

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DENTÍSTICA RESTAURADORA**

YASMINE MENDES PUPO

**POLÍMERO ANTIMICROBIANO [QAMP] PARA INCORPORAÇÃO EM
SISTEMA ADESIVO ODONTOLÓGICO: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA
PERMEABILIDADE VASCULAR E PROPRIEDADES MECÂNICAS**

**PONTA GROSSA
2013**

YASMINE MENDES PUPO

**POLÍMERO ANTIMICROBIANO [QAMP] PARA INCORPORAÇÃO EM
SISTEMA ADESIVO ODONTOLÓGICO: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA
PERMEABILIDADE VASCULAR E PROPRIEDADES MECÂNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de concentração em Dentística Restauradora, Linha de Pesquisa: Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Gomes
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Pupo, Yasmine Mendes

P979 Polímero antimicrobiano [QAMP] para
incorporação em sistema adesivo
odontológico: desenvolvimento,
caracterização físico-química, avaliação
da permeabilidade vascular e propriedades
mecânicas/ Yasmine Mendes Pupo. Ponta
Grossa, 2013.
175f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área
de Concentração: Dentística Restauradora),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos
Gomes.

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

1.Atividade antibacteriana.
2.Espectroscopia. 3.Materiais
restauradores. 4.Propriedades mecânicas.
5.Quaternização. I.Gomes, João Carlos.
II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em
Odontologia. IV. T.

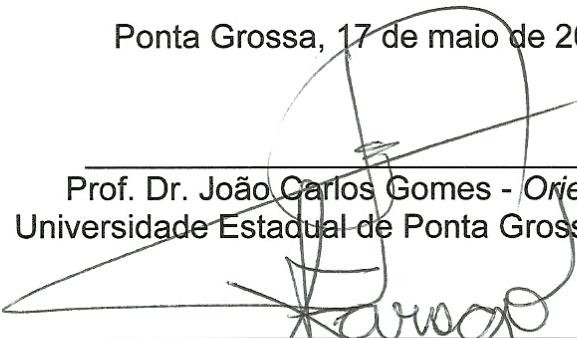
CDD: 617.695

YASMINE MENDES PUPO

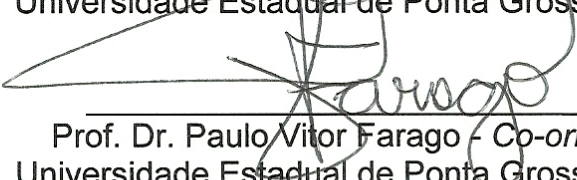
**POLÍMERO ANTIMICROBIANO [QAMP] PARA INCORPORAÇÃO EM
SISTEMA ADESIVO ODONTOLÓGICO: DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA
PERMEABILIDADE VASCULAR E PROPRIEDADES MECÂNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de concentração em Dentística Restauradora, Linha de Pesquisa: Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

Ponta Grossa, 17 de maio de 2013



Prof. Dr. João Carlos Gomes - *Orientador*
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



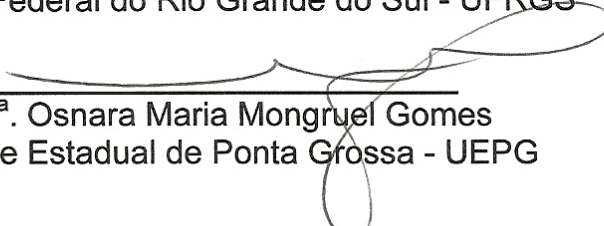
Prof. Dr. Paulo Vitor Farago - *Co-orientador*
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



Prof.ª Dr.ª Mirela Sanae Shinohara
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP



Prof.ª Dr.ª Thaís Tomé Feldens
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS



Prof.ª Dr.ª Osnara Maria Mongruel Gomes
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Dedico este trabalho...

A Deus, por iluminar minha existência, dando coragem para superar momentos difíceis e me protegendo para que eu possa continuar alcançando meus objetivos.

*Aos meus pais, **João Amílton** e **Marjorie**, pela vida e por me ensinarem a viver com dignidade, iluminando meus caminhos, com amor e dedicação. Agradeço pelo incentivo em minha educação e por muitas vezes abdicarem de seus próprios sonhos e aspirações em favor dos meus. Aos que eu amo muito, meu sincero agradecimento!*

*Ao meu esposo e grande amor, **Fabrizio**, que sempre me recebe com sorrisos e palavras de carinho e incentivo. Com seu amor, conseguimos "juntos" conquistar mais este objetivo. Agradeço por compreender e dividir seu espaço entre meus livros, artigos e computador. Muito obrigada meu amor! Eu te amo e sempre vou te amar!*

*À minha querida irmã **Jessica**, minha amiga e companheira, muito obrigada por toda a sua ajuda no desenvolvimento ideológico e experimental desta tese. E ao meu irmão, **Eríck**, por sempre estar torcendo por mim. Quero estar sempre ao lado de vocês, seus esposos e filhos, trocando ideias e ajudando no que precisarem. Obrigada por existirem em minha vida!*

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Gomes, pelos conhecimentos compartilhados e palavras de superação diante das minhas dificuldades. Muito obrigada por todos estes anos em que confiou nos meus passos, norteou-me quando necessário, ouviu-me e, acima de tudo, colaborou no meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por doar seu tempo, suas madrugadas e sua sabedoria para o desenvolvimento desta tese, com paciência e objetividade. Acompanhou todas as etapas experimentais, explicando-me o porquê de cada, tornando o que para mim era extremamente complexo, algo simples e fantástico. Ensinou-me desde os cálculos até o aprimoramento da escrita, corrigindo palavra por palavra com muito esmero e dedicação. Agradeço por nunca hesitar em me ajudar e por me ensinar sobre como conduzir um aluno no desenvolvimento de uma pesquisa. Você abriu os meus olhos, sabe o quanto lhe admiro e o quanto sua opinião é importante para mim.

Ao meu amigo Dr. Milton Domingos Michél, por sempre me ajudar tanto, tratar-me tão bem, conversar comigo e até me fazer chorar de tanto rir! Aprendi com você o quanto podemos crescer pessoal e profissionalmente quando temos vontade. Muito obrigada por toda sua amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Esmerino, que com toda sua serenidade e relevância de observações, críticas e questionamentos, muito contribuiu para o meu aprendizado nas análises microbiológicas e aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio André dos Santos, pela atenção dispensada durante as etapas desta pesquisa, em especial aos ensinamentos das análises estatísticas.

À Prof^a. Dr^a. Osnara Maria Mongruel Gomes, pela amizade, orientações e dedicação ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPG.

Ao meu amigo Prof. Dr. Fabiano de Oliveira Araujo, que acreditou em meu potencial e me abriu as portas para a realização de um grande sonho: "Ser Professora Universitária". Agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pelas trocas de ideias e pelo constante incentivo em minha vida profissional.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Universidade Federal do Paraná, que gentilmente cedeu equipamentos necessários para a realização desta pesquisa.

À CAPES, pelo apoio financeiro concedendo a bolsa de estudos durante o transcorrer do curso.

Aos Professores do Curso de Doutorado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que dedicaram seu tempo, compartilharam experiências, com intuito de nos fazer grandes pesquisadores.

À Morgana, pela atenção, competência e amizade, sempre me recebendo com um carinho imenso e uma educação inigualável.

Aos meus queridos amigos e colegas de doutorado. Espero podermos contar uns com os outros, deixando que a saudade nos faça lembrar o que passamos, das dificuldades que superamos, mas principalmente da felicidade de saber que construímos amigos.

À Prof^a. Dr^a. Daniela Florencio Maluf, pelo auxílio na Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e apoio para o finalização desta tese.

À Ana Cristina Kovalik, pela amizade e auxílio nos experimentos com animais.

À Agência Inovação e Propriedade Intelectual (AGIPI), pelo apoio na redação da patente de invenção desta tese.

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

Agradeço também aos colegas e amigos da Universidade Tuiuti do Paraná, que neste momento me encheram de motivação para a conclusão deste trabalho.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste estudo.

