de adesivos: G1(n=33) - SB (Adper™ Single Bond 2 sem adição de NAg); G2 (n=33) - SM (Adper™ Scotchbond Multi-uso sem adição de NAg); G3 (n=33) - SBAG (Adper™ Single Bond 2 com adição de 0,1% de NAg); G4 (n=33) - SMAG (Adper™ Scotchbond Multi-uso com adição de 0,1% de NAg).

3.2. PREPARO DOS ESPÉCIMES

Os espécimes foram confeccionados segundo a norma da ISO 4049:2010, exceto para o tamanho dos mesmos. Durante todo processo de confecção, temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade ($50\% \pm 2\%$) foram controlados pelo uso de um termo-higrômetro (Termo-Hygro Clock, Corel).

Os espécimes foram obtidos a partir da inserção do material em uma matriz em aço inoxidável com geometria interna circular, com as dimensões de 10mmX1mm (Figura 1). Sobre a placa de vidro foi posicionada a tira de poliéster (3M do Brasil, Ribeirão Preto-SP, Brasil) e sobre esta a matriz de aço supracitada (Figura 2). O frasco do adesivo foi posicionado verticalmente e o material gotejado pausadamente dentro desta matriz para evitar a formação de bolhas de ar, sendo 2 gotas para os grupos SB e SBAG e uma gota para SM e SMAg.

Na parte superior da matriz e sobre o material foi colocada uma tira de poliéster e sobre a tira uma lamínula de vidro de 1mm de espessura, para

permitir o extravasamento do excesso de adesivo e a obtenção de uma superfície lisa e uniforme (Figura 3).

Sobre a lamínula foi posicionada a ponteira do aparelho fotopolimerizador (Figura 4). Foi utilizada a técnica contínua de polimerização (potência de 600mW/cm² por 40 segundos), por meio do uso de um aparelho à base de LED (Emitter, Schuster, Santa Maria, RS, Brasil), a uma distância de 1mm do espécime. O aparelho foi ligado em um estabilizador de energia e a densidade de potência foi previamente verificada em um radiômetro (Demetron Research Corp.). Após a fotoativação, os espécimes foram retirados da matriz de aço com o auxílio de um instrumento esterilizado (Figura 5).

Foram confeccionados 132 espécimes, sendo 66 de SB e 66 de SM. Setenta e dois foram utilizados para o teste antibacteriano (36 de SB e 36 de SM), 20 para a avaliação de alteração de cor (10 de SB e 10 de SM) e 40 para o teste de sorção e solubilidade (20 de SB e 20 de SM).

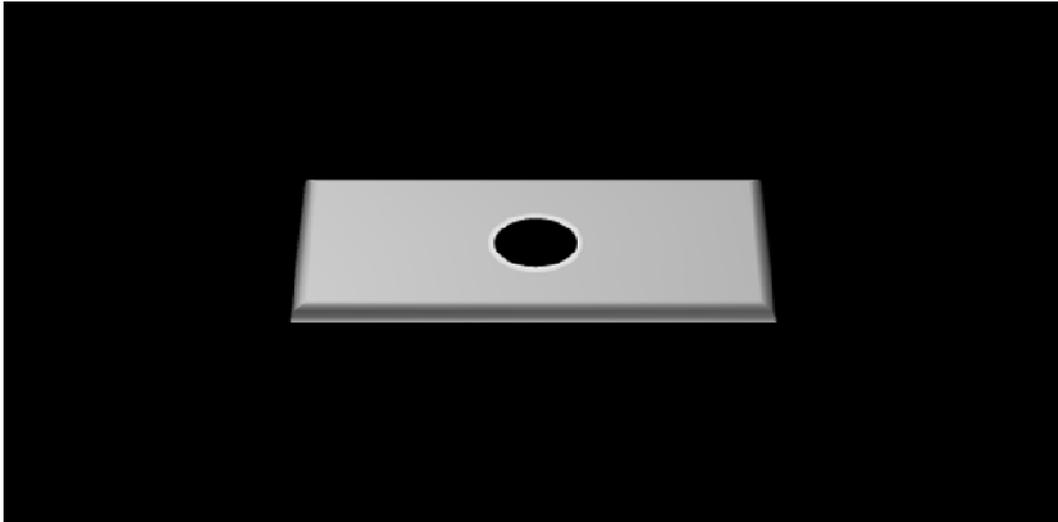


Figura 1 Matriz em aço inoxidável com geometria interna circular e dimensões de 10mmX1mm

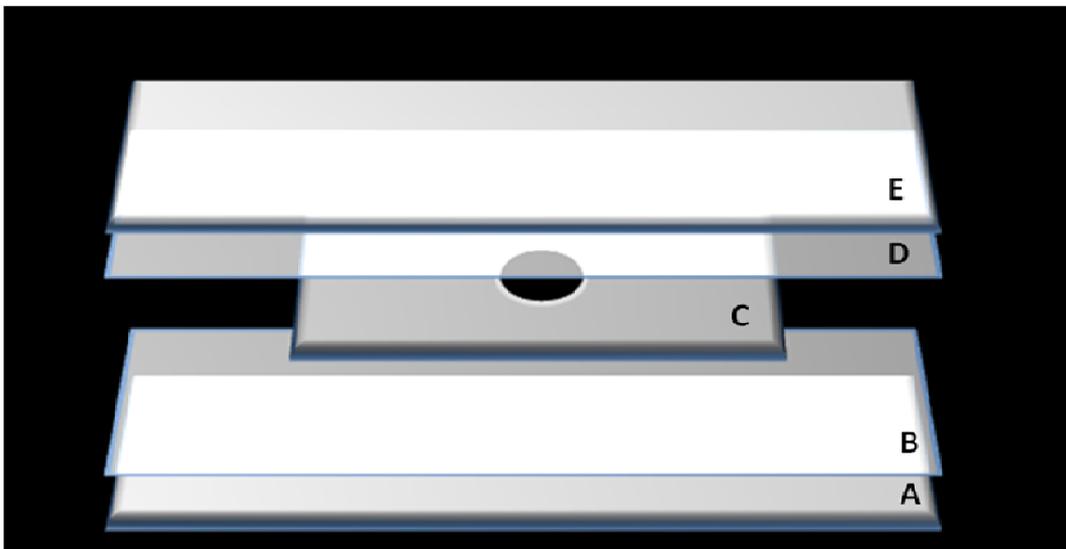


Figura 2 Materiais utilizados para confecção dos espécimes: A-placa de vidro, B-fita matriz de poliéster, C-matriz de aço, D-fita matriz de poliéster, E-laminula de vidro

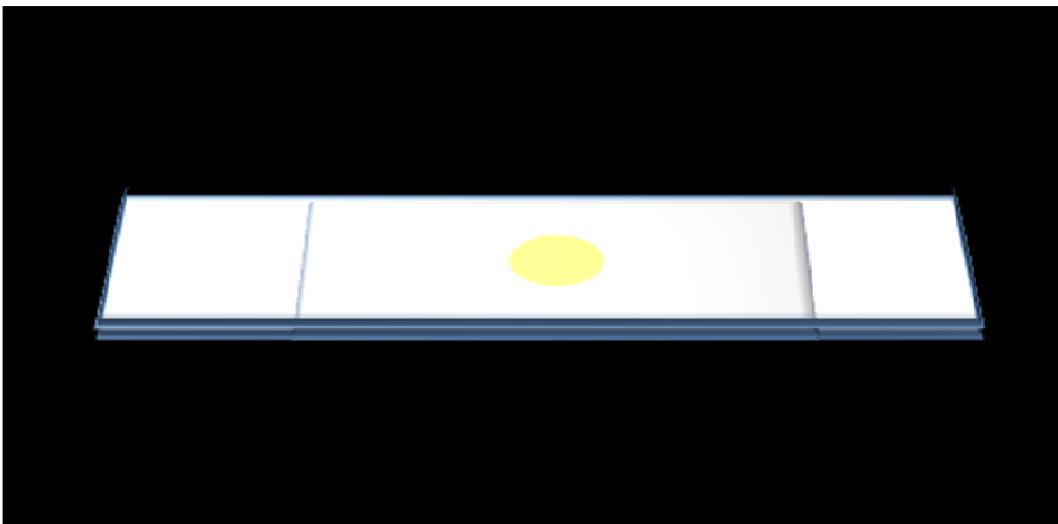


Figura 3 Sobreposição dos materiais para confecção dos espécimes.

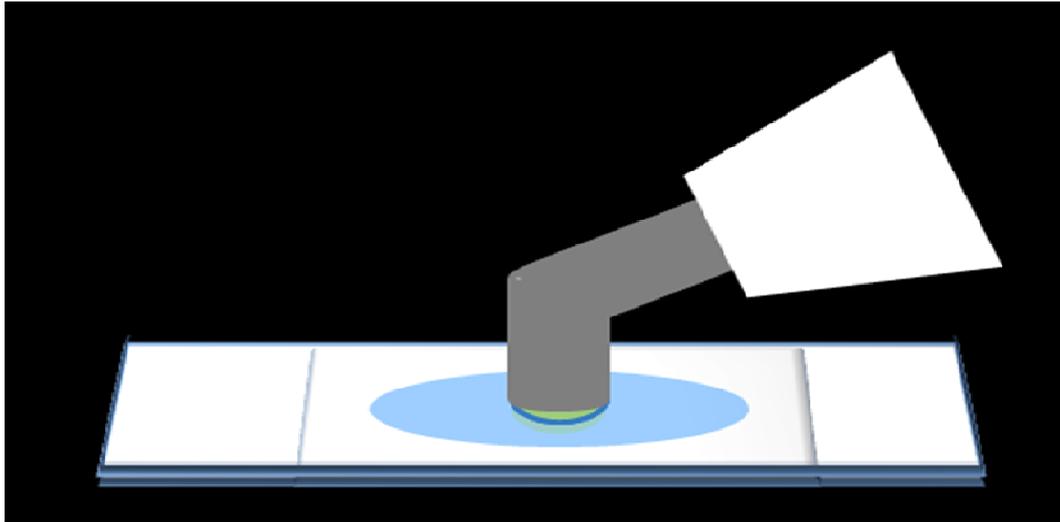


Figura 4 Posicionamento da ponteira do aparelho fotopolimerizador sobre a lamínula de vidro.

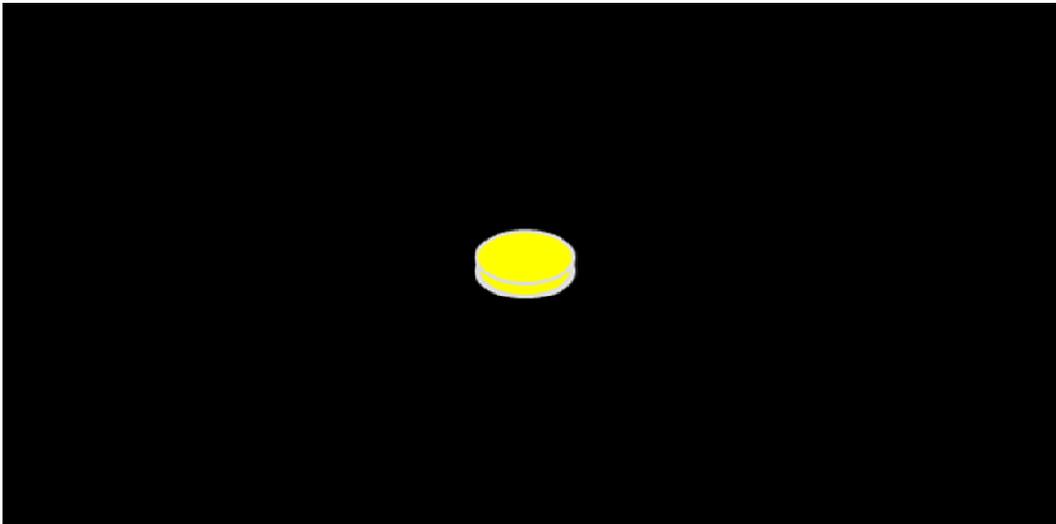


Figura 5 Desenho ilustrativo do espécime com as dimensões de 10mmX1mm.

