



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DE CIMENTOS RESINOSOS EXPERIMENTAIS CONTENDO NISINA
COMO AGENTE ANTIBACTERIANO**

Niterói
2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE DE CIMENTOS RESINOS EXPERIMENTAIS CONTENDO NISINA COMO
AGENTE ANTIBACTERIANO**

FREDERICO EMYGDIO CABRAL DE VASCONCELLOS

Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Laiza Tatiana Poskus

Niterói

2021

Prof(a). Dr(a). Laiza Tatiana Poskus

Instituição: Universidade Federal Fluminense (UFF)

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Leandro Augusto Hilgert

Instituição: Universidade de Brasília (UnB)

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Luciana Meirelles Miragaya

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Glauco Botelho dos Santos

Instituição: Universidade Federal Fluminense (UFF)

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Maristela Barbosa Portela

Instituição: Universidade Federal Fluminense (UFF)

Decisão: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha esposa e aos meus filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha esposa e aos meus filhos pelo amor, companheirismo, apoio, força e incentivo sempre.

Agradeço aos meus pais por tudo que sempre fizeram e fazem por mim.

Agradeço à minha Orientadora Profa. Dra. Laiza Poskus por ter me aceitado como orientado e por todos os ensinamentos passados, sempre com muita humildade e sabedoria.

Agradeço à Profa. Dra. Maristela pela ajuda nos testes de microbiologia.

Agradeço aos professores da Dentística pelos ensinamentos e suporte.

Agradeço aos colegas alunos do Mestrado e Doutorado pelas trocas e ajudas durante todo o período do Doutorado.

Agradeço aos funcionários da Dentística pela ajuda, especialmente, Seu Zé por toda ajuda no laboratório.

RESUMO

Vasconcellos FEC. Análise de cimentos resinosos experimentais contendo nisina como agente antibacteriano. Niterói: Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2021.

O cimento resinoso (CR) vem sendo amplamente utilizado em restaurações indiretas devido a sua capacidade de adesão e suas características estéticas. Contudo, cáries recorrentes são uma das principais causas de falha desse tipo de restauração. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antibacteriano de CRs experimentais contendo nisina em diferentes concentrações, variado o conteúdo da porção inorgânica, bem como verificar as propriedades físico-mecânicas desses CRs. Também foi objetivo verificar se haveria um efeito protetor da dentina submetida a um desafio cariogênico quando utilizados estes CRs. Um cimento experimental foi manipulado com a matriz orgânica sendo composta por UDMA, Bis-GMA, TEGDMA, Peróxido de Benzoila, Canforoquinona e N N-Dimetil-P-Toluidina e a matriz inorgânica por uma mistura (15:1) de partículas de vidro de bário (0.7µm) e sílica pré-silanizada em concentrações de 50 ou 60% p/p, e nisina em concentrações de 0, 2,5, 5, 7,5 ou 10% p/p, totalizando 10 grupos experimentais. Quantificação da atividade metabólica do biofilme de *S. mutans*, grau de conversão (GC%), sorção, solubilidade e análise de microdureza (Knoop) após desafio cariogênico foram realizados. Os grupos 7,5 e 10% de nisina apresentaram atividade metabólica estatisticamente significante menores que os demais grupos, sendo que a quantidade de partículas de carga não influenciou os resultados. Os resultados do GC% apresentaram diferença estatística significante somente para o fator nisina. Os grupos com 7,5 e 10% de nisina apresentaram valores menores de grau conversão do que o grupo controle. Os dados de sorção e solubilidade, não apresentaram diferença estatística significante. Os grupos com 7,5 e 10% de nisina, a uma distância de 50 e 150µm da linha de cimentação, apresentaram menores variações de microdureza que os demais grupos. Podemos concluir que a adição de nisina nos cimentos resinosos nas concentrações 7,5 e 10% foi efetiva em reduzir a atividade do *S. mutans* e promover um efeito protetor da dentina nas distâncias de 50 e 150 µm da linha de cimentação, sendo observada uma redução

do grau de conversão monomérica, embora não tenham sido afetadas a sorção e solubilidade dos materiais.

Palavras-chave: cimentos resinosos, nisina, atividade antimicrobiana, micro dureza.

ABSTRACT

Vasconcellos FEC. Analysis of experimental resin cements containing nisin as an antibacterial agent. Niterói: Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2021.

Resin cement (RC) has been widely used in indirect restorations due to its adhesion capacity and aesthetic characteristics. However, secondary caries are one of the main causes of failure of this type of restoration. The aim of the present study was to evaluate the antibacterial effect of experimental RCs containing nisin at different concentrations, varying the content of the inorganic portion, as well as to verify the physical-mechanical properties of these RCs. It was also aimed to verify whether there would be a protective effect of dentin subjected to a cariogenic challenge when using these RCs. An experimental cement was manipulated with the organic matrix being composed of UDMA, Bis-GMA, TEGDMA, Benzoyl Peroxide, Camphorquinone and N-N-Dimethyl-P-Toluidine and the inorganic matrix by a mixture (15:1) of glass particles of barium (0.7 μ m) and pre-silanized silica at concentrations of 50 or 60% w/w, and Nisin at concentrations of 0, 2.5, 5.0, 7.5 or 10% w/w, totaling 10 experimental groups. Quantification of the metabolic activity of *S. mutans* biofilm, degree of conversion (GC%), sorption, solubility and microhardness analysis (Knoop) after cariogenic challenge were performed. The 7.5 and 10% nisin groups had statistically significant lower metabolic activity than the other groups, and the amount of filler content did not influence the results. The GC% results showed a statistically significant difference only for the nisin factor. The groups with 7.5 and 10% nisin had lower conversion values than the control group. Sorption and solubility data showed no statistically significant difference. The groups with 7.5 and 10% nisin at a distance of 50 and 150 μ m from the cementation interface showed smaller variations in microhardness than the other groups. We can conclude that the addition of nisin in resin cements at concentrations of 7.5 and 10% was effective in reducing the activity of *S. mutans* and promoting a protective effect of dentin at distances of 50 and 150 μ m from the cementation interface, with a reduction of the degree of monomeric conversion, although the sorption and solubility of the materials were not affected.