*"Só existem dois dias no ano
que nada pode ser feito. Um
se chama ontem e o outro se
chama amanhã, portanto, hoje é o
dia certo para amar, acreditar,
fazer e principalmente viver."*

Dalai Lama

DADOS CURRICULARES

Yasmine Mendes Pupo

NASCIMENTO	23.12.1983	Ponta Grossa, Paraná – Brasil
FILIAÇÃO		Marjorie Bitencourt Emilio Mendes João Amilton Mendes
	2002 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Ponta Grossa – PR, Brasil
	2004 – 2004	Curso de Aperfeiçoamento em Oclusão. Centro Paranaense de Formação Técnica, CENTPAR. Curitiba – PR, Brasil.
	2006 – 2006	Curso de Aperfeiçoamento em Odontologia Estética Adesiva. Escola de Aperfeiçoamento Profissional. Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa – PR, Brasil.
	2007 - 2008	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia de Molares. Escola de Aperfeiçoamento Profissional. Associação Brasileira de Odontologia – Regional Ponta Grossa – PR, Brasil.
	2008 – 2010	Curso de Pós-graduação em Odontologia. Área de Concentração em Dentística Restauradora. Nível Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.
	2010 – 2013	Curso de Pós-graduação em Odontologia. Área de Concentração em Dentística Restauradora. Nível Doutorado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR, Brasil.

RESUMO

Pupo YM. **Polímero antimicrobiano [QAMP] para incorporação em sistema adesivo odontológico: desenvolvimento, caracterização físico-química, avaliação da permeabilidade vascular e propriedades mecânicas.** [Tese de Doutorado em Dentística Restauradora]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2013.

A utilização de materiais restauradores bioativos, com capacidade de reduzir o desenvolvimento do biofilme e de apresentar ação direta contra microrganismos cariogênicos, tem crescido dentro do mercado odontológico, sendo uma tendência na Odontologia Adesiva. O presente estudo teve como objetivo descrever a síntese, a caracterização e as propriedades antimicrobianas, de permeabilidade vascular e mecânicas de um polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP], quando incorporado em sistemas adesivos odontológicos, com o propósito de aumentar a durabilidade das restaurações dentais. QAMP foi obtido por modificação química (alquilação) de um polímero pré-formado [Eudragit® E100] com brometo de *n*-octila. O produto resultante [QAMP] foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia Raman, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, espectrofotometria na região do visível, difração de raios X e análise termogravimétrica (TGA). O teste de susceptibilidade *in vitro* da cepa de *Streptococcus mutans* frente ao QAMP foi realizado antes e após a incorporação no sistema adesivo Clearfil® SE Bond. Clearfil® Protect Bond, o qual contém um antimicrobiano padrão [MDPB] e Clearfil® SE Bond sem QAMP foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Realizou-se também a avaliação da porcentagem de liberação do composto quaternário de amônio a partir do sistema adesivo em estudo, após intervalos de tempo pré-determinados (1, 7, 14, 21 e 30 dias). Os dados espectroscópicos confirmaram que QAMP foi obtido com sucesso. A análise térmica indicou que QAMP foi estável ao calor. O efeito antimicrobiano contra *Streptococcus mutans*, antes e após a incorporação ao sistema adesivo odontológico, foi comprovado. A liberação de compostos quaternários de amônio do sistema adesivo em estudo foi muito reduzida, quando comparada ao do produto comercial [MDPB]. Além

disso, investigou-se o efeito de Clearfil® SE Bond contendo QAMP sobre a permeabilidade vascular usando os métodos de azul de Evans e fluxometria por laser-Doppler a fim de avaliar a influência sobre a fase exsudativa do processo inflamatório no tecido subcutâneo de ratos. Resultados confirmam que o sistema adesivo contendo QAMP teve um menor efeito sobre esta fase, o que é indicativo de uma adequada biocompatibilidade. Na tentativa de cercar a estabilidade do QAMP foram avaliadas a resistência de união dos sistemas adesivos em estudo em dentes humanos extraídos, por meio do ensaio de microtração imediatamente, após 6 e 12 meses de armazenamento dos espécimes em forma de palitos. O grau de conversão *in situ* por análise micro-Raman da interface adesiva estabelecida por esses sistemas e *in vitro* por espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier também foram avaliados. Dados obtidos confirmaram que o sistema adesivo autocondicionante com QAMP produz uma resistência de união eficaz sob condições *in vitro* e estabilidade do grau de conversão *in situ* e *in vitro*. Na avaliação das propriedades mecânicas, dureza e módulo de elasticidade, foram preparados dentes restaurados com os adesivos em estudo, sendo submetidos à indução de lesões artificiais de cárie por meio de ciclagem de pH e de cárie microbiológica. Posteriormente, os dentes foram cortados e as fatias submetidas ao teste de nanoindentação na região da interface de união resina-dentina, conduzindo a verificação da qualidade do substrato formado. Em geral, Clearfil® SE Bond contendo QAMP proporcionou melhores propriedades mecânicas da interface resina-dentina do que outros adesivos autocondicionantes comerciais após desafios cariogênicos. Esses dados contemplam o desenvolvimento de polímeros quaternários de amônio para fornecer benefícios adicionais para os sistemas adesivos dentais amplamente utilizados em Odontologia.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Espectroscopia; Materiais restauradores; Propriedades mecânicas; Quaternização.

ABSTRACT

Pupo YM. **Antimicrobial polymer [QAMP] for incorporation into dental adhesive system: development, physicochemical characterization, evaluation of vascular permeability and mechanical properties.** [Tese de Doutorado em Dentística Restauradora]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2013.

The use of bioactive restorative materials, with the ability to reduce biofilm development and to present direct action against cariogenic microorganisms, has grown in the dental market and a trend in Adhesive Dentistry. This study aims to describe the synthesis, the characterization, the antimicrobial properties, the vascular permeability and the mechanical properties of the quaternary ammonium methacrylate polymer [QAMP], for incorporation into dental adhesive systems, in order to provide increase the durability of dental restorations. QAMP was obtained through chemical modification (alkylation) of a preformed polymer [Eudragit™ E100] and *n*-octyl bromide. The resulting product [QAMP] was characterized by infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, Visible spectrophotometry, X-ray diffraction and thermogravimetric analysis (TGA). The *in vitro* susceptibility testing against *Streptococcus mutans* of QAMP was performed prior and after incorporation into a commercial adhesive system (Clearfil™ SE Bond). Clearfil™ Protect Bond containing antimicrobial standard [MDPB] and Clearfil™ SE Bond without QAMP were used as positive and negative controls, respectively. To evaluate percentage of quaternary ammonium compound released from the experimental adhesive system a test was conducted, after intervals of predetermined time (1, 7, 14, 21 and 30 days). Spectroscopic data confirmed that QAMP was successfully acquired. Thermal analysis indicated that QAMP was heat-stable. The antimicrobial effect against the *Streptococcus mutans*, prior and after incorporation in a dental adhesive system, was proven. The release of the quaternary ammonium compound [QAMP], embedded in an adhesive system, was reduced when compared to the commercial product [MDPB]. Additionally, the effect of Clearfil™ SE Bond containing QAMP on the vascular permeability using Evans blue and laser-

Doppler flowmetric methods was investigated in order to define the influence on the exudative phase of the inflammatory process in the subcutaneous tissue of rats. Results support that the adhesive system containing QAMP had lower effect on this phase indicating an adequate biocompatibility. In an attempt to determine the stability of QAMP, the bond strength of adhesive systems was evaluated in extracted human teeth through microtensile test immediately, after 6 and 12 months of storage of the stick-shaped specimens. The degree of conversion of the bonding interfaces was investigated, using micro-Raman spectroscopy, and *in vitro* by infrared Fourier Transform. Data obtained confirm that a self-etching adhesive system with the quaternary ammonium methacrylate polymer [QAMP] could produce the effective bond strength under *in vitro* conditions and stability of the degree of conversion *in situ* and *in vitro*. In the evaluation of mechanical properties, hardness and elastic modulus, slices of restored teeth were prepared with adhesives under study and were submitted to artificial methods for producing caries lesions during, pH-cycling or microbiological assay, for subsequent nanoindentation test performed in the region of the interface resin-dentin, leading to check the quality of the formed substrate. In general, Clearfil™ SE Bond containing QAMP provided better mechanical properties for the resin-dentin interface than other commercial self-etching adhesives after cariogenic challenges. These data include the development of quaternary ammonium polymers to provide additional benefits for dental adhesive systems widely used in dentistry.

Keywords: Antibacterial activity; Mechanical properties; Quaternization; Restorative material; Spectroscopy.