3.3. TESTE ANTIBACTERIANO

Foi utilizada cepa padrão de *Streptococcus mutans* obtida da American Type Culture Collection (ATCC 25175), inoculada em 7mL de caldo de BHI (Brain-heart infusion; Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) e incubada a 37°C, por 24 horas. Após o período de incubação, 0,1mL de solução bacteriana foi resuspenso em 4 frascos com 10mL de BHI, em uma concentração final de aproximadamente 3×10^8 células/mL em cada frasco, ajustada para o padrão de turvação¹ de McFarland (ESTRELA *et al.*, 2009).

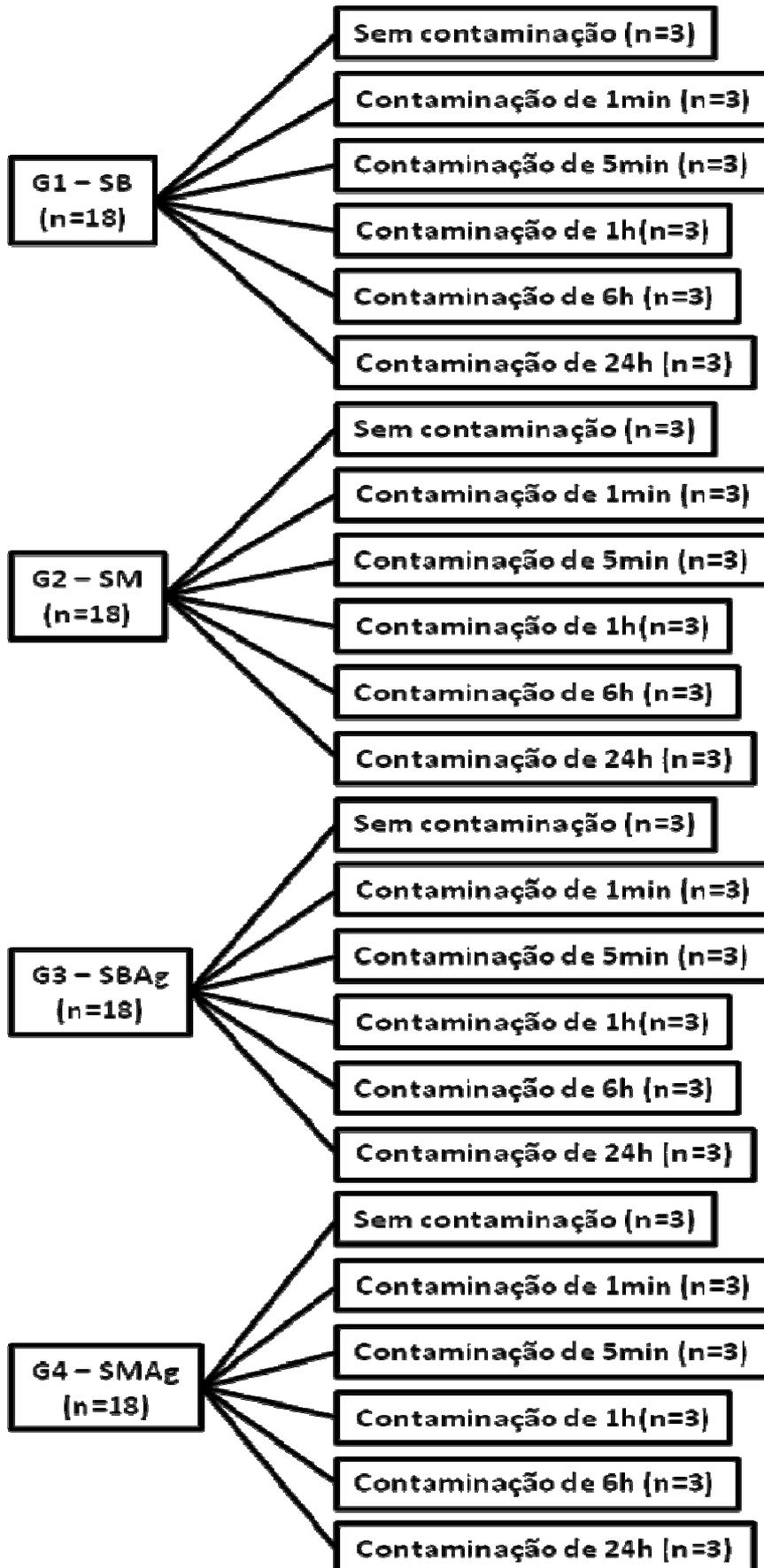
Para o teste antibacteriano, foram utilizados 72 espécimes dos 132 confeccionados, sendo o número amostral de 18 para cada grupo (Diagrama 1). Os espécimes de cada grupo foram armazenados em uma placa de Petri com tampa, esterilizada e devidamente identificada. Três espécimes de cada grupo foram retirados antes da contaminação e transferidos para tubos de ensaio individualizados com BHI. Dez mililitros de suspensão bacteriana foram adicionados a cada placa para contaminação dos espécimes com *S. mutans*. A contaminação foi realizada nos períodos de tempo de 1min, 5min, 1h, 6h e 24h, sendo n=3.

Após cada período de contaminação, os espécimes foram retirados das placas e colocados em frascos com 10mL de água deionizada esterilizada para lavagem com agitação em Vortex (modelo AP 56, Phoenix), por 1 minuto. Foram, então, recondicionados a tubos de ensaio com BHI esterilizado e incubados por 48 horas, a 37°C, em estufa bacteriológica (modelo B2CBE, Deleo). Decorrido esse período, 2mL de amostra dos meios foram coletados, colocados em frascos de acrílico transparentes e analisados quanto ao crescimento bacteriano (densidade óptica), utilizando para isso o

espectrofotômetro UV (Spectrophotometer Model Nova 1600 UV, Piracicaba, SP, Brasil) ajustado para leitura em comprimento de onda $\lambda=600\text{nm}$, adotando-se como padrão a escala 1 de McFarland, que correspondeu à absorvância de 0,137nm após leitura zero de BHI esterilizado.

A seguir, os espécimes foram retirados dos meios de cultura e irrigados individualmente com 10mL de água destilada esterilizada e armazenados em solução fixadora, por 7 dias, para posterior análise superficial em microscopia eletrônica.

Diagrama 1 Caracterização dos grupos e subgrupos do teste antibacteriano



3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Decorrido o período de fixação e a seguir, armazenados por 30 minutos em etanol a 70%, mais 30 minutos em etanol a 95% e, por fim, 30 minutos em etanol a 99% para desidratação. Em seguida foi realizado o aquecimento em ponto crítico para completar o processo.

Após a desidratação, os espécimes foram fixados em *stubs* metálicos e posicionados no metalizador (MED 010; Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein), para cobertura superficial com fina camada de ouro. Após a metalização, os espécimes foram examinados em microscópio eletrônico de varredura de pressão variável, em alto vácuo (LEO 435 VP; Nano Technology Systems Division of Carl Zeiss SMT), para verificar a presença ou ausência de *S. mutans* na superfície de cada espécime.

A leitura foi realizada por um único examinador e foram coletadas duas imagens de cada espécime, em diferentes aumentos, de X2500 e X5000.

3.5. AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÃO DE COR

Para avaliar a alteração de cor foram utilizados outros 20 espécimes, sendo n=5 para cada grupo (Diagrama 2). A mensuração da cor dos espécimes foi realizada com espectrofotômetro (Easyshade, Vita, Alemanha) de forma que SB e SM serviram como controle, para comparação de cor com os adesivos experimentais SBAG e SMAG, respectivamente.

A cor foi determinada utilizando os parâmetros do sistema CIELab (L* a* b*), no qual L* indica a luminosidade em que a média varia de 0 (preto) para 100 (branco) e o a* e b* o matiz, sendo que o a* representa a saturação no eixo

vermelho-verde e o b^* no eixo azul-amarelo. Com este sistema todas as cores podem ser especificadas com as coordenadas L^* , a^* , b^* .

Os espécimes foram submetidos a três leituras da cor sobre o bloco de fundo padrão branco (Standard For 45°, 0° Reflectance and Color Gardner Laboratory Inc. Maryland, EUA). As amostras sob a ponta do espectrofotômetro receberam a luz proveniente de 30 lâmpadas LED, com 10 cores diferentes, dispostas de forma circular, com incidência de 45° com a superfície do material. Esse feixe foi refletido em 0° de volta para o aparelho e este captou e registrou os valores de L^* , a^* e b^* de cada amostra.

A alteração de cor foi determinada pela diferença (ΔE^*) entre as coordenadas obtidas das amostras do SB e SM e as amostras do SBAg e SMAg, respectivamente. A variação de cor, ΔE , foi usada para representar a diferença de cor e foi calculada a partir da fórmula (ASTM, 2006):

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5}, \text{ onde}$$

$$\Delta L^* = L_1^* - L_0^*; \Delta a^* = a_1^* - a_0^*; \Delta b^* = b_1^* - b_0^*$$

Valores de $\Delta E \geq 3,3$ foram considerados clinicamente inaceitáveis (JOHNSTON & KAO, 1989).

3.6. TESTES DE SORÇÃO E SOLUBILIDADE

Os testes de sorção e solubilidade foram realizados segundo a norma da ISO 4049:2010. Para estes testes foram utilizados 40 espécimes, sendo $n=10$ para cada grupo (Diagrama 2). Os espécimes foram colocados em frascos que, por sua vez, permaneceram abertos, dentro de um dessecador de vidro contendo sílica gel branca *freshly dried* (VETEC®, lote 0506198), os quais

foram mantidos por vinte e duas horas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, no interior de uma estufa a vácuo (LF Equipamentos - modelo 440 D). Decorrido esse período, o dessecador foi retirado da estufa com os respectivos espécimes e colocado sobre uma bancada pelo período de duas horas à temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, completando um ciclo de 24 horas. Em seguida, cada espécime foi retirado do interior do frasco e pesado repetidas vezes, após cada ciclo de 24 horas, até obter a massa constante M1, com a precisão de 0,1mg, utilizando-se para tanto uma balança analítica eletrônica (AB204-S, Mettler-Toledo[®], precisão de 0,01mg).

Os espécimes foram retirados do interior dos frascos por meio de uma pinça clínica esterilizada para evitar o contato com qualquer outra superfície. Antes de cada pesagem, a balança (AB204-S, Mettler-Toledo[®], precisão de 0,01mg) foi devidamente tarada. Os valores de pesagem obtidos foram anotados em tabelas previamente elaboradas. Após a obtenção da M1, os espécimes foram colocados novamente em seus respectivos frascos etiquetados e, observando atentamente suas rotulações, os permeantes foram adicionados por meio de pipetas manuais (uma para cada solvente), na quantidade de 15mL, sendo que metade dos espécimes de cada grupo de adesivo foi armazenada em água deionizada (A) e a outra metade em etanol a 75% (E) (n=5). Os frascos foram tampados e levados novamente para o interior da estufa mantida à temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, os quais permaneceram por vinte e oito dias.