Keywords: resin cements, nisin, antimicrobial activity, microhardness.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. PROPOSIÇÃO	11
3. METODOLOGIA.....	12
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

Os cimentos resinosos (CRs), principalmente pelo seu potencial de união à estrutura dentária e por proporcionar um resultado estético desejável, vêm sendo amplamente recomendados para cimentação de restaurações indiretas estéticas (1), promovendo retenção e selamento marginal entre o dente e a restauração e, conseqüentemente, impedindo a infiltração de bactérias e fluidos orais que poderiam levar ao desenvolvimento de cáries recorrentes comprometendo o sucesso das restaurações indiretas no que tange a longevidade (2-4).

Na condição de umidade inerente ao meio ambiente oral, os cimentos resinosos e sistemas adesivos estão sujeitos à degradação em decorrência dos processos de sorção e solubilidade (5, 6) e a interface de união à dentina, sujeita a ação de enzimas metaloproteinases (7), que estão associadas à degradação do colágeno. Esta degradação poderia comprometer o selamento marginal, criando espaços sujeitos ao acúmulo de biofilme e à proliferação bacteriana, como, por exemplo, do *S. mutans*, considerada uma das principais bactérias envolvidas no desenvolvimento da doença cárie (8, 9).

Além disso, tem sido mostrado que, no processo de confecção das restaurações indiretas, a adaptação marginal pode ser influenciada por fatores como a técnica de impressão dos preparos cavitários (10), o tipo de cimento utilizado (11), o tipo do material restaurador e sua técnica de confecção (12). A presença de gaps marginais também poderia aumentar a susceptibilidade de ocorrência de lesões cariosas recorrentes (13-15), sendo que alguns estudos têm associado a existência de maiores gaps na interface dente-restauração, ao maior comprometimento da estrutura dental em decorrência de lesões cariosas (16, 17).

Desse modo, diante do risco de desenvolvimento de cáries nas margens das restaurações indiretas, a ação antimicrobiana de cimentos resinosos teria uma relevância clínica, pois poderia inibir o desenvolvimento bacteriano em áreas mais susceptíveis ao acúmulo de biofilme. De fato, a adição de diferentes agentes antimicrobianos em compósitos resinosos, tais como clorexidina (18), partículas de prata (19), de óxido de zinco (20), 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) (21) ou monômeros resinosos a base de quartenário de amônio (22) tem mostrado um efeito antibacteriano. Com relação aos cimentos resinosos, a literatura

mostra também um efeito antimicrobiano quando nanopartículas de prata (16), compostos de amônio quaternário (23, 24), clorexidina (25), ou o ácido ursólico (26) estavam presentes.

Apesar da ação favorável dos agentes antibacterianos já investigados, ainda não há um consenso sobre o agente ideal, uma vez que poderiam trazer comprometimento estético ou mecânico dos materiais, ou terem uma curta ação antimicrobiana (27). Desse modo, a investigação de novos agentes antimicrobianos torna-se necessária, tendo a nisina reconhecido potencial para uso clínico (28). Este agente é uma bacteriocina produzida pelos *Lactococcus lactis*, que foi identificada em 1928 e aprovada pelo FDA em 1998, sendo largamente utilizada para conservação de alimentos, como um peptídeo bastante seguro (28). Estudos demonstraram que a nisina possui capacidade de inibir o crescimento de bactérias cariogênicas, por meio da alteração na permeabilidade da membrana celular, incluindo o *S. mutans* (29-31), além de ser segura por apresentar baixa toxicidade a células orais em concentrações antibacterianas (29). Quando incorporada em adesivos dentários foi capaz de manter sua ação antibacteriana, sem afetar as propriedades adesivas (32).

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antibacteriano de CRs experimentais contendo nisina em diferentes concentrações, variando o conteúdo da porção inorgânica, bem como verificar se determinadas propriedades físico-mecânicas desses CRs seriam afetadas. Também foi objetivo verificar se haveria um efeito protetor da dentina submetida a um desafio cariogênico quando utilizados estes CRs. As hipóteses do presente estudo são: (1) a adição de nisina nos CRs experimentais em qualquer concentração será capaz de promover um efeito antibacteriano contra *S. mutans*, independente do conteúdo inorgânico; (2) a adição de nisina nos CRs experimentais não comprometerá as propriedades físico-mecânicas; (3) a presença da nisina nos CRs experimentais em qualquer concentração, será capaz de conferir um efeito protetor da dentina ao redor do cimento.

3. METODOLOGIA

3.1 Síntese dos cimentos resinosos experimentais

Um cimento resinoso (CR) experimental dual foi formulado, sendo composto por duas pastas, A e B, de acordo com a tabela 1. Os monômeros Uretano dimetracrilato (UDMA), Bisfenol A glicol dimetacrilato (Bis-GMA) e Trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) foram obtidos da Essthec Inc. (Essington, PA, USA). O peróxido de benzoila (PB), a Canforoquinona (CQ), Etil 4-dimetil aminobenzoato (EDMAB) (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI, USA) e o N N-DIMETIL-P-TOLUIDINA, responsáveis pelo sistema de ativação da polimerização do CR, foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Após manipulação da matriz orgânica, uma mistura (15:1) de partículas de vidro de bário (0.7nm) e sílica pré-silanizada, obtidas da Essthec Inc. (Essington, PA, USA), e a nisina, obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), foram adicionadas em ambas as pastas nas diferentes concentrações de acordo com a tabela 1, totalizando 10 grupos experimentais. Todos os componentes foram pesados em balança analítica (AUW 220D, Shimadzu, Tokyo, Japan), misturados e homogeneizados em uma centrífuga (150.1 FVZ SpeedMixer DAC, FlackTek, Inc., Herrliberg, Germany) a 2400 rpm por 2 min.

Para todos os testes, um mesmo volume das pastas A e B foi dispensado em uma placa de vidro e manipulados por 10 segundos com uma espátula 24.