PREFÁCIO

Esta tese está baseada na patente em processo e nos seguintes artigos:

1. Patente: número do registro: BR 10 2012 02664, data de depósito: 18/10/2012, título: "Processo de obtenção e uso de polímero metacrílico quaternário de amônio com propriedades antimicrobianas para a incorporação em materiais odontológicos", Instituto Nacional de Propriedade Industrial.
2. "An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system." Publicado em 18/02/2013, no *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*.
3. "Effect on vascular permeability of a self-etching adhesive system containing an antimicrobial quaternary ammonium polymer QAMP into subcutaneous tissue of rats." Submetido ao *European Journal of Oral Sciences*.
4. "Effect of an antimicrobial adhesive system containing QAMP on bond strength and degree of conversion." Submetido a *Dental Materials*.
5. "A self-etching adhesive system containing a novel antimicrobial polymer [QAMP] improves the mechanical properties of resin-dentin interface after a cariogenic challenge." Submetido ao *Operative Dentistry*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	<i>Síntese de polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP]. a)</i> Compostos sob agitação em balão de fundo redondo. <i>b)</i> Reação mantida em agitação magnética sob refluxo a 80°C durante 12 h. <i>c)</i> Processo de rotaevaporação para a retirada total do solvente.....	31
Figura 2.	<i>a) QAMP</i> com aspecto de pó e coloração amarelo-pálido após secagem. <i>b)</i> Moagem em gral com pistilo em porcelana. <i>c)</i> Tamisação do polímero para obtenção de partículas de pó com mesmo tamanho e morfologia. <i>d)</i> Aspecto do pó para ser submetido a liofilização e posterior utilização.....	32
Figura 3.	<i>Espectroscopia visível. a)</i> Após o preparo da amostra com os componentes necessários para a quantificação de grupos de amônio quaternário de QAMP, o tubo foi agitado até o completo desaparecimento da coloração azul a partir da fase orgânica, o que resulta na porcentagem de quaternização do produto. A figura exemplifica primeiramente o tubo contendo o QAMP e o segundo tubo com o controle Eudragit® E100. <i>b)</i> Espectrofotômetro Thermo UV-Vis (Genesys 10S) utilizando cubetas de vidro de 1cm ⁻¹ de caminho óptico, com leitura em $\lambda = 640$ nm.....	34
Figura 4.	<i>Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. a)</i> Volumes de 10, 20, 40 e 80 μ L dos adesivos em estudo foram espalhados na parte inferior de tubos de hemólise e fotoativados com LED por 20 s. A seguir, foi adicionado 1 mL de caldo BHI contendo cultura padrão de <i>S. mutans</i> . <i>b)</i> Tubos após serem deixados sob condições microaerofílicas durante 24h, a 35 $\pm$ 0,5°C. <i>c)</i> Leitor de microplacas espectrofotométrico (EL800, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, EUA).....	38
Figura 5.	<i>Teste de liberação do polímero quaternário de amônio dos sistemas adesivos. a)</i> Pesagem de 0,05 g de cada sistema adesivo por frasco âmbar contendo 20 mL de saliva artificial. <i>b)</i> Espectrofotômetro Thermo UV-Vis (Genesys 10S) utilizando cubetas de vidro de 1cm ⁻¹ de caminho óptico, com leitura em $\lambda = 640$ nm.....	39
Figura 6.	Esquema do desenho experimental da avaliação da permeabilidade vascular de sistemas adesivos com potencial antimicrobiano em subcutâneo de ratos.....	40
Figura 7.	<i>Método azul de Evans. a)</i> Animal logo após procedimento anestésico e tricotomia. <i>b)</i> e <i>c)</i> Injeções de azul de Evans 2% administradas por via intravenosa, utilizando uma agulha de calibre 28-30, inserida cerca de 2 mm para dentro da veia gengival.....	41

Figura 8.	a) Sistemas adesivos em estudo. b) 0,1 mL de cada sistema adesivo foi injetado por via intradérmica em dois sítios experimentais (inferior e superior). c) Fotoativação com LED (LED Rádii-cal, SDI, São Paulo, Brasil) por 10s.....	42
Figura 9.	a) Após a sacrificação no tempo determinado, dissecação para retirada da pele dorsal. b) Vista aproximada da região do infiltrado inflamatório, com coloração azul referente ao corante azul de Evans.....	43
Figura 10.	a) A pele dorsal dissecada, retirada e fixada em uma superfície para obtenção dos sítios experimentais. b) Utilização de um vazador de couro para obtenção das peças de forma padronizada. c) Uma das peças para exemplificar padrão de imagem de análise da área no software Image Pro Plus.....	43
Figura 11.	a) Laser-Doppler (Moor LDI, Moor Instruments, mAxminster, UK) com duas sondas acopladas. b) Sondas em posição no animal para obtenção dos valores de unidade de perfusão e da concentração de células vermelhas do sangue.....	45
Figura 12.	Dados fluxométricos obtidos no software moorVMS-LDF™. a) Fluxo e concentração para as sondas 1 e 2. b) Delimitação da região de interesse (ROI) de 0 a 30 segundos para cada leitura. c) Média fornecida pelo software moorVMS-LDF™ da região de interesse demarcada.....	46
Figura 13.	a) Terceiros molares hígidos. b) Corte da superfície oclusal. c) Dentes com a dentina exposta.....	48
Figura 14.	a) Remoção do esmalte ao redor do dente. b) Dentes sem esmalte ao redor. c) Superfície do dente preparada com lixas de granulação #180 e #600, padronizando a <i>smear layer</i>	48
Figura 15.	Esquema do desenho experimental da avaliação da resistência de união e grau de conversão <i>in situ</i> dos sistemas adesivos em estudo.....	49
Figura 16.	a) Após realização dos procedimentos adesivos e restauração com resina composta, o dente foi fixado em suporte plástico com cera pegajosa. b) Sistemas adesivos em estudo. c) Resina composta Filtek® Z350 XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA).....	50
Figura 17.	a) Realização dos cortes para obtenção dos espécimes b) Espécimes em forma de palitos.....	50
Figura 18.	a) Máquina de ensaios universal (Kratos Dinamômetros, São Paulo, SP, Brasil). b) Palito fixado ao dispositivo para teste de microtração.....	51
Figura 19.	Espectroscopia micro-Raman da interface adesiva. a) Espectrofotômetro de Raman (BrukerOptikGmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany). b) Fatia posicionada para	