Após esse tempo, todos os frascos foram removidos da estufa e mantidos à temperatura ambiente, $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, por duas horas. Os espécimes foram retirados dos frascos por meio de uma pinça clínica romba, enxutos com papel

absorvente duplo ultramacio (Kiss, Santher) por 15 segundos e deixados em uma cubeta esterilizada por 1 minuto sendo, então, novamente pesados para obtenção de M2. Em seguida, eles foram novamente acondicionados em seus respectivos frascos vazios, posicionados no interior do dessecador e levados à estufa a vácuo. Como foi realizado para obtenção de M1, os espécimes foram pesados após cada ciclo de 24 horas, até a obtenção de uma massa constante, aqui denominada M3.

A seguir, o volume de cada espécime (mm^3) foi calculado a partir da seguinte fórmula: $V = \pi r^2 \cdot h$, onde r corresponde ao raio e h a altura do espécime obtida por meio das dimensões internas da matriz de aço utilizada para a confecção dos espécimes ($r=5\text{mm}$ e $h=1\text{mm}$).

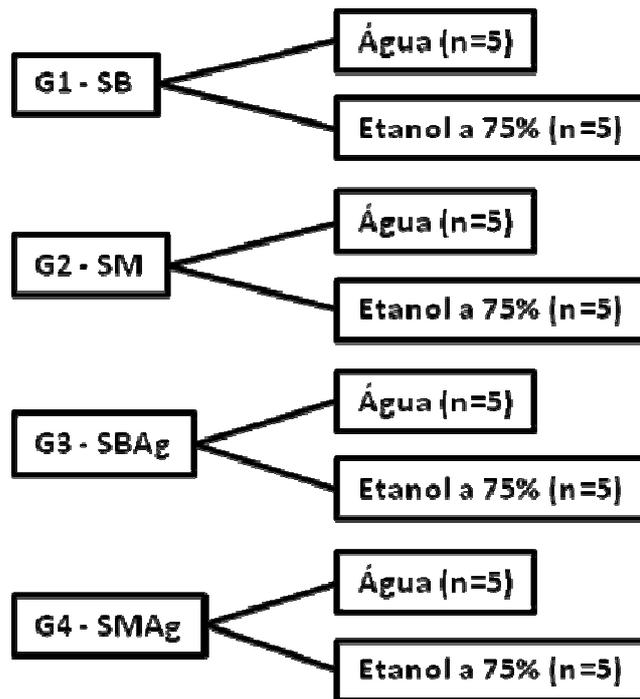
Com estes dados o cálculo da sorção e solubilidade se deu pela aplicação das seguintes fórmulas (ISO 4049:2010): $W = M2 - M3 / V$, onde W corresponde à sorção; $M2$ - massa após imersão nos permeantes; $M3$ - massa após dessecação. $S = M1 - M3 / V$, onde S corresponde à solubilidade; $M1$ - massa inicial; $M3$ - massa após dessecação.

O protocolo laboratorial de todos os grupos manteve a mesma sequência.

3.7. TRATAMENTO E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

A análise estatística foi realizada no programa IBM[®] SPSS[®] Statistics Data Editor (versão 19, IBM Company, 2010). Os dados obtidos foram adequadamente tabulados e submetidos a uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, para comparações múltiplas, com $p=0,05$, para todos os testes, exceto para análise do ΔE que foi submetido à correlação de Pearson ($p=0,01$).

Diagrama 2 Caracterização dos grupos e subgrupos do teste de sorção e solubilidade



4 RESULTADOS

Na Tabela 1 podem ser observados os valores de média e desvio padrão (dp) da densidade óptica do meio de cultura utilizado para armazenar os espécimes de adesivo contaminados com *Streptococcus mutans*. Todos os grupos apresentaram valores de densidade óptica maiores do que 0,137nm (escala 1 de McFarland), não sendo observadas diferenças estatísticas significantes entre os adesivos nos diferentes períodos de contaminação ($p>0,05$). O grupo SB no período de 1 hora apresentou valor significativamente maior ($p<0,05$) quando comparado ao SMAg, no mesmo período. Os espécimes de cada grupo que não foram contaminados apresentaram valores de densidade óptica de zero nanômetro ($p<0,05$).

Tabela 1. Valores de média e desvio padrão (dp) da densidade óptica do meio de cultura dos espécimes contaminados por *S. mutans*

Adesivo	Tempo de contaminação				
	1min	5min	1h	6h	24h
SB	1,059±0,265 ^{A,a}	1,094±0,101 ^{A,a}	1,435±0,609 ^{A,a}	0,837±0,402 ^{A,a}	1,032±0,045 ^{A,a}
SM	1,031±0,007 ^{A,a}	0,894±0,260 ^{A,a}	1,008±0,071 ^{AB,a}	0,906±0,154 ^{A,a}	1,104±0,031 ^{A,a}
SBAg	0,902±0,18 ^{A,a}	1,031±0,022 ^{A,a}	1,035±0,027 ^{AB,a}	0,907±0,252 ^{A,a}	1,065±0,013 ^{A,a}
SMAg	0,975±0,022 ^{A,a}	0,973±0,008 ^{A,a}	0,556±0,390 ^{B,a}	1,003±0,031 ^{A,a}	1,098±0,061 ^{A,a}

Mesmas letras sobrescritas (A-B) nas colunas e (a) nas linhas indicam diferenças estatísticas não significantes para o teste de Tukey ($p=0,05$).

Ao analisar as superfícies dos espécimes em MEV foi observada ausência de bactérias nos grupos SB, SBAg e SMAg, e presença nos espécimes do grupo SM. Foi constatada a ausência de bactérias na superfície dos todos os espécimes não contaminados.

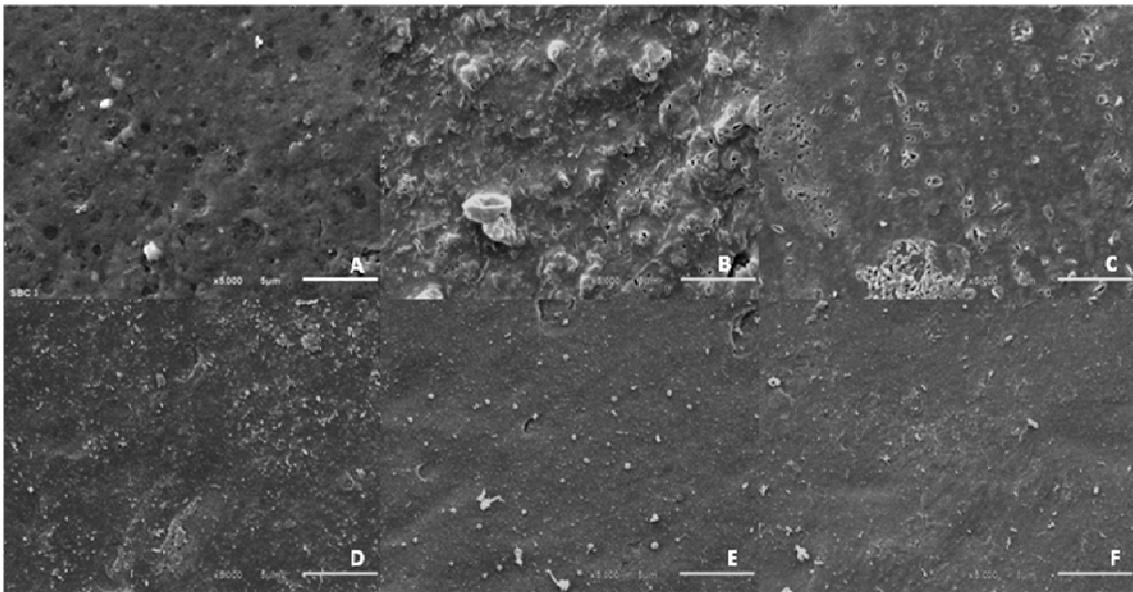


Figura 6 Superfície dos espécimes do grupo SB: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x).

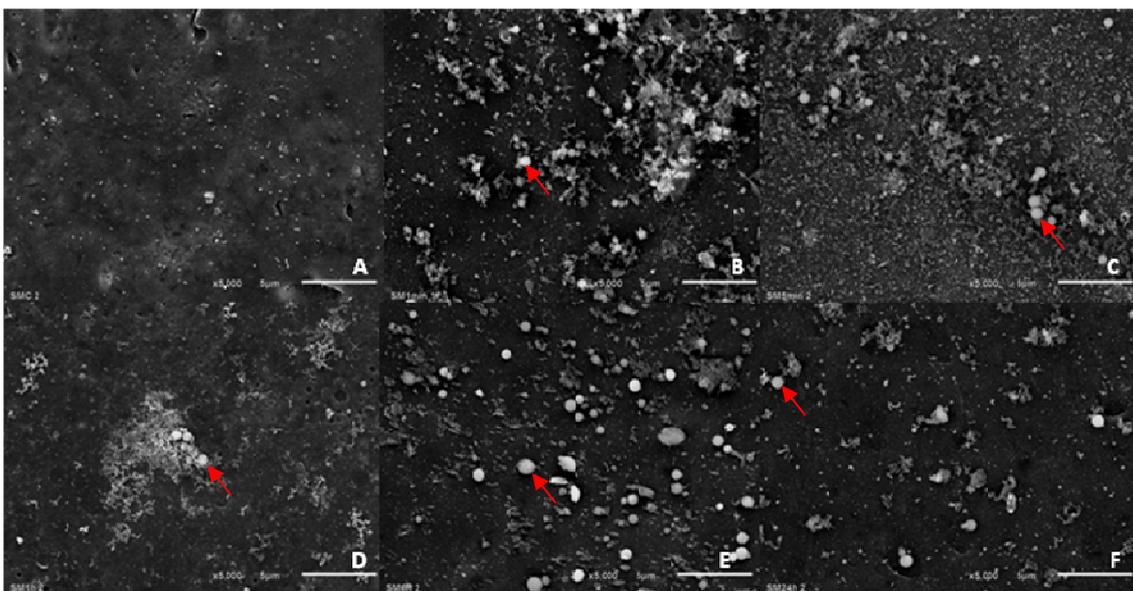


Figura 7 Superfície dos espécimes do grupo SM: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x). Setas indicam presença de bactéria.