Tabela 1 – Composição dos CRs experimentais

Matriz Orgânica Composição (% p/p)	Partículas de carga (% p/p)	Nisina (% p/p)	Grupos experimentais
Pasta A: UDMA (40%), Bis-GMA (19%), TEGDMA (40%), PB (1%)	50	0	I5N0
	60		I6N0
Pasta B: UDMA (40%), Bis-GMA (17,5%), TEGDMA (40%), CQ (1%), EDMAB (1%), N N-DIMETIL-P-TOLUIDINA (0,5%)	50	2,5	I5N2.5
	60		I6N2.5
	50	5	I5N5
	60		I6N5
50	7,5	I5N7.5	

	60		I6N7.5
	50	10	I5N10
	60		I6N10

3.2. Atividade metabólica de *S. mutans*

3.2.1. Indução do biofilme nos espécimes

Primeiramente, discos de 1mm de espessura por 6mm de diâmetro (n=5) foram confeccionados para cada grupo experimental, com auxílio de uma matriz de aço. Após manipulação dos cimentos conforme descrito anteriormente, e inserção no interior da matriz de aço, uma matriz de poliéster foi colocada sobre a superfície e uma lâmina de vidro foi pressionada sobre esta, com a finalidade de planificar a superfície e extravasar os excessos. Após 2 minutos do início da manipulação, a fotoativação foi realizada com aparelho fotoativador de LED (Radii call, SDI, 600mW/cm²) por 40 segundos, os discos foram retirados da matriz de aço e os excessos, removidos com lâmina de bisturi.

Os espécimes foram inseridos em poços de placas de cultura de poliestireno e o sistema placa/espécimes foi esterilizado por meio de exposição à luz ultravioleta na capela de fluxo laminar por 1h (33), previamente à indução do biofilme, sendo utilizado um isolado de *Streptococcus mutans* (cepa ATCC 25175 - American Type Culture Collection, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Um inóculo foi preparado a partir da amostra bacteriana, o grau de pureza da cepa foi avaliado, e colônias isoladas em placas de petri foram transferidas para um tubo contendo 5 ml do meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, Sparks, EUA) até atingir uma turvação referente à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) (MCFARLAND, 1907), o que foi verificado através de um espectrofotômetro (Biospectro SP-220 UV-VIS spectrophotometer, Equipar Ltda., Curitiba, Brasil), utilizando-se uma leitura de 625nm, com densidade ótica de 0,08 a 0,13.

Oriundos desta suspensão, 7,5µl foram adicionados em 1492,5µl de meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco, Sparks, USA) suplementado com 2,0% de

sacarose, já presentes em cada poço da placa estéril, resultando em um inóculo com concentração final de 5×10^5 UFC/ml.

3.2.2 Quantificação da atividade metabólica do biofilme de *S. mutans*

Finalizado o processo de indução do biofilme de *S. mutans* (48h de incubação à 37°C sob baixa tensão de oxigênio), a atividade mitocondrial das células bacterianas foi analisada por ensaio de redução do metilbrometo de tiazolil azul de tetrazolio (MTT, Sigma Aldrich, St Louis, US) para quantificar as células viáveis aderidas à superfície dos espécimes confeccionados.

Concluído o período de incubação, os eppendorfes contendo solução salina e os espécimes com biofilme foram agitados durante 30s no Vórtex e, então, passados para uma placa de 96 poços, com auxílio de uma pipeta. Após esta etapa, foi adicionado 1 mg/ml do corante MTT em cada poço e a placa foi incubada a 37°C, com baixo teor de O₂ durante 1h, fazendo com que o sal tetrazolio sofresse uma possível reação baseada na conversão celular, por enzimas de desidroxigenase presentes em células metabolicamente ativas em azul de formazam (Sigma Aldrich, St Louis, US).

Ao fim deste intervalo, os espécimes foram transferidos para uma nova placa de 96 poços e 1ml de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St Louis, US) foi adicionado para solubilizar os cristais que formaram. A placa foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro. Por fim, o conteúdo de cada um dos poços foi transferido para uma nova placa de 96 poços e a densidade ótica (DO) foi medida através de um leitor de microplacas a uma absorbância de 540nm. A viabilidade bacteriana comparada ao grupo controle foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade bacteriana} = (\text{DO dos grupos testes}) \times 100\% / (\text{DO dos grupos controles})$$

Uma maior absorção está relacionada a uma maior concentração, o que indica uma maior atividade metabólica do biofilme sobre o espécime.

3.3 Grau de conversão (GC%)

O grau de conversão monomérica ($n=5$) foi avaliado através de espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FT-IR), utilizando a técnica de refletância total atenuada – ATR - (Alpha-P / Platinum ATR Module, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Alemanha). Cada pasta dos CRs experimentais foi colocada separadamente sobre o cristal de ATR, seus espectros foram registrados entre 1500 e 1800 cm^{-1} , por meio de 40 varreduras com resolução de 4cm^{-1} , e uma média das integrais das bandas registradas em 1639 cm^{-1} e em 1609 cm^{-1} para as pastas A e B dos cimentos não polimerizados foi obtida. A seguir, os cimentos foram manipulados como descrito anteriormente, sendo uma porção depositada sobre o cristal de ATR, e os espectros novamente obtidos. O GC% foi calculado pela razão entre as integrais das bandas em 1639 cm^{-1} e em 1609 cm^{-1} , de acordo com a seguinte equação:

$$\text{GC}\% = 100 \times [1 - (\text{R}_{\text{cimento polimerizado}} / \text{R}_{\text{cimento não polimerizado}})],$$

onde $R = \text{integral da banda em } 1639 \text{ cm}^{-1} / \text{integral da banda em } 1609 \text{ cm}^{-1}$

3.4 Sorção (A), Solubilidade (B)

Cinco discos para cada CR experimental foram confeccionados como descrito anteriormente, para o teste de sorção e a solubilidade, que foi conduzido com base na norma ISO 4049:2000 (E). Primeiramente, os discos foram colocados em um dessecador com sílica gel azul, mantidos em estufa a 37°C e pesados com precisão de 0,01 mg, em intervalos de 24 h, até a obtenção de uma massa constante (m_1). Após a secagem, o diâmetro e a espessura dos espécimes foram mensurados com um paquímetro digital (MPI/E-101), e o volume (V) calculado em mm^3 . A seguir, os espécimes foram individualmente imersos em 10 ml de água destilada a 37°C por 7 dias e pesados com precisão de 0,01 mg (m_2). Finalmente, os espécimes foram submetidos ao mesmo processo de secagem descrito para m_1 , até a obtenção de nova massa constante (m_3). A absorção e a solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) foram obtidas através das seguintes equações:

$$A = (m_2 - m_3)/V$$

$$B = (m_1 - m_3)/V$$

3.5 Análise de microdureza (Knoop)

3.5.1 Confeção dos espécimes

O esmalte da superfície vestibular de dentes bovinos foi removido com lixas de carbetto de silício de granulação 120. Uma lixa de carbetto de silício de granulação 600 foi utilizada por 30 segundos, para padronização da camada de esfregaço. Um corte paralelo a superfície vestibular planificada foi realizada usando um disco diamantado em baixa velocidade sob irrigação (Isomet 1000 precision saw, Buëhler, Lake Bluff, IL, USA), obtendo fatias de dentina de aproximadamente 3 mm de espessura. A seguir, a face vestibular das fatias foi condicionada com ácido fosfórico por 30 segundos, lavadas com spray de água por 1 minuto e secada com 2 papéis absorventes. O sistema adesivo Ambar (FGM) foi aplicado com uma microescova ativamente por 20 segundos, um jato de ar foi aplicado para evaporação dos solventes. Em seguida, uma segunda camada de adesivo foi aplicada, seguindo os mesmos passos da primeira, e a fotoativação realizada (Ratii call, SDI, 600mW/cm²) por 20 segundos. O cimento foi manipulado como descrito anteriormente, aplicado na face vestibular de uma fatia de dentina, e a face vestibular de outra fatia de dentina foi posicionada sobre a camada de cimento. Tiras de aço foram posicionadas nas extremidades das fatias dos dentes bovinos, para funcionarem como espaçadores, a fim de que fossem obtidas linhas de cimentação de 150 µm. Uma carga de 500g foi aplicada por 20 segundos sobre o conjunto dentina-cimento-dentina, e os excessos de cimento foram removidos com um pincel Sable Touch (Tigre). A seguir, a fotoativação foi realizada (Ratii call, SDI, 600mW/cm²) por 40 segundos, nas quatro extremidades do conjunto. Cortes transversais e perpendiculares à linha de cimentação foram realizados a cada 3mm com auxílio de um disco diamantado em baixa velocidade (Isomet 1000 precision saw, Buëhler, Lake Bluff, IL, USA), obtendo-se fragmentos retangulares com secção transversal de 6 X 3mm².

Uma das faces contendo o conjunto dentina-cimento-dentina foi polida com lixa de carbetto de silício de granulação #1200 por 30 segundos e disco de feltro associado

a uma pasta diamantada (0,3µm), por mais 30 segundos em uma politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil). Metade desta face teve sua superfície coberta com duas camadas de esmalte cosmético para unhas, com a finalidade de proteção ao desafio cariogênico, servindo como controle para o ensaio de microdureza.

3.5.2 Desafio cariogênico

Primeiramente, os espécimes foram fixados em placas de 24 poços (24 Zellkultur Festplatte F, TPP, Suíça) com a face polida voltada para cima, e esterilizados com óxido de etileno por 1 hora. A seguir, foi realizada a indução do biofilme de *S. mutans*, como descrito anteriormente. Em seguida, 10 µl do inóculo foram adicionados em cada poço contendo o espécime e 2 ml de caldo BHI suplementado com 2% de sacarose. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C em uma condição de baixa tensão de oxigênio por 48 horas, sendo o meio de cultura substituído a cada 24 horas.

3.5.3 Análise de microdureza (Knoop) após desafio cariogênico

Após o desafio cariogênico, o esmalte cosmético foi removido de cada espécime (n=5), sendo este lado devidamente identificado. Tanto o lado protegido (SMH) como o lado submetido ao desafio cariogênico (SMH1) foram submetidos ao ensaio de microdureza Knoop (Micromet 5104, Full MHT software, Bühler, Lake Bluff, IL, USA). Três indentações (25 g, 10 s) foram realizadas em três distâncias, localizadas a 50, 150 e 250 µm da linha de cimentação.

A porcentagem da perda de dureza foi calculada através da equação:
$$\% = 100(\text{SMH} - \text{SMH1})/\text{SMH}.$$

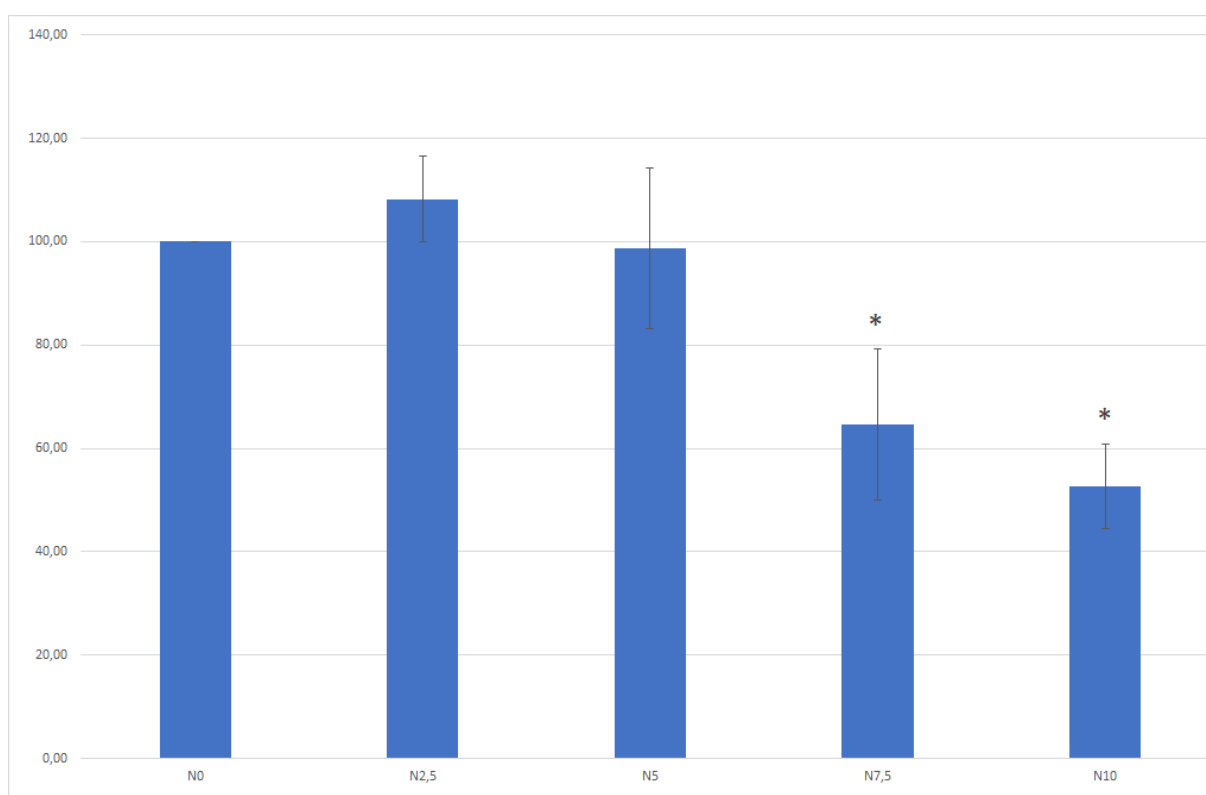
3.6 Tratamento estatístico

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade, e ao de Levene, para avaliar a homocedasticidade das variâncias. Posteriormente, foi realizada a análise de variância multifatorial para todos os ensaios, e o teste de Tukey para contraste das médias, em um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0.05$).