	visualização em magnificação de 100 x. c) Fotomicrografia da região intertubular em análise.....	53
Figura 20.	Espectroscopia micro-Raman do produto [QAMP] e matérias-primas. a) QAMP, Eudragit® E100 e brometo de <i>n</i> -octila. b) Espectrofotômetro de Raman (BrukerOptikGmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany).....	55
Figura 21.	a) Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (Spectrum 100, PerkinElmer, Shelton, EUA). b) Amostra de sistema adesivo fotopolimerizado no centro do cristal para reflectância total atenuada.....	56
Figura 22.	Esquema do desenho experimental do ensaio de nanoindentação.....	58
Figura 23.	<i>Indução de lesão de cárie artificial por ciclagem de pH:</i> dentes imersos em 5,0 ml de cada solução do sistema de ciclagem de pH, mantendo-se 8 horas em solução desmineralizante e 14 horas em solução remineralizante.....	59
Figura 24.	<i>Indução de lesão de cárie</i> microbiológica a) Tubos de ensaio contendo uma solução de cárie artificial e os dentes restaurados com os sistemas adesivos em estudo. b) Caldo da solução de cárie artificial para troca a cada 48 horas.....	60
Figura 25.	a) Tubos de ensaio mantendo 5mL da solução de cárie artificial e os dentes. b) Troca do caldo a cada 48 horas ao lado do bico de Bunsen. c) Tubos com os dentes em condição de microaerofilia para crescimento do <i>S. mutans</i>	60
Figura 26.	a) Tubos de ensaio incubados a 37°C. b) Tubo com película adquirida ao redor do dente, representando o intenso crescimento bacteriano.....	61
Figura 27.	a) Máquina de cortes seriados para obtenção de fatias. b) Fatias obtidas de cada dente, mantidas em água deionizada.....	62
Figura 28.	<i>Polimento metalográfico.</i> a) Polimento das fatias embutidas com lixas de decrescentes abrasividades. b) e c) Polimento das fatias com disco de feltro e pasta diamantada.....	63
Figura 29.	a) Fatias fixadas com parafina em porta-amostras metálicos. b) Porta-amostra com as fatias, situado sobre uma mesa que se movimenta, em relação ao microscópio ou ao penetrador.....	64
Figura 30.	Vista do conjunto Nano Indenter® XP. a) Conjunto de programação e controle formado pela estação de trabalho com seus periféricos. b) Nano Indenter® XP. c) Cabine isoladora.....	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DOS CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1	An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system	
Figure 1.	Scheme of synthesis of the quaternary ammonium methacrylate polymer QAMP.....	72
Figure 2.	FTIR spectra of Eudragit™ E100, <i>n</i> -octyl bromide, and QAMP.....	78
Figure 3.	¹ H NMR spectrum of QAMP.....	79
Figure 4.	¹³ C-DEPT NMR spectra of Eudragit™ E100 and QAMP.....	80
Figure 5.	Wide-angle XRPD patterns of Eudragit™ E100 and QAMP...	81
Figure 6.	TG curves of Eudragit™ E100, <i>n</i> -octyl bromide, and QAMP..	82
Figure 7.	Absorbance values concerning the microbial growth of <i>S. mutans</i> in presence of different concentrations of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ SE Bond, and Clearfil™ Protect Bond. MIC value for each adhesive system was determined by comparing to MIC90. BHI broth and BHI broth containing <i>S. mutans</i> culture were used as reference parameters.....	86
Figure 8.	a) Scores obtained from the microbial growth of <i>S. mutans</i> in presence of different concentrations of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ SE Bond, and Clearfil™ Protect Bond. MBC value for each adhesive system was determined as the eradication concentration which provided a score = 0. BHI broth containing <i>S. mutans</i> culture was used as reference parameter. Scores: 0 = no bacterial growth; 1 = rare bacterial colonies; 2 = moderate bacterial growth; 3 = strong bacterial growth.....	87
Figure 9.	Release profile of the quaternary ammonium compounds from the adhesive systems.....	89
CAPÍTULO 2	Effect on vascular permeability of a self-etching adhesive system containing an antimicrobial quaternary ammonium polymer QAMP into subcutaneous tissue of rats	
Figure 1.	Extravasation area (mm ²) of blue dye in dorsal skin tissue of rats for the experimental groups, 3 and 6 h after intradermal injection.....	104
Figure 2.	Amount of dye extracted (µg/site) using formamide for the experimental groups, 3 and 6 h after intradermal injection.....	104
Figure 3.	Changes in blood flow for the experimental groups immediately, 3, and 6 h after intradermal injection.....	105

Figure 4.	Changes in CMBC for the experimental groups immediately, 3, and 6 h after intradermal injection	106
CAPÍTULO 3	Effect of an antimicrobial adhesive system containing QAMP on bond strength and degree of conversion	
Figure 1.	Micro-Raman spectra of uncured and cured adhesive systems (Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond, Clearfil™ SE Bond). The reference band is shown at 1609 cm ⁻¹ and the reactive band related to C=C group is indicated at 1639 cm ⁻¹ (arrows). This band decreases during polymerization and was used for calculating the degree of conversion.....	125
Figure 2.	Raman spectra of QAMP and raw materials [Eudragit™ E100 and <i>n</i> -octyl bromide].....	126
CAPÍTULO 4	A self-etching adhesive system containing a novel antimicrobial polymer [QAMP] improves the mechanical properties of resin-dentin interface after a cariogenic challenge	
Figure 1.	Experimental setup. (A): Dentin exposure after removing the occlusal enamel. (B): Restored tooth with increments of composite resin. (C): Epoxy and varnish coatings of the specimen, excepting the region of adhesive interface. (D): pH-cycling assay. (E): Microbiological caries induction. (F): Longitudinal section for obtaining 1.0 mm resin-bonded dentin slice. (G): Mounted slices using paraffin. (H): Experiments performed in a Nano Indenter XP.....	140
Figure 2.	Scheme of the indentation procedure showing the investigated regions: hybrid layer (R1): 6 indentations (distance d1: 30 µm; load: 1 gf) and dentin (R2): 6 indentations (distance d2: 100 µm far from hybrid layer and load: 5 gf).....	143
Figure 3.	Mean and standard deviation values of hardness (GPa) in dentin after artificial caries induction performed by pH-cycling and microbiological methods.....	144
Figure 4.	Mean and standard deviation values of Young's modulus (GPa) in dentin after artificial caries induction carried out by pH-cycling and microbiological methods.....	145
Figure 5.	Mean and standard deviation values of hardness (GPa) in the hybrid layer after artificial caries induction performed by pH-cycling and microbiological methods.....	145
Figure 6.	Mean and standard deviation values of Young's modulus (GPa) in the hybrid layer after artificial caries induction carried out by pH-cycling and microbiological methods.....	146
Figure 7.	SEM images of nanoindentations in dentin and hybrid layer. (a) Indentations performed in dentin at × 350 magnification. (b) An indentation in dentin at × 1200 magnification. (c) Indentations in hybrid layer at × 600 magnification.....	146

LISTA DE TABELAS DOS CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1	An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system	
Table 1.	Results of agar disk diffusion test for the self-etching dental adhesive systems under study.....	84
CAPÍTULO 2	Effect on vascular permeability of a self-etching adhesive system containing an antimicrobial quaternary ammonium polymer QAMP into subcutaneous tissue of rats	
Table 1.	<i>Adhesive Systems: Composition and Batch #.....</i>	101
CAPÍTULO 3	Effect of an antimicrobial adhesive system containing QAMP on bond strength and degree of conversion	
Table 1.	<i>Adhesive Systems: Composition and Batch #.....</i>	118
Table 2.	Mean and standard deviation values of overall resin-dentin bond strength (MPa) from the evaluated adhesive systems...	123
Table 3.	<i>Fracture mode and premature debonded specimens from the evaluated adhesive systems (*).....</i>	123
Table 4.	Mean and standard deviation values of <i>in situ analysis</i> of degree of conversion (%) for adhesive systems.....	124
Tabela 5.	Mean and standard deviation values of <i>in vitro analysis</i> of degree of conversion (%) for adhesive systems.....	127
CAPÍTULO 4	A self-etching adhesive system containing a novel antimicrobial polymer [QAMP] improves the mechanical properties of resin-dentin interface after a cariogenic challenge	
Table 1.	<i>Adhesive Systems: Composition and Batch #.....</i>	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
AU	Unidades Arbitrárias
BHI	Ágar infusão de cérebro e coração
Bis-GMA	Bis-fenol A-Glicidil Metacrilato
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CMBC	Concentração de células vermelhas do sangue que se deslocam
Cu-K α	Radiação monocromática do cobre
DEPT	Método de Transferência de Polarização
DC	Grau de Conversão
DMAE-CB	Cloreto de (metacriloxi-etil)-cetil-dimetil-amônio
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>E</i>	Módulo de elasticidade
FIDs	Decaimento de Indução Livre
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
FTIR-ATR	FTIR com Reflectância Total Atenuada
g	grama
g.mol ⁻¹	grama por mol
G	gauges
gf	grama-força
GPa	Gigapascal
<i>H</i>	Dureza
Hz	Hertz
h	hora
HEMA	2-Hidroxietilmetacrilato

K	Kelvin
kV	Kilovolts
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LDF	Fluxometria Laser-Doppler
LED	Diodo Emissor de Luz
mA	Miliampere
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MDP	10-Metacriloxidecil diidogeno fosfato
MDPB	Brometo de 12-metacriloiloxidodecilpiridínio
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg/kg	Miligrama por quilograma
MH	Ágar Mueller-Hinton
MIC	Concentração Inibitória Mínima
mL	Mililitro
mL.min ⁻¹	Mililitro por minuto
m/m	Relação massa/massa
mm	Milímetro
MM	Massa molecular
mm ²	Milímetro quadrado
mmHg	Milímetro de mercúrio
mm/min	Milímetro por minuto
mmol	Milimol
mN	Milinewton
m/v	Relação massa por volume
mol.L ⁻¹	Mol por litro
MPa	Megapascal
mW	Miliwatt
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
N ₂	Nitrogênio
NaClO ₄	Perclorato de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato Monossódico