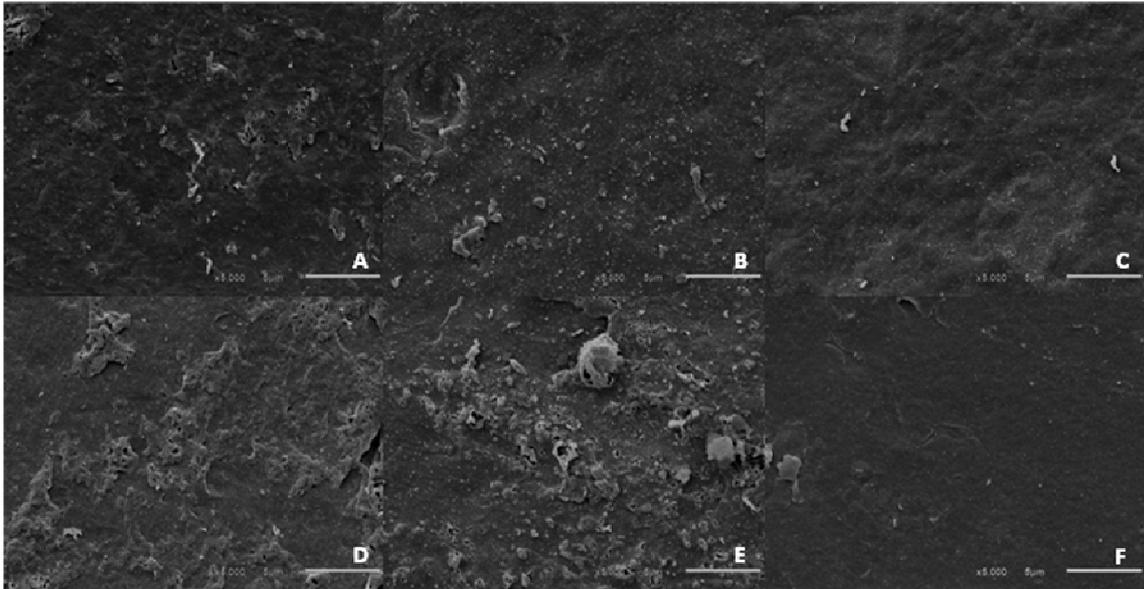


Figura 8 Superfície dos espécimes do grupo SBAg: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x).

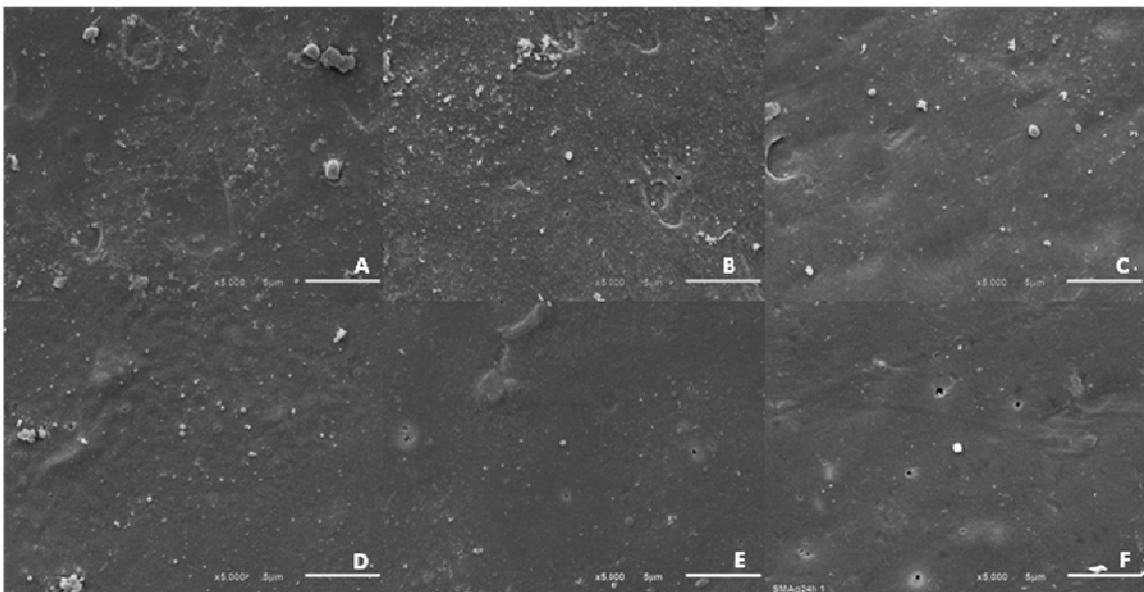


Figura 9 Superfície dos espécimes do grupo SMAg: A-sem contaminação; B-1minuto; C-5minutos; D-1hora; E-6horas; F-24 horas. (MEV 5000x).

Os dados obtidos com o teste para avaliação de alteração de cor estão dispostos na Tabela 2. Após a adição de NAg em sua composição, ambos os adesivos sofreram alteração de cor quando comparados ao valor de referência de $\Delta E=3,3$ ($p<0,05$). A alteração foi maior para o adesivo SM, $\Delta E=31,97$, quando comparada à alteração de cor do SB, $\Delta E=13,93$ ($p<0,01$).

Tabela 2 Valores de média e desvio padrão (dp) de alteração de cor dos adesivos dentários SB e SM, pelo sistema CIELab, após adição de nanop prata

Sistema CIELab	Adesivos			
	SB	SBAg	SM	SMAg
Cor	B2	C3	A1	C4
L	85,0±3,5 ^A	71,2±1,8 ^B	86,1±2,7 ^A	54,3±1,6 ^C
a	-3,7±0,8 ^A	-2,3±0,2 ^B	-0,5±0,2 ^C	-0,1±0,1 ^C
b	21,6±1,3 ^A	20,3±1,1 ^A	15,4±0,1 ^B	12,1±0,4 ^C
ΔE	13,93^B		31,97^A	

Mesmas letras sobrescritas (A-C) nas linhas indicam diferenças estatísticas não significantes para o teste de Tukey ($p=0,05$) e para correlação de Pearson ($p=0,01$)

Na Tabela 3 podem ser observados os valores de média e desvio padrão (dp) de sorção e solubilidade. Quanto à sorção, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os adesivos SB e SM ($p<0,05$) e entre SBAg e SMAg ($p<0,05$), mas não houve diferença entre SB e SBAg ($p>0,05$) e entre SM e SMAg ($p>0,05$). Quanto à solubilidade, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os adesivos SB e SM ($p<0,05$), entre SBAg e SMAg ($p<0,05$), mas não houve diferença entre SB e SBAg ($p>0,05$), quando armazenado em água, e entre SM e SMAg ($p>0,05$), tanto quando armazenados em água ou etanol. Houve diferença estatisticamente significativa entre SB e SBAg apenas quando armazenados em etanol ($p<0,05$).

Tabela 3. Valores de média e desvio padrão (dp) de sorção e solubilidade, obtidos em água (A) e etanol a 75% (E)

<i>Adesivos</i>	<i>Sorção ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)</i>		<i>Solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)</i>	
	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>E</i>
SB	34,89±25,79 ^{A,a}	22,60±9,26 ^{A,a}	100,84±5,36 ^{A,a}	96,45±24,03 ^{B,a}
SM	-0,76±1,7 ^{B,a}	-26,48±2,90 ^{B,b}	32,85±2,90 ^{B,b}	69,77±2,28 ^{BC,a}
SBAg	43,04±5,43 ^{A,a}	26,31±5,15 ^{A,a}	105,17±14,02 ^{A,b}	145,57±7,01 ^{A,a}
SMAg	-2,04±1,71 ^{B,a}	-24,19±2,38 ^{B,b}	29,79±3,99 ^{B,b}	60,69±26,19 ^{C,a}

Mesmas letras sobrescritas (A-C) nas colunas e (a-b) nas linhas indicam diferenças estatísticas não significantes para o teste de Tukey ($p=0,05$).

5 DISCUSSÃO

É de extrema importância o desenvolvimento de sistemas adesivos com propriedades antibacterianas, com o intuito de reduzir a ocorrência de lesões de cárie secundárias (IMAZATO, 2009). A cárie é uma doença infecciosa, bacteriana e tem suas lesões iniciadas pela desmineralização decorrente da produção de ácido pelo biofilme (LOESCHE, 1986). Além disso, há uma maior suscetibilidade pela colonização de micro-organismo por parte das resinas compostas, em comparação com outros materiais restauradores (BEYTH *et al.*, 2007). Tendo em vista que os sistemas adesivos apresentam contato direto com a estrutura dentária, por estar na interface dente-restauração, eles podem funcionar como um dispensador de agentes antibacterianos, sendo, portanto, promissores na inibição do desenvolvimento de biofilme e de lesão de cárie secundária (IMAZATO *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2009).

A prata (Ag) demonstrou possuir funções antibacteriana, antifúngica e antiviral sendo eficaz contra uma grande variedade de micro-organismos (MONTEIRO *et al.*, 2009). Com relação à sua atividade antimicrobiana, sugeriu-se que os íons Ag^+ poderiam inativar as enzimas vitais de bactérias para fazer com que o DNA bacteriano perdesse a sua capacidade de replicação, levando a célula à morte (RAI *et al.*, 2009). A Ag apresenta várias propriedades importantes: biocompatibilidade com células animais (SLENTERS *et al.*, 2008); efeito antibacteriano a longo prazo, devido à manutenção da liberação de prata ser sustentada pela eluição do seu íon Ag^+ , e leva a menor resistência bacteriana do que os antibióticos (DAMM *et al.*, 2007). Uma vantagem adicional para a NAg é o pequeno tamanho da partícula associado à

elevada área superficial específica, o que resulta em uma alta potência antibacteriana, mesmo que em baixa concentração (ZHANG *et al.*, 2013).

No presente estudo, foi utilizada a NAg de 20nm, pura, em pó, a qual foi adicionada aos adesivos dentários na concentração de 0,1% em peso, conforme indicava o fabricante (US Research Nanomaterials, Inc, Houston, TX, USA). No entanto, não foi observada ação antibacteriana em relação aos *S. mutans* decorrente da adição de NAg aos adesivos dentários neste estudo. Estes resultados apresentam-se divergentes dos de outros estudos, os quais mostraram além da ação antibacteriana da NAg, a diminuição da aderência de *S. mutans* ao material quando utilizaram sal de NAg, de 2,7nm, nas concentrações de 0,05% e 0,10% em peso, em *primers* e adesivos dentários (ZHANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013), ou quando adicionaram de 0,3% a 0,6% (BÜRQUERS *et al.*, 2009) e de 0,0125% a 0,3000% (DURNER *et al.*, 2010) de solução coloidal de NAg em volume, em resina *flow*, até 0,5% a 1,0% de NAg em pó, em resinas compostas (KARSRAEI & AZARSINA, 2012).

Damm *et al.* (2007) demonstraram que quanto menor o diâmetro das partículas de Ag melhor a sua distribuição e dispersão na massa polimérica, quanto mais hidrofílico for o polímero maior a eluição de Ag⁺ para o meio, e quanto maior a eluição de Ag⁺ mais efetiva a ação antibacteriana, sendo que a liberação de Ag⁺ está diretamente ligada ao tempo de imersão em líquido. Os adesivos dentários utilizados neste estudo, além de não apresentarem partículas de carga em sua composição, são constituídos por monômeros (HEMA, Bis-GMA) que formam polímeros de cadeia rica em carbono e oxigênio. A presença de grupos hidroxila, carboxila e fosfato nos monômeros e seus polímeros torna-os mais hidrofílicos e, supostamente, mais propensos a

sofrer sorção de água do que as resinas compostas (SIDERIDOU *et al.*, 2004) No entanto, essa hidrofília provavelmente tenha sido diminuída pela adição de NAg em pó, que pode ter funcionado como partícula de carga, fazendo com que a eluição de íons Ag^+ tenha sido prejudicada, o que justificaria a não observância de efeito antibacteriano no presente estudo. Adicionalmente, o tempo de armazenamento dos espécimes no caldo de cultura (48 horas) pode ter sido insuficiente para permitir um maior relaxamento das cadeias poliméricas e liberação da prata para o meio líquido (KARSRAEI & ARZASINA, 2012).