4. RESULTADOS

Os resultados da atividade metabólica de *S.mutans* estão apresentados no gráfico 1. Somente o fator nisina foi significativo estatisticamente ($p<0.05$). As concentrações de nisina a 7,5 e 10%, foram capazes de reduzir significativamente a atividade metabólica do *S. mutans*.

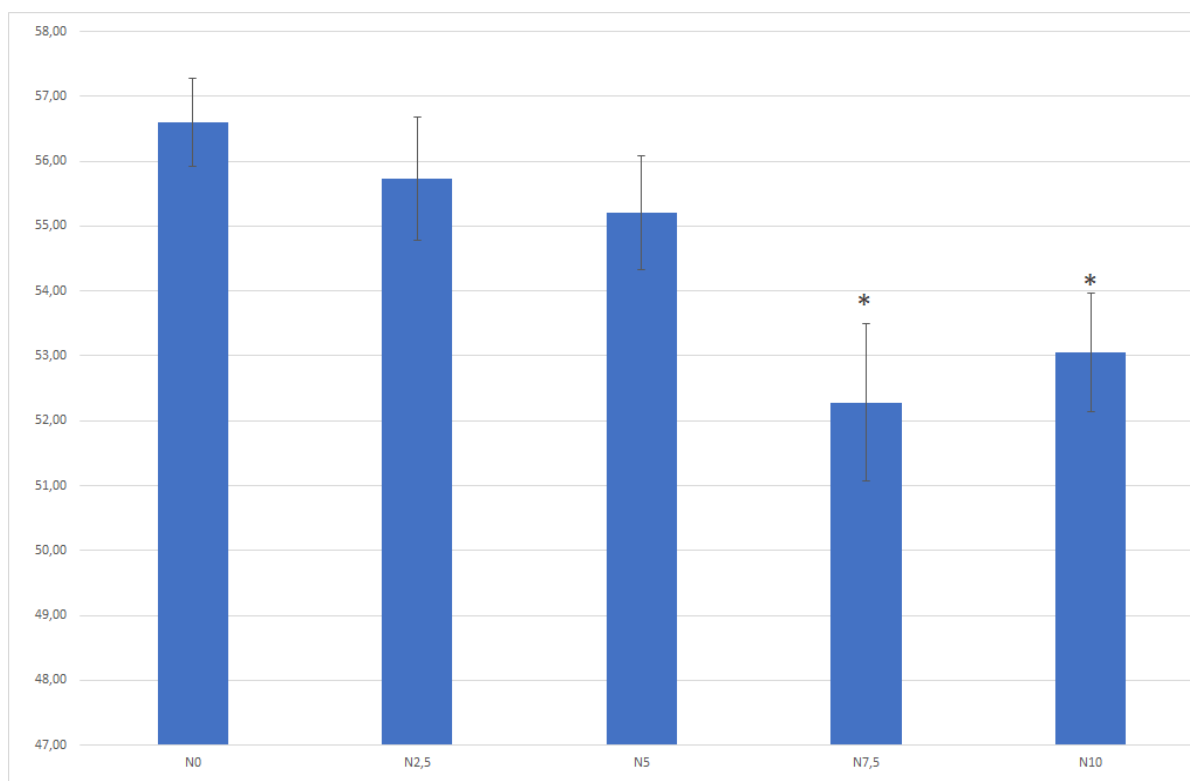
Gráfico 1 – Resultados da atividade metabólica do *S.mutans*.



* indica que houve diferença estatística significante

Os resultados do GC%, apresentados no gráfico 2, apresentaram diferença estatística significativa somente para o fator nisina ($p<0,05$). Os grupos com 7,5 e 10% de nisina apresentaram valores menores de grau conversão do que o grupo controle ($p<0,05$). Os dados de sorção e solubilidade, apresentados na tabela 2, não apresentaram diferença estatística significativa ($p>0.05$), nem para os fatores individuais, nem para a interação.

Gráfico 2 – Resultados do Grau de Conversão (GC%)



* indica que houve diferença estatística significante

Tabela 2 – Média e desvio padrão da solubilidade e sorção para os grupos experimentais

Grupos	Solubilidade	Sorção
I5N0	1,02 ± 0,28 ^a	22,01 ± 0,91 ^a
I5N2,5	0,72 ± 0,46 ^a	21,59 ± 1,60 ^a
I5N5	0,72 ± 0,65 ^a	21,27 ± 1,80 ^a
I5N7,5	0,58 ± 0,61 ^a	20,59 ± 2,14 ^a
I5N10	0,37 ± 0,53 ^a	19,26 ± 2,27 ^a
I6N0	0,88 ± 0,29 ^a	22,47 ± 0,75 ^a
I6N2,5	0,30 ± 0,48 ^a	21,91 ± 2,40 ^a

I6N5	0,53 ± 0,56 ^a	19,28 ± 1,68 ^a
I6N7,5	0,30 ± 0,75 ^a	20,07 ± 2,89 ^a
I6N10	0,25 ± 0,55 ^a	20,99 ± 1,31 ^a

Letras iguais indicam que não houve diferença estatística significativa

A porcentagem de redução dos valores microdureza após o desafio cariogênico apresentou diferença estatisticamente significativa para a interação tripla ($p < 0,05$) (tabela 3). Pode ser observado que os grupos com concentração de 7,5 e 10% de nisina, nas distâncias de 50 e 100 μ m e independente da concentração de partículas de carga, apresentaram uma menor redução da microdureza da dentina quando comparados aos grupos com 0, 2,5 e 5% ($p < 0,05$), que foram iguais entre si. À distância de 250 μ m, não houve diferença entre qualquer grupo testado. Também, para os grupos com concentração de 7,5% e 10% de nisina, independente da concentração das partículas de carga, a porcentagem de redução da microdureza foi menor para a distância de 50 μ m, aumentando sucessivamente para as distâncias de 150 e 250 μ m ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem de redução da microdureza Knoop após o desafio cariogênico, para os grupos experimentais nas diferentes distâncias avaliadas.