NaN ₃	Azida de Sódio
Nd:YAG	Neodímio:ítrio-alumínio-granada
nm	Nanômetro
nm/s	Nanômetro por segundo
p	Significância
ppm	Partes por milhão
PU	Unidades de Perfusão
QAMP	Polímero metacrílico quaternário de amônio = [poli(metacrilato de dimetilaminoetila-co-metacrilato de brometo de etil-octildimetilamônio-co-metacrilato de metila-co-metacrilato de butila)]
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
rpm	Rotações por minuto
ROI	Região de Interesse
RU	Resistência de União
s	Segundo
SiC	Carbeto de silício
T	Tesla
TGA	Análise Termogravimétrica
UDMA	Uretano dimetacrilato
UFC.mL ⁻¹	Unidades formadoras de colônia por mililitro
vs	versus
ZnSe	Seleneto de Zinco
µg.mL ⁻¹	Micrograma por mililitro
µHg	Microns de mercúrio
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µN	Micronewton
µTBS	Resistência de união à microtração

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Ångström
α	Alfa (nível de significância)
$\approx$	Aproximadamente
X	Aumento da lente óptica
δ	Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
°C	Grau Celsius
°C.min ⁻¹	Grau Celsius por minuto
=	Igual
λ	Lambda
$\pm$	Mais ou menos
>	Maior
<	Menor
™	Marca registrada
#	Número
Δm	Perda de massa
%	Porcentagem
®	Registrado
θ	Theta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	26
2	OBJETIVOS.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
	Material e métodos referente ao Capítulo 1:	
3.1.	Síntese de polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP]..	31
3.2.	Caracterização do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP].....	32
3.2.1.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	32
3.2.2.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	33
3.2.3.	Espectroscopia visível.....	33
3.2.4.	Análise de Difração de Raios-X.....	34
3.2.5.	Análise Termogravimétrica (TGA).....	35
3.3.	Potencial microbiológico do polímero metacrilato quaternário de amônio.....	35
3.4.	Incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio em um sistema adesivo.....	35
3.5.	Testes de suscetibilidade <i>in vitro</i>	36
3.5.1.	Ágar teste de difusão em disco.	36
3.5.2.	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.....	37
3.6.	Liberação dos compostos quaternário de amônio dos sistemas adesivos.....	38
	Material e métodos referente ao Capítulo 2:	
3.7.	Delineamento experimental da avaliação da permeabilidade vascular de sistemas adesivos com potencial antimicrobiano em subcutâneo de ratos.....	39
3.7.1.	Método azul de Evans.....	40
3.7.2.	Fluxometria Laser-Doppler.....	44
	Material e métodos referente ao Capítulo 3:	
3.8.	Avaliação da resistência de união à microtração e do grau de conversão de um sistema adesivo autocondicionante com incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] e da interface adesiva estabelecida por este sistema.....	47
3.8.1.	Seleção e preparo dos dentes.....	47
3.8.2.	Grupos experimentais e procedimentos restauradores.....	47
3.8.3.	Teste de resistência de união à microtração na interface resina-dentina (μ TBS).....	49

3.8.4.	Análise do grau de conversão <i>in situ</i>	52
3.8.4.1.	Espectroscopia micro-Raman da interface resina-dentina.....	52
3.9	Espectroscopia Micro-Raman do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] e matérias-primas [Eudragit® E100 e brometo de <i>n</i> -octila]	54
3.10.	Análise do grau de conversão dos sistemas adesivos <i>in vitro</i>	55
	Material e métodos referente ao Capítulo 4:	
3.11.	Efeito dos sistemas adesivos em estudo sobre as propriedades mecânicas, dureza e módulo de elasticidade, da interface resina-dentina, após métodos artificiais de indução de lesões cariosas.....	57
3.11.1.	Seleção dos dentes, procedimentos restauradores e preparo para serem submetidos aos métodos de indução de lesão de cárie artificial.....	57
3.11.2.	Indução de lesão de cárie artificial por ciclagem de pH.....	58
3.11.3.	Indução de lesão de cárie microbiológica.....	59
3.11.4.	Avaliação da dureza e módulo de elasticidade.....	61
4	CAPÍTULOS	
4.1.	Capítulo 1 (apresentação): Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de um polímero quaternário de amônio para incorporação em sistema adesivo	66
4.1.1.	Artigo do capítulo 1: An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system.....	67
4.2.	Capítulo 2 (apresentação): Avaliação da permeabilidade vascular de sistemas adesivos com potencial antimicrobiano em subcutâneo de ratos	95
4.2.1.	Artigo do capítulo 2: Effect on vascular permeability of a self-etching adhesive system containing an antimicrobial quaternary ammonium polymer QAMP into subcutaneous tissue of rats.....	96
4.3.	Capítulo 3 (apresentação): Avaliação da resistência de união à microtração de um sistema adesivo autocondicionante com incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] e do grau de conversão e da interface adesiva estabelecida por este sistema	112
4.3.1.	Artigo do capítulo 3: Effect of an antimicrobial adhesive system containing QAMP on bond strength and degree of conversion.....	113
4.4.	Capítulo 4 (apresentação): Avaliação frente à indução química dinâmica (ciclagem de pH) e de cárie microbiológica, das propriedades mecânicas da interface de união resina-dentina utilizando o sistema adesivo	

	autocondicionante com incorporação de QAMP.....	135
4.4.1.	Artigo do capítulo 4: A self-etching adhesive system containing a novel antimicrobial polymer [QAMP] improves the mechanical properties of resin-dentin interface after a cariogenic challenge...	136
5	DISCUSSÃO GERAL.....	154
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	158
	REFERÊNCIAS.....	159
	ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa. COEP – UEPG.....	167
	ANEXO B - Aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animal. CEUA – UEPG.....	168
	ANEXO C - Depósito de Pedido de Patente.....	169
	ANEXO D - Primeira página do artigo referente ao Capítulo 1.....	172
	ANEXO E - Submissão do artigo referente ao Capítulo 2.....	173
	ANEXO F - Submissão do artigo referente ao Capítulo 3.....	174
	ANEXO G - Declaração de responsabilidade pelos direitos autorais....	175

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os sistemas adesivos foram desenvolvidos para produzirem adesões efetivas e simultâneas a dois substratos muito diferentes, dentina e esmalte. Entretanto, diversos estudos clássicos demonstraram a falha desses sistemas adesivos pela formação de *microgaps* na interface dentina-restauração [Goracci *et al.*¹ 1995; Perdigão *et al.*² 1996]. Além disso, mesmo os mais recentes sistemas adesivos não são capazes de proporcionar um selamento completo, o que pode influenciar na durabilidade da restauração. Graças às inúmeras pesquisas clínicas e laboratoriais, adesivos são constantemente submetidos a aprimoramentos em sua composição química a fim de que eventuais problemas reportados nos estudos científicos possam ser reduzidos ou, idealmente, eliminados.

Com uma adesão inadequada, ocorre a microinfiltração, definida como a passagem de bactérias, fluidos, substâncias químicas, moléculas e íons entre o dente e a restauração [Cal *et al.*³ 2006]. Isso compromete o desempenho clínico e a longevidade da restauração, contribuindo para a sua descoloração, para a formação de lesões de cáries recorrentes, para a ocorrência de uma resposta pulpar adversa e dor pós-operatória [Bauer, Henson⁴ 1984]. Portanto, materiais restauradores com atividade antimicrobiana são necessários para eliminar esses inconvenientes causados por microrganismos após o preparo do dente e quando há microinfiltração [Imazato *et al.*⁵ 1998].

Nesse sentido, o uso de componentes antimicrobianos incorporados em sistemas adesivos, como antibióticos, glutaraldeído e fluoretos, foi extensivamente avaliado [Bapna *et al.*⁶ 1988; Kudou *et al.*⁷ 2000; Imazato *et al.*⁸ 2002; Kazuno *et al.*⁹ 2005; Fang *et al.*¹⁰ 2006; Fang *et al.*¹¹ 2007]. Porém, esses agentes, simplesmente dispersos na matriz, apresentaram diversas falhas, por não haver um controle rigoroso da cinética de liberação e conduzir ao comprometimento da resistência de união do material restaurador à dentina [Meiers, Shook¹² 1996; Gürgan *et al.*¹³ 1999].

Diante dessa dificuldade, estudos têm sido conduzidos para a utilização de monômeros quaternários de amônio que, quando polimerizados, conferem

propriedades antibacterianas aos sistemas adesivos [Imazato *et al.*¹⁴ 2003; Imazato *et al.*¹⁵ 2004; Imazato *et al.*¹⁶ 2007]. Um importante monômero antimicrobiano para uso em Odontologia é o brometo de 12-metacriloiloxidodecilmiridínio (MDPB). Este produto foi sintetizado pela primeira vez há 20 anos e foi amplamente investigado de acordo com suas propriedades antibacterianas e citotoxicidade [Imazato *et al.*¹⁷ 1992; Imazato *et al.*¹⁸ 1994; Imazato *et al.*¹⁹ 1995; Imazato *et al.*²⁰ 1999]. A partir desses resultados, um sistema adesivo autocondicionante odontológico, contendo 5% de MDPB foi avaliado quanto aos seus efeitos antibacterianos. Esse material demonstrou atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii* e, atualmente, está comercialmente disponível como Clearfil® Protect Bond (Kuraray, Japan) [Imazato *et al.*²¹ 2006].