Outro fator a ser considerado é a susceptibilidade das diferentes espécies bacterianas aos agentes antibacterianos. Embora Ag tenha ação antibacteriana comprovada contra vários micro-organismos, as características estruturais bacterianas também interferem em sua ação. Os *S.mutans* utilizados neste estudo, são bactérias Gram-positivas e a parede celular desta espécie de bactérias contém 3-20 vezes mais peptidoglicanos do que a das Gram-negativas (KAWAHARA *et al.*, 2000). Como os peptidoglicanos são carregados negativamente, provavelmente parte deles se ligue ao Ag^+ presente no meio, neutralizando-o. Por conseguinte, as bactérias Gram-positivas são menos susceptíveis a agentes antibacterianos que eluem Ag^+ do que as espécies Gram-negativas (KAWAHARA *et al.*, 2000).

Hipóteses têm sido levantadas sobre o efeito adverso da adição de nanopartículas sobre as propriedades físicas, químicas e mecânicas de materiais adesivos. Em estudo prévio foi relatado que a adição de prata, em escala micrométrica, em uma concentração de 10% ou mais, em materiais dentários, reduziu significativamente a resistência à compressão, módulo de

elasticidade e resistência à tração desses materiais (YOSHIDA *et al.*, 1999) Portanto, o uso de nanopartículas, em baixas concentrações, tal como no presente estudo, pode conferir ao material propriedade antibacteriana e não afetar adversamente suas propriedades físico-químicas (BÜRGuERS *et al.*, 2009; KARSRAEI & AZARSINA, 2012).

A alteração de cor do material é uma das alterações físicas mais comuns quando se têm prata em sua composição, conferindo ao mesmo uma tonalidade mais acinzentada (LI *et al.*, 2009). Portanto, o uso de uma baixa concentração do metal, em nanopartículas, poderia evitar a alteração grave de cor dos adesivos dentários, como foi descrito por Zhang *et al.* (2012) que observaram que a adição de NAg em concentrações de 0,05% a 0,10% não alteraram a cor do material. Uma significativa alteração foi observada apenas quando realizaram a adição de 0,20% de NAg. No presente estudo, apesar de ter sido utilizada a NAg em baixa concentração (0,1%), foi observada significativa alteração de cor em ambos os adesivos estudados, o que limitaria seu uso na clínica diária.

Bürgers *et al.* (2009) relataram uma maior hidrofobia após a adição de prata em resinas compostas. Tem sido relatado que a composição do material é um fator importante na questão relacionada à sorção de água, pois o volume de sorção dependeria da hidrofilia da matriz polimérica e da quantidade de partículas presente em sua composição (SPAHL *et al.*, 1998). A resina usada no estudo de Bürgers *et al.* (2009) continha 38% em volume de partículas de dióxido de silício e teve seus valores de sorção diminuídos devido à adição de NAg, pois ocorreu o aumento da quantidade de carga no polímero. De acordo com Torchinsky & Rosenman (2009), partículas metálicas de prata têm uma

grande energia de superfície, assim, quanto menor o tamanho da partícula maior a atividade de energia de superfície e conseqüentemente, menor o ângulo de contato com a água.

Os adesivos dentários usados no presente estudo não apresentavam partículas de carga em sua composição, e mesmo com a adição de NAg não foi observada interferência desta adição nos valores de sorção e solubilidade. Isso pode ser explicado pela baixa concentração de NAg adicionada nos adesivos, quantidade que provavelmente não tenha sido suficiente para alterar a hidrofília do material. No entanto, diferenças significativas foram observadas quanto ao tipo de adesivo, sendo que o SB e SBaG apresentaram maiores valores de sorção e solubilidade do que SM e SmaG. Essa diferença ocorreu provavelmente pelo fato de SB apresentar solvente em sua composição, por ser um sistema de dois passos, o que o torna mais hidrofílico que o SM que é um sistema de três passos (MALACARNE *et al.*, 2006). Além disso, o fato de não ter sido realizada a evaporação do solvente do SB, com jato de ar, antes da polimerização dos espécimes pode ter contribuído para o aumento de sua hidrofília, sendo essa uma limitação da metodologia.

Diferença estatisticamente significantes também foram observadas quanto ao permeante no qual os espécimes foram armazenados, resultados estes concordantes com os de Moreira *et al.* (2010), e também quanto ao tipo de adesivo, sendo o SB, quando armazenado em etanol a 75%, sofreu aumento da hidrofobia (diminuição de sorção) e aumento dos valores de solubilidade, em comparação aos armazenados em água. A quantidade de sorção de solvente pelo polímero é determinada pelas diferenças de parâmetros de solubilidade entre o polímero e o permeante; uma maior

captação é obtida quando esta diferença é pequena (FERRACANE, 2006). Ferracane (2006) sugeriu que de todos os fluidos orgânicos, o intra-bucal é, provavelmente, um dos mais agressivos. De acordo com a US FDA (1988), a utilização de uma solução de etanol a 75% simulando uma situação adversa como a presença de alimentos e líquidos em longo prazo, no ambiente bucal é clinicamente relevante. Assim, o fato de o etanol a 75% apresentar parâmetro de solubilidade bem próximo ao do polímero e ser um permeante que simula uma ação mais agressiva na rede polimérica, justifica o fato do aumento dos valores de solubilidade neste estudo.

Apesar de não influenciar nos valores de sorção e solubilidade, a incorporação de NAg nos adesivos dentários testados trouxe a desvantagem da alteração da cor, que é uma limitação clínica considerável, visto que os mesmos são utilizados na adesão de materiais estéticos. Além disso, neste estudo não foi observada ação antibacteriana das NAg em pó na proporção de 0,1%. Desta forma, mais estudos são necessários para que se encontre a proporção e forma ideal de NAg a ser incorporada em adesivos dentários, de forma a evitar a alteração de cor e verificar a atividade antimicrobiana a longo prazo.

6 CONCLUSÃO

A adição de nanopartículas de prata, pura, em pó a 0,1% em peso, nos adesivos dentários não conferiu efeito antibacteriano ao material em relação aos *S. mutans*, causou alteração de cor e não interferiu nos valores de sorção e solubilidade dos mesmos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEYTH, N.; DOMB, A.J.; WEISS, E.I. An in vitro quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. **Journal of Dentistry**, v.35,n.3, p.201–6. 2007.

BÜRGERS, R.; EIDT, A.; FRANKENBERGER, R.; ROSENTRITT, M.; SCHWEIKL, H.; HANDEL, G. et al. The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. **Arch Oral Biol**, v.54, n.6, p.595–601. 2009.

DAMM, C.; MUNSTED, H.; ROSCH, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver nanocomposites. **Journal of Materials Science**, v.42, p.6067–73. 2007.

DURNER, J.; STOJANOVIC, A.; EBRU, U.; REINHARD, H.; FRANX-XAVER, R. Influence of silver nano-particles on monomer elution from light-cured composites. **Dent Mater**, v. 27, n.7, p.631-6. 2011.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G.B.; FIGUEIREDO, J.A.; ESTRELA, C.R. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms, **J Appl Oral Sci**, v.17, n.2, p.87-91. 2009.

FERRACANE JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dent Mater**, v.22, n.3, p.211-22. 2006.

FERRACANE, J.L. Resin composite—State of the art. **Dent Mater**, v.27, n.1, p.29–38. 2011.

IMAZATO, S.; KINOMOTO, Y.; TARUMI, H.; EBISU, S.; TAY, F.R. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. **Dent Mater**, v.19, n.4, p.313–9. 2003.

IMAZATO, S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: New dimension of innovation in restorative dentistry. **Dent Mater**, v.28, n.1, p.11–19. 2009.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION FOR ORGANIZATION. ISO 4049. Dentistry polymer-based filling, restorative and luting materials. Switzerland, 2010.

JOHNSTON, W.M.; KAO, E.C, Assesment of appearance match by visual observation and clinical colorimetry. **J Dent Res**, v.68, n.5, p.819-22. 1989.

KASRAEI, S.; ARZASINA, M. Addition of silver nanoparticles Reduces the wettability of methacrylate and silorane-based composites. **Braz Oral Res**, v.26, n.6, p.505-10. 2012.

KAWAHARA, K.; TSURUDA, K.; MORISHITA, M.; UCHIDA, M. Antibacterial effect of silver–zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. **Dent Mater**, v.16, n.6, p.452–5. 2000

LANSDOWN, A.B. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. **J Wound Care**, v.11, n.4, p.125–30. 2002.

LANSDOWN, A.B. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Curr Probl Dermatol**, v.33, p.17–34. 2006.

LI, F.; CHAI, Z.G.; SUN, M.N.; WANG, F.; MA, S.; ZHANG, L. et al. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. **Journal of Dentistry**, v.88, n.4, p.372–6. 2009

LOESCHE WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v.50, n.4, p.353–80. 1986.

LOVELL, L.G.; NEWMAN, S.M.; BOWMAN, C.N. The effect of light intensity on double bound conversion and flexural strength of a model, unfilled dental resin. **Dent Mater**, v.19, n.6, p.458-65. 2003.

MALACARNE, J.; CARVALHO, RM.; de GOES, M.F.; SVIZERO, N.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R. *et al.* Water sorption/solubility of dental adhesive resins. **Dent Mater**, v.22, n.10, p.973-80.2006.

MONTEIRO, D.R.; GORUP, L.F.; TAKAMIYA, A.S.; RUVOLLO-FILHO, A.C.; DE CAMARGO, E.R.; BARBOSA, D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **Int J Antimicrob Agents**, v.34, n.2, p.103-10. 2009.

MOREIRA, F.C.L.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; SOUZA, J.B.; LOPES, L.G. Sorption, solubility and residual monomers of a dental adhesive cured by different light-curing units. **Braz Dent J**, v.21, n.5, p.432-8. 2010.

ÖRTEGREN, U.; WELLENDORF, H.; KARLSSON, S.; RUYTER, I.E. Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. **J Oral Rehabil**, v.28, n.12, p.1106-25. 2001.

RAI, M.; YADA, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, n.1, p.76–83. 2009.

RUEGGERBERG, F.A.; CRAIG, R.G. Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. **J Dent Res**, v.67, n.6, p.932-37. 1988.

SAKU, S.; KOTAKE, H.; SCUGALL-VILCHIS, R.J.; OHASHI, S.; HOTTA, M.; HORIUCHI, S. et al. Antibacterial activity of composite resin with glass-ionomer filler particles. **Dent Mater**, v.29, n.2, p.193-8. 2010.

SARRETT, D.C. Prediction of clinical outcomes of a restoration based on in vivo marginal quality evaluation. **J Adhes Dent**, v.9, n.1, p.117–20. 2007.

SIDERIDOU, I.; ACHILIAS, D.S.; SPYROUDI, C.; KARABELA, M. Water sorption characteristics of light-cured dental resins and composites based on Bis-EMA/PCDMA. **Biomater**, v.25, n.2, p.367-76. 2004.

SLENTERS, T.V.; HAUSER-GERSPACH, I.; DANIELS, A.U.; FROMM, K.M. Silver coordination compounds as light-stable, nanostructured and anti-bacterial coatings for dental implant and restorative materials. **Journal of Materials Chemistry**, v.18, p.5359–62. 2008.