Grupos	50 μ m	150 μ m	250 μ m
I5N0	72,53 ± 0,73 ^{A,a}	71,87 ± 0,85 ^{A,a}	72,51 ± 0,44 ^{A,a}
I5N2,5	72,08 ± 0,77 ^{A,a}	72,03 ± 0,39 ^{B,a}	73,16 ± 0,42 ^{A,a}
I5N5	73,41 ± 1,08 ^{A,a}	72,72 ± 0,32 ^{A,a}	73,07 ± 0,68 ^{A,a}
I5N7,5	47,31 ± 0,88 ^{C,b}	66,43 ± 0,76 ^{B,b}	72,95 ± 0,60 ^{A,a}
I5N10	38,91 ± 0,62 ^{C,c}	64,03 ± 0,78 ^{B,c}	72,88 ± 0,48 ^{A,a}
I6N0	73,60 ± 0,30 ^{A,a}	72,94 ± 0,59 ^{A,a}	73,08 ± 0,54 ^{A,a}

I6N2,5	$73,11 \pm 0,71$ A,a	$72,73 \pm 0,25$ A,a	$73,18 \pm 0,60$ A,a
I6N5	$72,92 \pm 0,10$ A,a	$72,07 \pm 0,29$ A,a	$73,37 \pm 0,78$ A,a
I6N7,5	$46,33 \pm 0,58$ C,b	$67,72 \pm 0,89$ B,b	$73,03 \pm 0,61$ A,a
I6N10	$37,99 \pm 0,62$ C,c	$63,10 \pm 0,77$ B,c	$73,39 \pm 0,43$ A,a

Letras diferentes (maiúsculas na mesma linha e minúsculas na mesma coluna) indicam diferença estatística significativa

5. DISCUSSÃO

A presença de agentes antimicrobianos em materiais odontológicos, mais especificamente contra bactérias cariogênicas, como o *S. mutans*, pode ser um excelente recurso a ser empregado para o controle da doença cárie, no sentido de evitar o aparecimento de cáries recorrentes nas margens das restaurações, uma das causas de insucesso apontada em restaurações indiretas (13, 14). O principal objetivo do presente estudo foi investigar se a adição da nisina em CRs duais poderia inibir o *S. mutans*, bem como causar um efeito protetor na dentina. De acordo com os resultados encontrados, a incorporação de nisina nos CRs nas concentrações de 7,5 e 10% foi capaz de reduzir significativamente a atividade metabólica de *S. mutans*, não sendo encontrada ação inibitória nas concentrações de 2,5 e 5%, de modo que a primeira hipótese do estudo deve ser parcialmente aceita. Em contraste, estudos anteriores (32, 34) verificaram que, mesmo quando incorporada a concentrações menores do que 5% no adesivo universal Single Bond, houve uma inibição significativa do *S. mutans*. Um deles (32) não encontrou uma zona de inibição evidente no teste de difusão em ágar para os adesivos contendo nisina, apesar de ter verificado uma significativa influência no crescimento, na aderência e na integridade da membrana do *S. mutans* nos demais testes, sugerindo que sua ação poderia ser por contato direto e, sendo assim, durável e efetiva. Desse modo, deve ser observado que o adesivo Single Bond possui uma concentração de partículas de carga bem menor (10% de nanopartículas) do que os CRs experimentais do presente estudo, aumentando a área de matriz orgânica, onde encontra-se dispersa a nisina, em contato direto com o biofilme bacteriano, o que poderia ser sugestivo de uma melhor ação antimicrobiana da nisina, mesmo quando a uma concentração menor. Convém ressaltar que, embora alguns componentes antimicrobianos possam copolimerizar com os monômeros resinosos, como no caso dos compostos de amônio quaternário (22, 24), o presente estudo não permite que esta afirmação seja realizada para a nisina.

Por outro lado, uma explicação da eficácia da nisina nestas mais elevadas concentrações (7,5 e 10%) poderia estar pautada na redução dos valores de GC% encontradas no presente estudo, embora não tenha sido verificada nenhuma influência nos dados de sorção e solubilidade destes materiais experimentais. Tais

achados fizeram com que a segunda hipótese do estudo fosse parcialmente aceita. De fato, em prévio estudo (35), uma maior liberação de íons Ca e PO₄ em compósitos contendo maior concentração de partículas de hidroxiapatita remineralizantes foi encontrada, sendo atribuído ao menor grau de conversão alcançado, que levaria a maior lixiviação de componentes do material (36), aumentando sua capacidade remineralizante do esmalte dentário. Desse modo, como o grau de conversão, determinado em parte pela qualidade da cadeia polimérica formada, é capaz de determinar as propriedades físicas dos materiais (37), nos CRs com maior concentração de nisina, o menor grau de conversão alcançado poderia ter facilitado a atuação da nisina sobre o *S. mutans*, levando à diminuição da sua atividade metabólica. Apesar destes achados, é conveniente ressaltar que os valores de GC% e de sorção e solubilidade encontrados no presente estudo, estão de acordo com dados obtidos em prévios estudos envolvendo cimentos resinosos comerciais (38, 39) e, também que, quando a nisina foi inserida no presente estudo em concentrações menores do que 5%, o GC% não foi afetado, no que concordam outros autores quando utilizaram concentrações menores do que 6% em compósitos duais e autoadesivos (40) ou em adesivos dentários (32, 34).