A fim de investigar novos monômeros antimicrobianos para sistemas adesivos, três monômeros experimentais, na forma de sais de amônio quaternário, entre os quais o cloreto de (metacriloxi-etil)-cetil-dimetil-amônio (DMAE-CB), foram sintetizados e avaliados contra bactérias patogênicas orais. O monômero DMAE-CB exibiu baixa concentração inibitória mínima, variando de 1,2 e 4,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [Xiao *et al.*²² 2008]. Em um estudo adicional, o DMAE-CB foi incorporado em um sistema adesivo nas concentrações de 1, 2 e 3% (m/m). O sistema adesivo contendo 3% de DMAE-CB demonstrou maior atividade antimicrobiana contra *S. mutans*. Esse monômero mostrou tanto a integração com a matriz do sistema adesivo devido ao grupo metacriloila, quanto efeito antibacteriano decorrente da estrutura de amônio quaternário [Xiao *et al.*²³ 2009].

Embora o uso de monômeros quaternários de amônio em sistemas adesivos seja uma estratégia viável e de uso comercial, alguns estudos têm demonstrado as limitações desses materiais. Feuerstein *et al.*²⁴ (2007) realizaram um trabalho para investigar as propriedades antibacterianas imediatas e duradouras de quatro sistemas adesivos autocondicionantes, incluindo o Clearfil® Protect Bond, durante 14 dias. Contudo esse material exibiu um efeito antibacteriano por somente sete dias. Além disso, não foi

efetivo no resultado antibacteriano contra *S. mutans* em 14 dias. Com isso, as moléculas de MDPB que não foram polimerizadas foram lixiviadas para fora do sistema adesivo, o que conduziu à redução do efeito antimicrobiano. Somando-se a isso, esses compostos quaternários de amônio de baixa massa molecular podem apresentar citotoxicidade às células pulpares humanas e, com isso, comprometer a segurança clínica [Lu *et al.*²⁵ 2007]. Está bem estabelecido que monômeros contendo grupo vinila reativo como o metacrilato de 2-hidroxietila produziram efeitos citotóxicos em células pulpares humanas [Imazato *et al.*²⁶ 2000]. Além disso, esses monômeros metacrílicos possuem as desvantagens de serem voláteis, quimicamente instáveis e permeáveis na mucosa oral.

Como não existe, até o presente momento, um componente ideal para conferir propriedades antimicrobianas aos sistemas adesivos odontológicos, novas estratégias inventivas devem ser desenvolvidas. Diante deste contexto, o presente estudo tem como objetivos descrever a síntese, a caracterização e as propriedades antimicrobianas e de permeabilidade vascular de um novo polímero metacrílico quaternário de amônio [poli(metacrilato de dimetilaminoetila-co-metacrilato de brometo de etil-octildimetilamônio-co-metacrilato de metila-co-metacrilato de butila)] [QAMP] para incorporação em sistemas adesivos odontológicos, com o propósito de proporcionar um efeito antimicrobiano duradouro à restauração dental. Além disto, avaliar a resistência de união, grau de conversão e propriedades mecânicas da interface de união resina-dentina utilizando um sistema adesivo autocondicionante com incorporação deste produto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Relatar o desenvolvimento de um novo polímero metacrílico quaternário de amônio, [poli(metacrilato de dimetilaminoetila-co-metacrilato de brometo de etil-octildimetilamônio-co-metacrilato de metila-co-metacrilato de butila)] [QAMP], para fornecer atividade antimicrobiana aos sistemas adesivos odontológicos.

2.2 Objetivos específicos:

- Sintetizar um polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP], a partir do Eudragit® E100 [poli(metacrilato de metila-co-metacrilato de dimetilaminoetila-co-metacrilato de butila)] com brometo de *n*-octila para incorporação em sistema adesivo.
- Caracterizar o polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] quanto às bandas típicas do produto obtido, à elucidação estrutural, à quantificação dos grupos quaternários de amônio, à cristalinidade com relação à matéria-prima e à estabilidade térmica.
- Avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano de QAMP antes e após a incorporação em um sistema adesivo autocondicionante.
- Avaliar a liberação dos compostos quaternários de amônio após a incorporação de QAMP em um sistema adesivo autocondicionante, em comparação ao sistema adesivo contendo o monômero quaternário de amônio [MDPB].
- Avaliar a resposta inflamatória inicial em subcutâneo de ratos, do sistema adesivo autocondicionante com e sem a incorporação de QAMP e do sistema adesivo autocondicionante com MDPB.
- Analisar *in vitro* a influência da incorporação de QAMP no sistema adesivo autocondicionante e de um sistema adesivo autocondicionante com MDPB, na resistência de união por meio do teste de microtração (imediatamente, após 6 e 12 meses de armazenamento dos espécimes). Além disso, verificar os padrões de fratura na interface adesiva.

- Avaliar o grau de conversão do sistema adesivo antes e após incorporação de QAMP e do sistema adesivo autocondicionante com MDPB.
- Verificar a influência no grau de conversão *in situ* da camada híbrida após a incorporação de QAMP em um sistema adesivo autocondicionante e do sistema adesivo contendo MDPB.
- Avaliar as propriedades mecânicas da interface de união resina-dentina estabelecida pelos sistemas adesivos em estudo, após induções de lesões de cárie artificial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Material e métodos referente ao Capítulo 1:

3.1. Síntese de polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP]

A síntese do polímero metacrílico quaternário de amônio foi realizada por alquilação exaustiva de um passo (reação de Menshutkin) [Menschutkin²⁷ 1890] utilizando 2,00 g poli(metacrilato de dimetilaminoetila-co-metacrilato de metila-co-metacrilato de butila (2:1:1, MM = 150.000 g.mol⁻¹), comercialmente conhecido como Eudragit® E100 [Röhm Pharma Polymers, Darmstadt, Germany] (7,20 mmol de unidades do mero metacrilato de dimetilaminoetila) e 10,6 mL de brometo de *n*-octila (40 mmol) [Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA] em 60 mL de etanol [Barney *et al.*²⁸ 2005; Lu *et al.*²⁵ 2007] (Figura 1a). A reação foi mantida em agitação magnética sob refluxo a 80°C durante 12 h (Figura 1b). O meio de reação foi então concentrado sob pressão reduzida de 300-500 mmHg a 40°C (Figura 1c) e o polímero metacrílico quaternário de amônio (QAMP) foi precipitado utilizando 100 mL de *n*-hexano gelado.

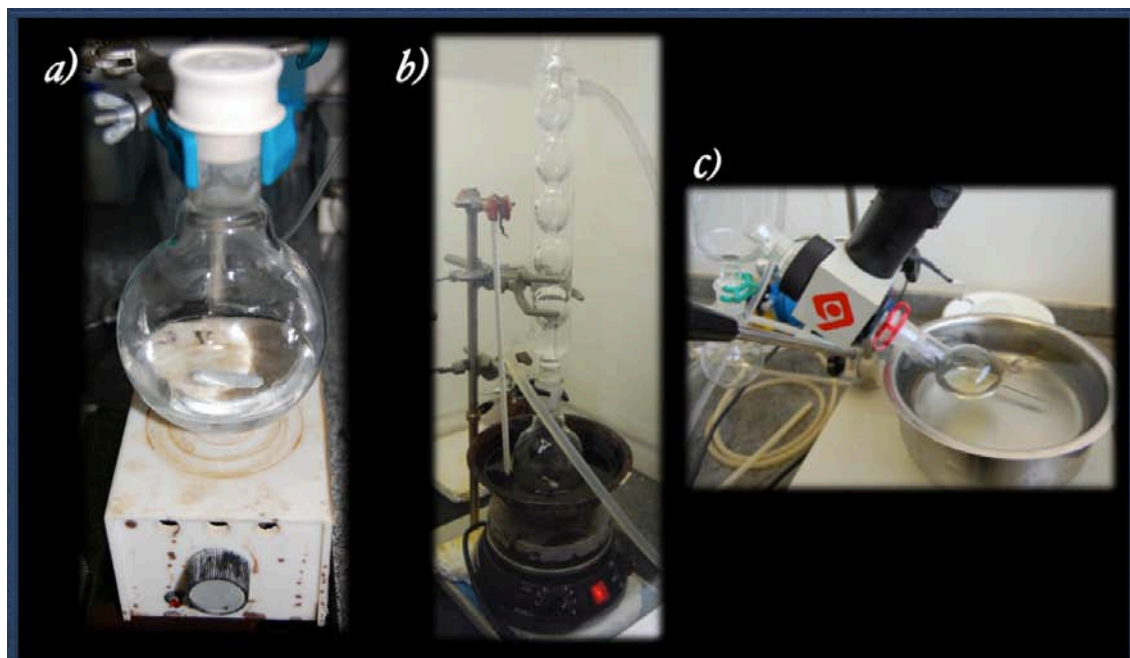


Figura 1. Síntese de polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP]. **a)** Compostos sob agitação em balão de fundo redondo. **b)** Reação mantida em agitação magnética sob refluxo a 80°C durante 12 h. **c)** Processo de rotaevaporação para a retirada total do solvente.