SPAHL, W.; BUDZIKIEWICZ, H.; GEURTSSEN, W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/ mass spectrometry. **J Dent**, v.26, n.2, p.137-45. 1998.

TORCHINSKY, I.; ROSENMAN, G. Wettability modification of nanomaterials by low-energy electron flux. **Nanoscale Res Lett**. v.4, n.10, p.1209-17. 2009.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US FDA). Recommendations for chemistry data for indirect food additives petitions. USA,1988.

WANG, Y.; SPENCER, P. Hybridization efficiency of the adhesives/dentin interface with wet bonding. **J Dent Res**, v. 82, n.2, p. 141-145. 2003.

WEIR, E.; LAWLOR, A.;WHELAN, A.; REGAN, F. The use of nanoparticles in antimicrobial materials and their characterization. **Analyst**, v.133, n.7, p.835–45. 2008.

YAP, A.U.J.; SOH, M.S.; HAN, V.T.S.; SIOW, K.S. Influence of curing lights and modes on cross-link density of dental composites. **Oper Dent**, v.29, n.4, p.410-15. 2004.

YOSHIDA, K.; TANAGAWA, M.; ATSUTA, M. Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.47,n.4, p.516–22.1999.

ZHANG, K.; MELOA, M.A.S.; CHENGA, L.; WEIR, M.; BAIB, Y.; XUA, H.H.K. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. **Dent Mater**, v.28, n.8, p.842-52. 2012.

ZHANG, K.; CHENG, L.; IMAZATO, S.; ANTONUCCI, J.M.; LIN, N.J.; LIN-GIBSON, S.; BAI, Y.; XU, H.H.K. Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties. **JDent**, v.41, n.5, p.464-74. 2013.

PUBLICAÇÃO

Influence of silver nanoparticles addition on the antibacterial effect, color change, sorption, and solubility of dental adhesives

Francine do Couto Lima Moreira Dentistry School, UNIP-GO, Rodovia BR 153, Km 503, Fazenda Botafogo - CEP 74.845-090 Goiânia - GO, Brazil.

Ana Paula Rodrigues Magalhães Dentistry School, UFG, Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, s/n, Faculdade de Odontologia, Setor Universitário - CEP 74.605-220 Goiânia-GO, Brazil

Denise Ramos Silveira Alves Dentistry School, UNIP-GO, Rodovia BR 153, Km 503, Fazenda Botafogo - CEP 74845-090 Goiânia - GO, Brasil.

Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela Dentistry School, UFG, Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, s/n, Faculdade de Odontologia, Setor Universitário - CEP 74.605-220 Goiânia-GO, Brazil

Ana Helena Gonçalves de Alencar Dentistry School, UFG, Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, s/n, Faculdade de Odontologia, Setor Universitário - CEP 74.605-220 Goiânia-GO, Brazil

Lawrence Gonzaga Lopes Dentistry School, UFG, Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, s/n, Faculdade de Odontologia, Setor Universitário - CEP 74.605-220 Goiânia-GO, Brazil

Carlos Estrela Dentistry School, UFG, Primeira Avenida esquina com Praça Universitária, s/n, Faculdade de Odontologia, Setor Universitário - CEP 74.605-220 Goiânia-GO, Brazil

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of silver nanoparticles (NAg) addition on the antibacterial effect, color change, sorption, and solubility of dental adhesives. Four groups of dental adhesives were analysed: SB - Single Bond 2 without NAg; SM - Scotchbond Multipurpose without NAg; SBAG - SB with 0.1% (weight) of NAg; SMAg - SM with 0.1% (weight) of NAg. It was evaluated the antimicrobial activity of adhesives in regard to the bacteria *S. mutans* by optical density of culture broth. It was also evaluated the adhesives` color change after adding NAg through the CIELab system. Sorption and solubility tests (ISO 4049:2010), were performed to verify the adhesives` polymeric quality. It was concluded that the addition of pure silver nanopowder in dental adhesive did not confer antibacterial effect to the material, cause material color changes and did not affect the values of sorption and solubility.

Keywords: Silver nanoparticles; Dental adhesives; Antimicrobial.

1 Introduction

Dental composites are increasingly used due to their excellent esthetics and improved performance.¹ Although the composites physical, chemical and mechanical properties have been significantly improved, a disadvantage is that they have a tendency to accumulate more biofilm on its surface than other restorative materials.² Biofilms with fermentable carbohydrates are responsible for caries,³ the biofilm accumulation at composite restorations needs to be reduced or inhibited to combat secondary caries and increase the longevity of the restorations.⁴

Adhesives are useful to bond the composite restoration to the tooth structure and maintain a functional interface.⁵ It is desirable for the adhesive to be antibacterial to inhibit recurrent caries at the tooth–composite margins.⁶ Incorporating antibacterial

agents into adhesives would be beneficial to combat biofilms and recurrent caries at the tooth–composite interfaces.^{6,7} While residual bacteria could exist in the prepared tooth cavity, microleakage may occur during service and bacteria can invade the tooth–restoration margins. Therefore, antibacterial adhesives could be used to hinder bacteria invasion and growth.⁸

Silver (Ag) has been shown to possess antibacterial, antifungal, and antiviral functions, and is an effective antibacterial agent against a wide range of microorganisms,⁹ but the antimicrobial action of silver or silver compounds is proportional to the amount of released bioactive silver ions (Ag⁺).¹⁰ Silver nanoparticles (NAg) are insoluble particles that are smaller than 100nm in size.¹¹ Due to the small size of NAg and the high specific surface area, a low NAg filler level could be used in the resin materials to achieve an antibacterial efficacy.^{12,13,14} It is beneficial to use a low NAg filler level so that did not adversely affect the material color and physical/mechanical properties.⁹ Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of silver nanoparticles addition on the antibacterial effect, color change, sorption, and solubility of dental adhesives.

2 Experimental procedures

Two dental adhesives were tested in this study: AdperTMSingle Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, USA), AdperTMScotchbond Multipurpose (3M-ESPE, St. Paul, MN, USA) (Table 1). Each material had NAg incorporated in their composition, in the polymer matrix. The materials were handled according to the guidelines of ISO 4049:2010,¹⁵ in regards to the preparation of specimens.

NAg used in this study was presented in powder, having a purity of 100% and the particle size of 20nm (U.S. Nanomaterials Research, Inc., Houston, TX, USA). It was added to the bottles of adhesives after being dosed and weighed in a proportion of 0.1%

by weight. After its addition, the bottles were shaken in an ultrasonic apparatus for 3 cycles of 10 minutes for complete dispersion of the metal in the material.

Thus, in the present study were established four different groups of adhesives: G1 - SB (Adper™Single Bond 2 without NAg), G2- SM (Adper™Scotchbond Multipurpose without Nag), G3 - SBAG (Adper™Single Bond 2 with the addition of 0.1% NAg), G4 - SMAg (Adper™Scotchbond Multipurpose with addition of 0.1% NAg).

2.1 Specimens preparation

This study was performed in compliance with ISO 4049:2010 standard specifications.¹⁵ The adhesives were directly dispensed drop-by-drop into a stainless steel matrix (10mmX1mm) until it was completely filled. A polyester strip was placed over the adhesive and covered with a glass slide. Specimens were cured using a light-curing unit based on light emitting diodes (LED) (Emitter, Schuster, Santa Maria, RS, Brazil). Continuous polymerization technique was used (potency of 600mW/cm² , for 40s). Light irradiance was checked before each photopolimerization with the built-in radiometer to ensure consistency of light output.

2.2 Antibacterial test

Standard strain of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) was obtained from American Type Culture Collection. The strain was inoculated into 7ml of BHI broth (Brain- heart infusion, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated at 37°C for 24h. After the incubation period, the bacterial cells were resuspended in four test-tubes with 10mL of BHI broth in a final concentration of approximately 3x10⁸cells/ml in each tube in accordance to the turbidity standard 1 of McFarland scale¹⁶.

Seventy-two specimens were used to the antibacterial test, being n=18 for each group. Each group specimens were stored in a Petri dish appropriately indentified. Three specimens of each group were not contaminated. A quantity of 10 mL of bacterial

suspension was added to each dish for contamination of specimens with *S. mutans*. Contamination was carried out at time periods of 1 min, 5 min, 1h, 6h, and 24h (n = 3). Then, the specimens were placed in test tubes with 10 mL of deionized sterile water for washing with vortexing (Model AP 56, Phoenix) for 1 minute. In sequence, they were reconditioned to test tubes with sterile BHI broth and incubated for 48 hours at 37°C in a bacteriological incubator (model B2CBE , Deleo). After incubation time, 2mL of broth sample were collected, and their optical density (turbidity) were analyzed by UV spectrophotometer (UV Spectrophotometer Model 1600 New, Piracicaba, SP, Brazil) set to read at a wavelength $\lambda = 600$ nm, adopting as standard the level 1 of McFarland scale, which corresponded to the absorbance of 0.137 nm after reset the device for BHI sterilized reading.

After collecting the culture broth, the specimens were individually irrigated with 10mL of sterile distilled water and stored in fixative solution for 7 days for subsequent analysis of presence/absence of bacteria on the specimens surface by scanning electron microscopy (SEM).

2.3 Evaluation of color changes

Twenty specimens were used to evaluate the color change, being n=5 for each group. The measurement of the color of the specimens was performed with an Easyshade spectrophotometer (Vita, Germany). For each specimen three readings were made using the parameters CIELab system (L* indicates lightness, a* represents the color saturation in red-green axis b* means color and saturation in blue-yellow axis). The reading for the determination of color parameters was always performed at the central point of the specimen in the same environment with the same lighting conditions.

The influence of NAg in color was directly expressed by ΔE values that indicate the color difference between an initial condition collected on SB and SM specimens, and

the other evaluated condition collected on SBAG and SMAg specimens, respectively. The variation of ΔE was used to represent the difference in color and was calculated from the formula: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5}$, where $\Delta L^* = L_1^* - L_0^*$, $\Delta a^* = a_1^* - a_0^*$, $\Delta b^* = b_1^* - b_0^*$. ΔE values ≥ 3.3 were considered unacceptable.¹⁷

2.4 Sorption and solubility test

Forty specimens were placed individually in open glass bottles, which were placed in desiccators containing freshly dried white silica (Vetec[®], batch 0506198) and kept at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ inside a vacuum oven for 22 hours (LF Equipment - Model 440 D). After that, the desiccators containing the specimens were removed from the oven and left on a bench for 2 hours at a temperature of $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, which completed a 24 hour cycle. The specimens were weighed daily using an analytical balance (AB204-S, Mettler Toledo, São Paulo, SP, Brazil; accuracy to 0.01mg) to record 24h weighing cycles. The complete cycle was repeated until a constant mass (M1) was obtained, i.e., until the mass loss for each specimen was not more than 0.1mg per 24h cycle. Thereafter, the specimens were carefully placed back in their labeled bottles, and 15mL of permeants, either deionized water (W) or 75% ethanol (E), were added using manual pipettes (one for each permeant). The bottles were capped, brought back into the oven and kept at a temperature of $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ for twenty eight days.

After this time period, all the bottles were removed from the oven and kept at room temperature ($23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) for two hours. The specimens were removed from the bottles, dried with absorbent paper for 15 seconds and left in a sterile bucket for 1 minute. They were then weighed again to obtain M2. After weighting, the specimens were reconditioned in the desiccators until they reached a constant weight (M3) using the cycle describe for M1.