Como os estudos têm apontado uma ação efetiva da nisina contra *S. mutans* quando incorporada em adesivos dentários, seria importante também investigar se esta inibição traria um efeito protetor para a estrutura dentária, de modo a evitar a formação de cáries secundárias. Apesar do estabelecimento da relação entre perda mineral e dureza de superfície ser complexo e necessitar de investigações mais aprofundadas (41), a utilização desta propriedade tem sido constante em diversos trabalhos (42-46) como indicador da inibição da atividade de bactérias cariogênicas, como o *S. mutans*. Desse modo, para a análise da dureza após desafio cariogênico a metodologia aplicada foi baseada na descrita por Maia *et al.* (42), sendo os espécimes confeccionados com uma linha de cimentação próxima a 150µm, simulando uma restauração com uma desadaptação levemente maior que a clinicamente aceitável, considerada em 120µm (47). De acordo com os dados do presente estudo, somente os grupos com 7,5 e 10% de nisina, nas distâncias de 50 ou 150 µm da linha de cimentação, apresentaram menor redução da dureza Knoop da dentina, após desafio cariogênico com *S. mutans*. Tal achado corrobora a menor atividade metabólica encontrada para o *S. mutans* nestas mais altas concentrações, que levaria a menor produção de ácidos causadores da desmineralização da dentina durante o processo

da doença cárie (9), permitindo uma maior proteção da dentina nas margens da restauração. Entretanto, conforme a distância da linha de cimentação aumentou, o efeito protetor da nisina diminuiu, assemelhando-se ao grupo controle na distância de 250 μm , de modo a demonstrar um efeito protetor somente próximo à linha de cimentação. Essa diminuição na ação antimicrobiana a maiores distâncias também foi observada por Borges *et al.* (48), quando testados materiais contendo fluoretos. Pode ser especulado que essa diminuição do efeito protetor da nisina estaria relacionada a uma limitação do raio de ação da nisina, uma vez que poderia exercer seu efeito antibacteriano por contato, diferentemente de outros agentes antimicrobianos que tem sua ação pautada na liberação para o meio (21). Desse modo, a terceira hipótese do presente estudo deve ser parcialmente aceita, uma vez que somente nas concentrações maiores e próximo à linha de cimentação, a nisina foi capaz de conferir aos CRs um efeito protetor da dentina ao redor da linha de cimentação.

No presente estudo, as diferentes concentrações de partículas inorgânicas testadas foram baseadas nos dados fornecidos pelos fabricantes dos CRs comerciais, com o objetivo de verificar se haveria alguma influência na ação antimicrobiana. Como já abordado anteriormente, a maior concentração de partículas de carga poderia implicar numa menor área de matriz orgânica exposta e, como a nisina estaria dispersa na matriz orgânica, sua ação, caso fosse por contato direto, poderia ser influenciada. No entanto, para as diferentes concentrações de partículas inorgânicas estudadas (50 e 60%), não foi observada diferença com relação à ação da nisina na atividade metabólica do *S. mutans*. Também não foi encontrada influência do conteúdo inorgânico no GC%, o que está de acordo com Bardon *et al.* (38).

De acordo com as limitações do presente estudo, verifica-se que a incorporação de nisina em concentrações de 7,5 e 10% em CRs foi capaz de inibir a atividade metabólica do *S. mutans*, causando um efeito protetor da dentina próximo a linha de cimentação, embora tenha levado a redução do grau de conversão, não afetando a sorção e solubilidade. Tendo em vista que o presente estudo avaliou o efeito imediato da nisina, estudos adicionais devem ser realizados a fim de verificar a sua efetividade a longo prazo, bem como se é liberada para o meio.

6. CONCLUSÃO

Pode ser concluído que a adição de nisina nos cimentos resinosos nas concentrações 7,5 e 10% foi efetiva em reduzir a atividade do *S.mutans* e promover um efeito protetor da dentina nas distâncias de 50 e 150 μm da linha de cimentação, sendo observada uma redução do grau de conversão monomérica, embora não tenham sido afetadas a sorção e solubilidade dos materiais.

7. REFERÊNCIAS

1. Blatz MB, Vonderheide M, Conejo J. The Effect of Resin Bonding on Long-Term Success of High-Strength Ceramics. *J Dent Res*. 2017;22034517729134.
2. Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Bragger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(6):667-76.
3. Fotiadou C, Manhart J, Diegritz C, Folwaczny M, Hickel R, Frasher I. Longevity of lithium disilicate indirect restorations in posterior teeth prepared by undergraduate students: A retrospective study up to 8.5 years. *J Dent*. 2021;105:103569.
4. Vagropoulou GI, Klifopoulou GL, Vlahou SG, Hirayama H, Michalakis K. Complications and survival rates of inlays and onlays vs complete coverage restorations: A systematic review and analysis of studies. *J Oral Rehabil*. 2018;45(11):903-20.
5. Pashley DH, Agee KA, Carvalho RM, Lee KW, Tay FR, Callison TE. Effects of water and water-free polar solvents on the tensile properties of demineralized dentin. *Dent Mater*. 2003;19(5):347-52.
6. Giti R, Vojdani M, Abduo J, Bagheri R. The Comparison of Sorption and Solubility Behavior of Four Different Resin Luting Cements in Different Storage Media. *J Dent (Shiraz)*. 2016;17(2):91-7.
7. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, et al. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res*. 2012;91(5):467-72.
8. Van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. In vitro acidogenic potential and mutans streptococci of human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. *J Dent Res*. 1991;70(12):1497-502.
9. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.
10. Carrilho Baltazar Vaz IM, Pimentel Coelho Lino Carracho JF. Marginal fit of zirconia copings fabricated after conventional impression making and digital scanning: An in vitro study. *J Prosthet Dent*. 2020;124(2):223 e1- e6.