O produto resultante QAMP foi filtrado, dissolvido em 20 mL de metanol e precipitado novamente. Após a secagem, o QAMP apresentou aspecto de pó, com coloração amarelo-pálido (Figura 2a). Finalmente, foi seco durante 2 dias em um liofilizador a -40°C e 400 μHg de vácuo.

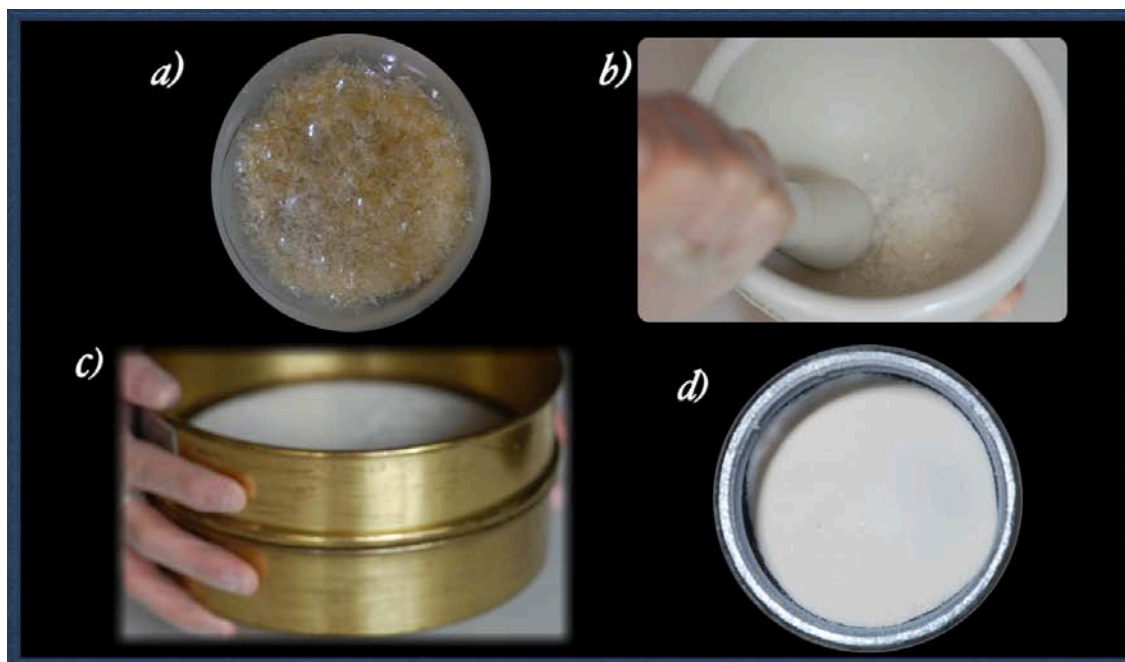


Figura 2. *a)* **QAMP** com aspecto de pó e coloração amarelo-pálido após secagem. *b)* Moagem em gral com pistilo em porcelana. *c)* Tamisação do polímero para obtenção de partículas de pó com mesmo tamanho e morfologia. *d)* Aspecto do pó para ser submetido a liofilização e posterior utilização.

3.2. Caracterização do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP]

3.2.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para confirmar a síntese do polímero de metacrilato quaternário de amônio, os espectros de FTIR das matérias-primas e do polímero sintetizado foram realizados em pastilhas de KBr, de 4000 a 400 cm^{-1} no equipamento Bio-Rad Laboratories, Excalibur Series (FTS 3500GX), com 32 scans/min e resolução de 2 cm^{-1} [Mendes *et al.*²⁹ 2012].

3.2.2. *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*. Para elucidação estrutural, os espectros de ^1H e ^{13}C foram obtidos através do espectrômetro Bruker Avance DRX-400 operando a 9,4 T, observando ^1H em 400,13 e ^{13}C em 100,61. Este espectrômetro é equipado com uma sonda multinuclear de detecção inversa de 5 mm de campo em z (experimentos 2D) ou uma sonda multinuclear de detecção direta de 5 mm (espectros de ^1H e ^{13}C). Todos os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C estão relacionados com o deslocamento do TMS ($\delta=0$ ppm), como referência interna. Todos os solventes deuterados utilizados foram obtidos de Sigma-Aldrich®, sendo CDCl_3 para o brometo de *n*-octila e Eudragit® E100 e $\text{DMSO}-d_6$ para o produto resultante (QAMP). Como padrão e referência do ^1H em relação à ressonância do próton resultante de deuteração incompleta do CDCl_3 (δ 7,25) e DMSO (δ 2,50); espectros de RMN do ^{13}C em relação ao carbono do CDCl_3 (δ 77,0) e DMSO (δ 39,51). Os espectros de RMN de ^1H foram processados usando transformada de Fourier, com largura espectral de 6443,3 Hz, 64 K pontos de dados e por uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3 Hz. O método de transferência de polarização (DEPT) foi utilizado nos espectros de ^{13}C para distinguir entre sinais de CH_3 , CH_2 , CH [Pazhanisamy *et al.*³⁰ 2005]. Os dados obtidos foram tratados pelo programa Bruker TopSpin®.

3.2.3. *Espectroscopia visível*. Foi realizada a quantificação de grupos de amônio quaternário de QAMP obtida espectrofotometricamente em triplicata, utilizando o corante disulphine blue VN 150 [Bucci *et al.*³¹ 2006]. Uma massa de 50 mg de QAMP foi dissolvida em 1 mL de etanol 90% e colocado num tubo de vidro pyrex (15 mL). O solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em 1 mL de 1 mmol.L^{-1} do corante em solução aquosa. Este meio foi extraído com 10 mL de CHCl_3 . Após o procedimento de extração, a fase orgânica (5 mL) foi transferida para outro tubo de ensaio contendo 5 mL de 1 mol.L^{-1} de solução aquosa de NaClO_4 . Este tubo foi então cuidadosamente agitado até o completo desaparecimento da coloração azul a partir da fase orgânica (Figura 3a). A absorvância da solução aquosa foi medida a 640 nm com um espectrofotômetro Thermo UV-Vis (Genesys 10S) (Figura 3b) utilizando

cubetas de vidro com 1cm^{-1} de caminho óptico. A solução aquosa de 1 mol.L^{-1} de NaClO_4 foi utilizada como branco. O resultado foi expresso como o grau de quaternização dos grupos de dimetilaminoetila em porcentagem. O mesmo procedimento foi também realizado para Eudragit® E100 como referência.