The values for water sorption (Wsp) and solubility (Wsl) in micrograms per cubic millimeter were calculated using the following equations: $W_{sp}=(M2-M3)/V$; $W_{s1}=(M1-M3)/V$; $V= \pi r^2 \cdot h$.

2.5 Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for multiple comparisons ($p=0.05$) for all tests, except for ΔE that was analyzed by Pearson's correlation ($p=0.01$).

3 Results and discussion

In Table 1, mean and standard deviation (SD) of the optical density of the culture broth used to store the adhesive specimens contaminated with *Streptococcus mutans* were observed. All groups showed optical density values greater than 0.137nm (standard 1 of McFarland scale), and there were no statistically significant differences between the adhesives at different periods of contamination ($p>0.05$). The SB group in 1h period showed values significantly higher ($p<0.05$) when compared to the SMAg, at the same time. The specimens of each group that were not contaminated had been optical density values of zero nanometer ($p<0.05$). By analyzing the surface of the specimens was observed by SEM the absence of bacteria in groups SB, SBAG and SMAg, and presence in the SM group specimens. It was observed the absence of bacteria on the surface of all uncontaminated specimens.

It is extremely important the development of adhesive systems with antibacterial characteristics, in order to reduce the occurrence of secondary caries.¹⁸ Furthermore, composites have a greater susceptibility for colonization by the microorganism, as compared to other restorative materials.² Considering that the adhesive systems have direct contact with the tooth structure by staying in the tooth-restoration interface, they

can act as a dispenser of antibacterial agents, and promising in inhibiting biofilm formation and secondary caries.^{6,7}

Silver (Ag) has been shown to possess antibacterial, antifungal, and antiviral functions, and has been known to be an effective antibacterial agent against a wide range of microorganisms.⁹ Regarding its antimicrobial mechanism, it was suggested that the Ag ions could inactivate the vital enzymes of bacteria to cause the bacterial DNA to lose its replication ability, leading to cell death.¹⁹ Ag has several properties worth mentioning: biocompatibility with human cells;²⁰ long-term antibacterial effect due to sustained silver ion release; and less bacterial resistance than antibiotics.²¹ An additional advantage for NAg is the small particle size and the associated high specific surface area, which yielded a strong antibacterial potency at a low Nag filler level in the material. A low NAg filler level was advantageous because it could not adversely affect the physical properties of the primer.¹⁴

In the present study, it was used the NAg 20nm particle size, pure powder, which was added to the dental adhesive at a concentration of 0.1% by weight, as indicated by the manufacturer (U.S. Nanomaterials Research, Inc., Houston, TX, USA). However, no antibacterial effect was observed compared to *S. mutans* due to the addition of NAg in dental adhesives in this study. Contrary, other studies showed the antibacterial effect as a result of the NAg addition, and adhesion reducing of *S. mutans* when were used NAg salt of 2.7nm particles size, in concentrations of 0.05% to 0.1% by weight, in dental adhesives and primers^{13,14} or when added from 0.3 to 0.6%,¹² and 0.0125 to 0.3%²¹ of Nag colloidal solution in volume, until Nag powder 0.5 to 1% by weight, in composite resins.²³

The smaller is Ag particle diameter, better the distribution and dispersion in the polymeric mass, how much more hydrophilic the polymer is, greater the elution of Ag+

in the environment, the greater is elution of Ag⁺, more effective the antibacterial effect, and the release of Ag⁺ is directly linked to the time of immersion in liquid.²¹ The dental adhesive used in this study, besides of not having charged particles in their composition, are made up of monomers (HEMA, Bis-GMA) that form oxygen and carbon-rich chain polymers that make them more hydrophilic and presumably more likely to suffer water sorption than the composite resins.²⁴ However, this hydrophilicity was probably decreased by the addition of NAg powder, which would act as particle charging, causing the elution of Ag⁺ ions were impaired, which would justify non-compliance with antibacterial effect. Moreover, the storage time of the specimens in the culture broth (48 hours) may have been insufficient to allow for a better relaxation of the polymer chains and release of silver to the broth.²³

Differences among bacterial species may influence their susceptibility to antibacterial agents. The cell walls of Gram-positive species contain 3–20 times more peptidoglycan than Gram-negative bacteria. Since peptidoglycans are negatively charged, they probably bind some portion of Ag⁺ in the broth. Consequently, Gram-positive bacteria are generally less susceptible to antibacterial agents containing Ag⁺ than Gram-negative species.²⁵

Data obtained from the test for evaluation of color changes are shown in Table 2. After addition of NAg in their composition, both adhesives change in color when compared to the reference value of $\Delta E = 3.3$ ($p < 0.05$). The change was greater for the adhesive SM, $\Delta E = 31.97$, compared to the SB color change, $\Delta E = 13.93$ ($p < 0.01$).

The color change of the material is one of the most common physical alteration when you have silver in their composition, which eventually get a more gray shade.⁷ Therefore, the use of a low concentration of NAg can prevent serious color deteriorations of dental adhesives, as described by Zhang *et al.*¹³ who found that the

addition of NAg at concentrations from 0.05% to 0.1% did not change the color of the material. A significant change was observed only when performed adding of 0.2%. In the present study, despite having been used NAg at low concentration (0.1%), there was significant color change in both studied adhesives, which would limit their use in daily clinical practice.

In Table 3, mean and standard deviation (SD) of sorption and solubility values were described. For sorption were observed statistically significant differences between the adhesive SB and SM ($p < 0.05$) and between SBAg and SMAg ($p < 0.05$), but no difference was observed between SB and SBAg ($p > 0.05$) and between SM and SMAg ($p > 0.05$). For solubility, there were statistically significant differences between the adhesive SB and SM ($p < 0.05$), and between SBAg and SMAg ($p < 0.05$), but no difference was observed between SB and SBAg ($p > 0.05$) when stored in water, and between SM and SMAg ($p > 0.05$), either when stored in water or ethanol. Statistically significant difference was noted between SB and SBAg only when stored in ethanol ($p < 0,05$).

Bürgers *et al.*¹² reported an increased hydrophobicity after adding silver in composites. The material composition is important as it relates to water sorption because the amount of sorption depends on the hydrophilicity of the polymer matrix and quantity of particles present in composition.²⁶ The resin used in the Bürgers *et al.*¹² study contained 38% by volume silicon dioxide particles and had water sorption values decreased due to the addition of NAg occurred due to increasing the amount of filler in the polymer. NAg have a large surface energy, thus how much smaller the particle size, greater the activity of surface energy thus lower the contact angle with water.²⁷

The dental adhesives used in this study had no filler particles in their composition, and even with the addition of NAg this addition was not observed interfering in sorption and

solubility values. This can be explained by the low concentration of NAg added in adhesives in this study, which quantity was probably not enough to change the hydrophilicity of the material. However, significant statistical differences were observed as type of adhesive, where SB and SBAG presented higher values of water sorption and solubility than SM and SMAg, respectively. This is probably because of the solvents present in SB composition what made it present a more hydrophilic behavior than SM.²⁸ Significant differences were observed on the permeant in which the specimens were stored as related by Moreira *et al.*²⁹ When being stored in 75% ethanol there was increased the hydrophobicity (decrease of sorption) and increased solubility values as compared to those stored under water. The amount of water sorption by the polymer solvent is determined by the difference in solubility parameters between the polymer and the permeant, a higher uptake is obtained when this difference is small.³⁰ Ferracane³⁰ suggested that between all body fluids, the intra-oral is probably one of the most aggressive. According to U.S. FDA³¹ using a solution of 75% ethanol simulating a food / liquid, long-term oral environment is clinically relevant. Thus, the fact that 75% ethanol present solubility parameter very close to polymer parameter and simulate more aggressive action in the polymer network, justifies the increase in solubility values.

4 Conclusion

In conclusion, the addition of 0.1% pure silver nanopowder in dental adhesives did not confer antibacterial effect to the material, cause material color changes and did not affect the values of sorption and solubility.

References

1. Ferracane JL. Resin composite—State of the art. *Dental Materials*. 2011; 27(1):29–38.
2. Beyth N, Domb AJ, Weiss EI. An *in vitro* quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *Journal of Dentistry*. 2007; 35(3):201–6.
3. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*. 1986; 50(4):353–80.
4. ten Cate JM. Biofilms. a new appr approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006; 94:1–9.
5. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adesives/dentin interface with wet bonding. *Journal of Dental Research*. 2003; 82(2):141-5.
6. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay F.R. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dental Materials*. 2003; 19(4):313–9.
7. Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L, *et al.* Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. *Journal of Dentistry*. 2009; 88(4):372–6.
8. Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S. An *in vivo* evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dental Materials*. 2007; 23:170–6.
9. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009; 34(2):103-10.
10. Lansdown AB. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wound Care*. 2002; 11(4):125–30.
11. Weir E, Lawlor A, Whelan A, Regan F. The use of nanoparticles in antimicrobial materials and their characterization. *Analyst*. 2008; 133(7):835–45.
12. Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G *et al.* The anti-adherence activity and bactericida effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Archives of Oral Biology*. 2009; 54(6):595–601.

13. Zhang K, Melo MAS, Chenga L, Weir M, Baib Y, Xua HHK. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. *Dental Materials*. 2012;28(8):842-52.
14. Zhang K, Cheng L, Imazato S, Antonucci JM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Bai Y, Xu HHK. Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties. *Journal of Dentistry*. 2013;41(5):464-74.
15. International Organization for Standardization. ISO 4049. Dentistry polymer-based filling, restorative and luting materials. Switzerland, 2010.
16. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci*. 2009 Mar-Apr; 17 (2): 87-91.
17. Johnston WM, Kao EC. Assessment of appearance match by visual observation and clinical colorimetry. *Journal of Dental Research*. 1989; 68(5):819-22.
18. Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: New dimension of innovation in restorative dentistry. *Dental Materials*. 2009; 28(1):11–19.
19. Rai M, Yada A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 2009; 27(1):76–83.
20. Slenters TV, Hauser-Gerspach I, Daniels AU, Fromm KM. Silver coordination compounds as light-stable, nanostructured and anti-bacterial coatings for dental implant and restorative materials. *Journal of Materials Chemistry*. 2008; 18:5359–62.
21. Damm C, Munsted H, Rosch A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver nanocomposites. *Journal of Materials Science*. 2007; 42:6067–73.
22. Durner J, Stojanovic A, Ebru U, Reinhard H, Franx-Xaver R. Influence of silver nano-particles on monomer elution from light-cured composites. *Dental Materials*. 2011; 27(7):631-6.
23. Kasraei S, Arzasina M. Addition of silver nanoparticles Reduces the wettability of methacrylate and silorane-based composites. *Brazilian Oral Research*. 2012; 26(6):505-10.

24. Sideridou I, Achilias DS, Spyroudi C, Karabela M. Water sorption characteristics of light-cured dental resins and composites based on Bis-EMA/PCDMA. *Biomaterials*. 2004; 25(2):367-76.
25. Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials*. 2000; 16(6):452-5.
26. Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/ mass spectrometry. *Journal of Dentistry*. 1998; 26(2):137-45.
27. Torchinsky I, Rosenman G. Wettability modification of nanomaterials by low-energy electron flux. *Nanoscale Research Letters*. 2009; 4(10):1209-17.
28. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR *et al*. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dental Materials*. 2006; 22(10):973-80.
29. Moreira FCL, Antoniosi-Filho NR, Souza JB, Lopes LG. Sorption, solubility and residual monomers of a dental adhesive cured by different light-curing units. *Brazilian Dental Journal*. 2010; 21(5):432-8.
30. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials*. 2006; 22(3):211-22.
31. United States Food and Drug Administration (US FDA). Recommendations for chemistry data for indirect food additives petitions. USA, 1988.