11. Pilo R, Folkman M, Arieli A, Levartovsky S. Marginal Fit and Retention Strength of Zirconia Crowns Cemented by Self-adhesive Resin Cements. *Oper Dent.* 2018;43(2):151-61.
12. Goujat A, Abouelleil H, Colon P, Jeannin C, Pradelle N, Seux D, et al. Mechanical properties and internal fit of 4 CAD-CAM block materials. *J Prosthet Dent.* 2018;119(3):384-9.
13. Maske TT, Kuper NK, Cenci MS, Huysmans M. Minimal Gap Size and Dentin Wall Lesion Development Next to Resin Composite in a Microcosm Biofilm Model. *Caries Res.* 2017;51(5):475-81.
14. Askar H, Krois J, Gostemeyer G, Bottenberg P, Zero D, Banerjee A, et al. Secondary caries: what is it, and how it can be controlled, detected, and managed? *Clin Oral Investig.* 2020;24(5):1869-76.
15. Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries Res.* 2009;43(2):97-102.
16. Totiam P, Gonzalez-Cabezas C, Fontana MR, Zero DT. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. *Caries Res.* 2007;41(6):467-73.
17. Diercke K, Lussi A, Kersten T, Seemann R. Isolated development of inner (wall) caries like lesions in a bacterial-based in vitro model. *Clin Oral Investig.* 2009;13(4):439-44.
18. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, et al. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dent Mater.* 2012;28(5):573-83.
19. Cheng YJ, Zeiger DN, Howarter JA, Zhang X, Lin NJ, Antonucci JM, et al. In situ formation of silver nanoparticles in photocrosslinking polymers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;97(1):124-31.
20. Tavassoli Hojati S, Alaghemand H, Hamze F, Ahmadian Babaki F, Rajab-Nia R, Rezvani MB, et al. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. *Dent Mater.* 2013;29(5):495-505.
21. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater.* 2003;19(6):449-57.

22. Antonucci JM, Zeiger DN, Tang K, Lin-Gibson S, Fowler BO, Lin NJ. Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications. *Dent Mater.* 2012;28(2):219-28.
23. Moreira DM, Oei J, Rawls HR, Wagner J, Chu L, Li Y, et al. A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod.* 2015;85(2):175-83.
24. Melo MA, Wu J, Weir MD, Xu HH. Novel antibacterial orthodontic cement containing quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. *J Dent.* 2014;42(9):1193-201.
25. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine-incorporated polymethyl methacrylate-based resin cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;94(1):134-40.
26. Yoo H, Kim SY, Shin SJ, Park JW. The physical properties and anticariogenic effect of experimental resin cement containing ursolic acid. *Odontology.* 2021;109(3):641-8.
27. Maas MS, Alania Y, Natale LC, Rodrigues MC, Watts DC, Braga RR. Trends in restorative composites research: what is in the future? *Braz Oral Res.* 2017;31(suppl 1):e55.
28. Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol.* 2016;120(6):1449-65.
29. Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, et al. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Front Microbiol.* 2015;6:617.
30. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Antibiofilm peptides against oral biofilms. *J Oral Microbiol.* 2017;9(1):1327308.
31. Tong Z, Ni L, Ling J. Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides.* 2014;60:32-40.
32. Su M, Yao S, Gu L, Huang Z, Mai S. Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. *Peptides.* 2018;99:189-94.
33. Katara G, Hemvani N, Chitnis S, Chitnis V, Chitnis DS. Surface disinfection by exposure to germicidal UV light. *Indian J Med Microbiol.* 2008;26(3):241-2.

34. Zhao M, Qu Y, Liu J, Mai S, Gu L. A universal adhesive incorporating antimicrobial peptide nisin: effects on *Streptococcus mutans* and saliva-derived multispecies biofilms. *Odontology*. 2020;108(3):376-85.
35. Jardim RN, Rocha AA, Rossi AM, de Almeida Neves A, Portela MB, Lopes RT, et al. Fabrication and characterization of remineralizing dental composites containing hydroxyapatite nanoparticles. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020;109:103817.
36. da Silva EM, Poskus LT, Guimaraes JG, de Araujo Lima Barcellos A, Fellows CE. Influence of light polymerization modes on degree of conversion and crosslink density of dental composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(3):1027-32.
37. Silva EM, Miragaya L, Noronha-Filho JD, Amaral CM, Poskus LT, Guimaraes JG. Characterization of an experimental resin composite organic matrix based on a tri-functional methacrylate monomer. *Dent Mater J*. 2016;35(2):159-65.
38. Barbon FJ, Moraes RR, Isolan CP, Spazzin AO, Boscato N. Influence of inorganic filler content of resin luting agents and use of adhesive on the performance of bonded ceramic. *J Prosthet Dent*. 2019;122(6):566 e1- e11.
39. De Souza G, Braga RR, Cesar PF, Lopes GC. Correlation between clinical performance and degree of conversion of resin cements: a literature review. *J Appl Oral Sci*. 2015;23(4):358-68.
40. Panpisut P, Suppapatpong T, Rattanapan A, Wongwarawut P. Monomer conversion, biaxial flexural strength, apatite forming ability of experimental dual-cured and self-adhesive dental composites containing calcium phosphate and nisin. *Dent Mater J*. 2021;40(2):399-406.
41. Bresciani E, Wagner WC, Navarro MF, Dickens SH, Peters MC. In vivo dentin microhardness beneath a calcium-phosphate cement. *J Dent Res*. 2010;89(8):836-41.
42. Maia AC, Mangabeira A, Vieira R, Neves AA, Lopes RT, Pires TM, et al. Experimental composites containing quaternary ammonium methacrylates reduce demineralization at enamel-restoration margins after cariogenic challenge. *Dent Mater*. 2019;35(8):e175-e83.
43. Bhadila G, Filemban H, Wang X, Melo MAS, Arola DD, Tay FR, et al. Bioactive low-shrinkage-stress nanocomposite suppresses *S. mutans* biofilm and preserves tooth dentin hardness. *Acta Biomater*. 2020;114:146-57.

44. Zhou W, Zhou X, Huang X, Zhu C, Weir MD, Melo MAS, et al. Antibacterial and remineralizing nanocomposite inhibit root caries biofilms and protect root dentin hardness at the margins. *J Dent.* 2020;97:103344.
45. Zhou W, Peng X, Zhou X, Weir MD, Melo MAS, Tay FR, et al. In vitro evaluation of composite containing DMAHDM and calcium phosphate nanoparticles on recurrent caries inhibition at bovine enamel-restoration margins. *Dent Mater.* 2020;36(10):1343-55.
46. Bhadila G, Wang X, Zhou W, Menon D, Melo MAS, Montaner S, et al. Novel low-shrinkage-stress nanocomposite with remineralization and antibacterial abilities to protect marginal enamel under biofilm. *J Dent.* 2020;99:103406.
47. McLean JW, von Fraunhofer JA. The estimation of cement film thickness by an in vivo technique. *Br Dent J.* 1971;131(3):107-11.
48. Borges FT, Campos WR, Munari LS, Moreira AN, Paiva SM, Magalhaes CS. Cariostatic effect of fluoride-containing restorative materials associated with fluoride gels on root dentin. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(5):453-60.