Tables

Table 1 Mean and standard deviation (SD) values of optical density of culture broth of specimens contaminated with *Streptococcus mutans*

Adhesive	Contaminação time				
	1min	5min	1h	6h	24h
SB	1,059±0,265 ^{A,a}	1,094±0,101 ^{A,a}	1,435±0,609 ^{A,a}	0,837±0,402 ^{A,a}	1,032±0,045 ^{A,a}
SM	1,031±0,007 ^{A,a}	0,894±0,260 ^{A,a}	1,008±0,071 ^{AB,a}	0,906±0,154 ^{A,a}	1,104±0,031 ^{A,a}
SBAg	0,902±0,18 ^{A,a}	1,031±0,022 ^{A,a}	1,035±0,027 ^{AB,a}	0,907±0,252 ^{A,a}	1,065±0,013 ^{A,a}
SMAg	0,975±0,022 ^{A,a}	0,973±0,008 ^{A,a}	0,556±0,390 ^{B,a}	1,003±0,031 ^{A,a}	1,098±0,061 ^{A,a}

Same superscript letters (A,B) in the columns, and same superscript letters (a) in the lines indicate no statistically significant difference (Tukey test; $p=0.05$).

Table 2 Mean and standard deviation (SD) color change of dental adhesives SB and SM, by CIELab system after the addition of nanosilver

CIELab system	Adhesive			
	SB	SBAg	SM	SMAg
Color	B2	C3	A1	C4
L	85,0±3,5 ^A	71,2±1,8 ^B	86,1±2,7 ^A	54,3±1,6 ^C
a	-3,7±0,8 ^A	-2,3±0,2 ^B	-0,5±0,2 ^C	-0,1±0,1 ^C
b	21,6±1,3 ^A	20,3±1,1 ^A	15,4±0,1 ^B	12,1±0,4 ^C
ΔE	13,93^B		31,97^A	

Same superscript letters (A-C) in the lines indicate no statistically significant difference (Tukey test; $p=0.05$). For ΔE , same superscript letters (A,B) in the line indicate no statistically significant difference (Pearson`s correlation; $p=0.01$)

Table 3 Mean and standard deviation (SD) values of water sorption and solubility of specimens stored in water (W) and 75% ethanol (E)

Adhesive	Water sorption ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)		Solubility ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	
	W	E	W	E
SB	34,89 \pm 25,79 ^{A,a}	22,60 \pm 9,26 ^{A,a}	100,84 \pm 5,36 ^{A,a}	96,45 \pm 24,03 ^{B,a}
SM	-0,76 \pm 1,7 ^{B,a}	-26,48 \pm 2,90 ^{B,b}	32,85 \pm 2,90 ^{B,b}	69,77 \pm 2,28 ^{BC,a}
SBAg	43,04 \pm 5,43 ^{A,a}	26,31 \pm 5,15 ^{A,a}	105,17 \pm 14,02 ^{A,b}	145,57 \pm 7,01 ^{A,a}
SMAg	-2,04 \pm 1,71 ^{B,a}	-24,19 \pm 2,38 ^{B,b}	29,79 \pm 3,99 ^{B,b}	60,69 \pm 26,19 ^{C,a}

Same superscript letters (A-C) in the columns, and same superscript letters (a,b) in the lines indicate no statistically significant difference (Tukey test; $p=0.05$).

ANEXOS

ANEXO 1 Normas de publicação do periódico

Materials Research
Ibero-american Journal of Materials
www.materialaresearch.org.br
ISSN 1516-1439 *printed version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope and Policy

Materials Research Ibero-american Journal of Materials is devoted to the publication of original papers on experimental, theoretical and simulation research on the processing, structure and properties of materials. Original contributions (Articles and Letters) are solicited. Review papers require an invitation from the Editors.

The submission of a paper implies that it has not been previously published, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that it will not be published elsewhere in the same form without the written permission of the Editors. By submitting a manuscript, the authors agree that the copyright for their article is transferred to *Materials Research Ibero-american Journal of Materials* if and when the article is accepted for publication. Accepted articles and illustrations become the property of *Materials Research Ibero-american Journal of Materials*.

Form and preparation of manuscripts

Language and style: All submissions should be in English, double spaced and typed on an A4 (209 x 296 mm) paper, with Times New Roman font-size 12, and with ample (~2.5 cm) top, bottom and left-hand margins. In general, the typescript for articles should follow the conventional form: title, authors' names and full addresses, abstract, introduction, literature review, experimental, simulation or calculation procedures, results and discussion, conclusions, acknowledgments, references, tables, figure captions, and figures.

Letters are restricted to reports of unusual urgency, significance or interest, and should be limited to 1000 words or the equivalent. A statement from the authors as to why the manuscript meets these criteria will be helpful to the Editor. Letters will not be accepted if, in the opinion of the Editor, the principal content has previously been released or publicized in any other published medium. In estimating the length of a Note, an average sized figure is counted

as 100 words and separate formulae and lines of a table are counted as 8 words per line, including headings and horizontal rulings. The title, authors' names, and literature references are not counted.

Title: This should be brief and convey the contents of the paper.

Abstract: An Abstract in English must be included. It should be short, not more than 150 words for an Article and 50 words for Letters, and should contain numerical and factual data only.

Keywords: The authors should indicate a minimum of three keywords.

Illustrations: All necessary illustrations should be submitted with at least 300 dots per inch (600 dpi recommended). Graphs and diagrams should be consecutively numbered in Arabic numerals in the order in which they appear in the text. The submitted illustrations will be reduced and directly reproduced in the published paper, so authors should take particular care to ensure that all lettering of an illustration (particularly the smallest ones) are clearly legible. Figures should be supplied on separate pages, which are the same size as those of the manuscript. Each illustration should be marked with the names of the authors and the illustration number.

Tables: Each table should be typed or printed on a separate sheet, and should have a caption in addition to its sequence number.

Photographs: Photographs should be submitted with at least 300 dots per inch (600 dpi recommended), high contrast and positive. When necessary, the scale should be drawn on the photograph itself, and not below. Color photographs may be published at additional cost.

Captions for figures: These should give sufficient information to make the illustration comprehensible.

Bibliography: Reference numbers in the text should be typed as superscripts without parentheses. The literature cited should be printed on a separate page (double-spaced), and should be listed in the order in which it appears in the text. Articles not yet published should be cited as "in press", "submitted for publication" (journal should be specified in both cases), or "personal communication". In the reference list, the style, punctuation and capitalization should conform to the following examples:

Referring to an article in a periodical (journal, magazine, newspaper etc.)

1. Harris S, Hyland T. Basic skills and learning support in further education. *Journal of Further and Higher Education*. 1995; 19(1):42-48.

Referring to a book by a single author, or by a group of authors who have not written chapters separately (a monograph)

2. Gorbachev M. *Perestroika*. expanded ed. London: Fontana / Collins; 1987.

Referring to a chapter of book

3. Ashby MF and Jones DRH. Metals. In: *Engineering materials 2: an introduction to microstructures, processing and design*. 3rd ed. Burlington: Elsevier; 2006. p. 3-15.

Referring to a thesis or dissertation

4. Paggett JW. *Neutron diffraction study of load response and residual stresses in WC-(Ni/Co) composites*. [Dissertation]. Columbia: University of Missouri; 2005.

Referring to conference papers or proceedings

5. Garat M, Maenner L and Sztur CH. State of the art of thixocasting. In: *Proceedings of the 6th International Conference on the Semi-solid Processing of Alloys and Composites*; 2000; Turin, Italy. Brescia: Edimet Spa; 2000. p. 187-194.

Referring to a publication in electronic format

6. Brasil. Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. *Informativo anual da indústria carbonífera*. Brasília: Ministério de Minas e Energia; 2006. Available from: <<http://www.dnpm.gov.br>>. Access in: 20/11/2010.

Function of Referees: The Editor seeks the advice of experts in the research areas of the submitted manuscripts. Referees should estimate the originality, soundness and scientific value of the work, together with some basis for their opinion. They should also indicate whether the writing is clear and concise. Improperly used space merely restricts the amount of useful material which can be published. The Editor, who accepts full responsibility for decisions about manuscripts, may not always follow the recommendations from the referees. Papers which are not accepted by the Editor will be returned to the authors, and there will be no communication about them with the editors of other journals.

General Considerations: Authors should present their materials with the utmost conciseness and clarity. Extensive reviews of the literature cannot be accepted, however, the state-of-art on the specific subject covered by the article must be clearly stated. Well-known procedures should either be designated by name or literature references. Notes acknowledging technical assistance for the research or indicating presentation at a meeting should be brief. The name of the author to whom inquiries about the paper may be addressed should be marked with an asterisk. The authors' official titles should not be included. Introductions should contain only enough background material to show why the work was done and why it is worth publishing. This

information should also be addressed in the cover letter sent to the editor.

Experimental results are of lasting value and should be clearly and logically presented in a separate section. Results and discussions should be sequential. The addition of a final section at the end of the paper, which briefly summarizes the main conclusions of the work, is recommended.

General Instructions: Contributions will only be considered for publication when submitted in our online submission website located at <http://materialsresearch.org.br>. File types accepted for submission: DOC, RTF, PDF, TIFF, XLS, PPT, EPS, ZIP, BMP or JPG. The first page should contain the title and authors' names and addresses, the title, the abstract and the keywords. The text should start on the second page. All pages of the manuscript should be numbered consecutively, including references and notes, tables, figure captions and figures, which should be presented in this sequence. The submission should also include the original graphs, drawings of apparatus, and structural formulae. The authors should indicate in the text itself or in marginal notes in the typescript where the tables and figures are to be inserted.

The attention of contributors is particularly directed to the requirement that all nomenclature should be consistent, clear, unambiguous, and conform to the rules of nomenclature established by the International Union of Pure and Applied Chemistry, the International Union of Biochemistry, the Abstracts Service (see Index Guide to Chemical Abstracts, 1987), the Nomenclature Committee of the American Chemical Society, or other appropriate bodies.

Galley Proofs and Reprints: Galley proofs are provided for the correction of printing errors. The correction of proofs should not be used for improvement in the language or substance of the paper. The cost of changes considered to be excessive will be charged to the author(s). If changes in the conclusions are necessary due to work done or published since the manuscript was prepared, it is preferable that a brief Note Added in Proof be prepared. Corrected galley proofs should be returned promptly, preferably within 48 hours by e-mail or as instructed by the desktop publishing company. Since page charges have been eliminated, authors are not entitled to free reprints. A reprint order form is sent to the corresponding author if requested to.

Desktop Publication: *Materials Research Ibero-american Journal of Materials* is published by a desktop publishing process. Authors are requested to prepare their papers using word processors. After being accepted for publication, the final corrected version should be sent by e-mail or as instructed by the editorial board.

Send of the manuscripts

Contributions will only be considered for publication when submitted in our online submission website located at <http://www.materialsresearch.org.br>