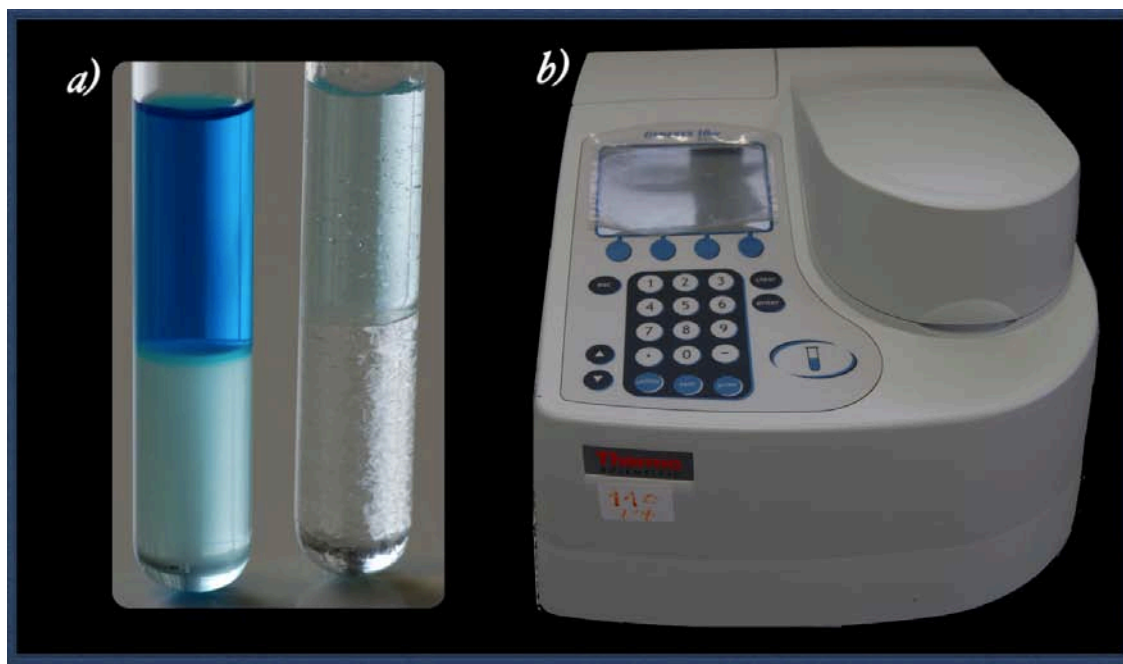


Figura 3. Espectroscopia visível. **a)** Após o preparo da amostra com os componentes necessários para a quantificação de grupos de amônio quaternário de QAMP, o tubo foi agitado até o completo desaparecimento da coloração azul a partir da fase orgânica, o que resulta na porcentagem de quaternização do produto. A figura exemplifica primeiramente o tubo contendo o QAMP e o segundo tubo com o controle Eudragit® E100. **b)** Espectrofotômetro Thermo UV-Vis (Genesys 10S) utilizando cubetas de vidro de 1cm^{-1} de caminho óptico, com leitura em $\lambda = 640\text{ nm}$.

3.2.4. Análise de Difração de Raios-X. Com a finalidade de investigar a cristalinidade do QAMP comparada ao Eudragit® E100, espectros foram obtidos em difratômetro de raio-X Shimadzu DRX-6000, com scan de $2^\circ.\text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV , para observação de picos indicativos de cristalinidade [Mendes *et al.*²⁹ 2012].

3.2.5. Análise Termogravimétrica (TGA). A fim de avaliar a estabilidade térmica do QAMP, as curvas *termogravimétricas* foram obtidas com uma termobalança Shimadzu (TGA-50) no intervalo de temperatura de 25-900°C, utilizando cadinhos de platina abertos, com aproximadamente 5 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de N₂ (caudal: 50 mL.min⁻¹) e a taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹ [Farago *et al.*³² 2008].

3.3. Potencial microbiológico do polímero metacrilato quaternário de amônio [QAMP]

A fim de confirmar o potencial antimicrobiano, QAMP foi avaliado pelo método ágar teste de difusão em disco antes da incorporação em um sistema adesivo. Em resumo, as placas contendo ágar Mueller-Hinton (MH) com 5% de sangue de carneiro foram inoculados com cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) a partir de uma suspensão do inóculo previamente padronizada a uma concentração de 5×10^5 UFC.mL⁻¹ que atingiram a turvação do padrão 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) [CLSI³³ 2011; Karamoddini *et al.*³⁴ 2011]. Poços de 7 mm de diâmetro foram cortados nas placas de ágar e 10 mg do QAMP em forma de pó foi adicionado a cada poço [Lu *et al.*²⁵ 2007]. As placas foram incubadas em condições microaerofílicas durante 24 h, a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A zona de inibição do crescimento foi medido em milímetros. Os testes foram realizados em triplicata. Eudragit® E100 (pó) e brometo de *n*-octila (líquido) foram também avaliados como controles.

3.4. Incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] em um sistema adesivo

O produto QAMP foi incorporado ao Clearfil® SE Bond [Kuraray, Kuraray Medical Inc., Kurashiki, Okayama, Japan], um sistema adesivo autocondicionante de dois-passos fotopolimerizável comercialmente disponível. Uma massa exata de 0,1667 g de QAMP foi pesada e adicionada em 1,5 mL do *primer* deste adesivo. A concentração incorporada inicialmente resultou em

uma concentração de 10% (m/v), uma vez que posteriormente os componentes do *primer* e adesivo são utilizados numa proporção de 1:1, a concentração final de QAMP no sistema adesivo foi de 5% (m/m) após a fotopolimerização. Clearfil® Protect Bond, disponível comercialmente como um sistema adesivo autocondicionante com conhecido potencial antimicrobiano [Imazato *et al.*³⁵ 2001; Esteves *et al.*³⁶ 2010], e Clearfil® SE Bond sem QAMP foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Em todas as análises posteriores esses sistemas adesivos foram também fotopolimerizados na mesma proporção do experimental (1:1).

3.5. Testes de suscetibilidade *in vitro*

As propriedades antibacterianas de Clearfil® SE Bond contendo 5% de QAMP foram investigadas através de testes de susceptibilidade *in vitro* pelo método ágar teste de difusão em disco [Lu *et al.*²⁵ 2007], concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas [Lu *et al.*²⁵ 2007; Xiao *et al.*²² 2008].

3.5.1. Ágar teste de difusão em disco. Cada disco de papel de filtro estéril (diâmetro: 6 mm, espessura: 1,5 mm) foi tratado com 20 µL de Clearfil® SE Bond contendo 5% de QAMP (10 µL de *primer* e 10 µL de adesivo) ou controles positivo/negativo, fotoativados com LED por 20 s (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brasil) em ambos os lados. Após a fotoativação, os discos foram testados contra culturas de *S. mutans* semeadas em ágar MH suplementado com 5% de sangue de carneiro como descrito anteriormente. O diâmetro da zona de inibição de crescimento em torno de cada disco foi determinada em milímetros após 24 h de incubação em condições microaerofílicas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram avaliados estatisticamente usando ANOVA um critério e teste de Scheffé (5% de significância).

3.5.2. *Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.* Volumes de 10, 20, 40 e 80 μL de Clearfil® SE Bond contendo 5% de QAMP, foram obtidos através de alíquotas iguais de primer e de adesivo, ou o controle positivo/negativo foram espalhados na parte inferior de tubos de hemólise, aplicado um jato de ar e fotoativados com LED por 20 s. A seguir, foi adicionado 1 mL de caldo BHI contendo cultura padrão de *S. mutans* obtida anteriormente (Figura 5a). Os tubos foram agitados e a densidade óptica inicial foi conseguida através da transferência de 200 μL de cada meio de cultura para uma microplaca de 96 poços e medindo a absorvância a 450 nm usando um leitor de microplacas espectrofotométrico (EL800, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, EUA) (Figura 5c). Os tubos foram então cultivados sob condições microaerofílicas durante 24h, a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A densidade óptica final foi também espectrofotometricamente ensaiada como previamente relatado (Figura 5b). O crescimento bacteriano foi estimado por alterações dos valores de densidade óptica em cada poço considerando as medições efetuadas antes e após a incubação. A concentração inibitória mínima (MIC) necessária para uma inibição de crescimento de 90% de *S. mutans* isolado (MIC90) foi calculada por regressão linear utilizando o programa GraphPad 4.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Os testes foram realizados em triplicata com caldo BHI servindo como controle branco. A fim de obter a concentração bactericida mínima (MBC), subculturas foram obtidas espalhando o conteúdo a partir destes poços em placas de ágar MH suplementado com 5% de sangue de carneiro. Placas foram incubadas em condições microaerofílicas durante 24 h, a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. O valor da MBC foi avaliado através de escores (0 = sem crescimento bacteriano, 1 = raras colônias de bactérias, 2 = moderado crescimento bacteriano, 3 = forte crescimento bacteriano). Em relação às concentrações iniciais de cada sistema adesivo (10, 20, 40 e 80 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), uma curva de concentração-morte contra *S. mutans* foi realizada. A fim de proporcionar uma análise comparativa, caldo BHI contendo *S. mutans* foi também investigado.

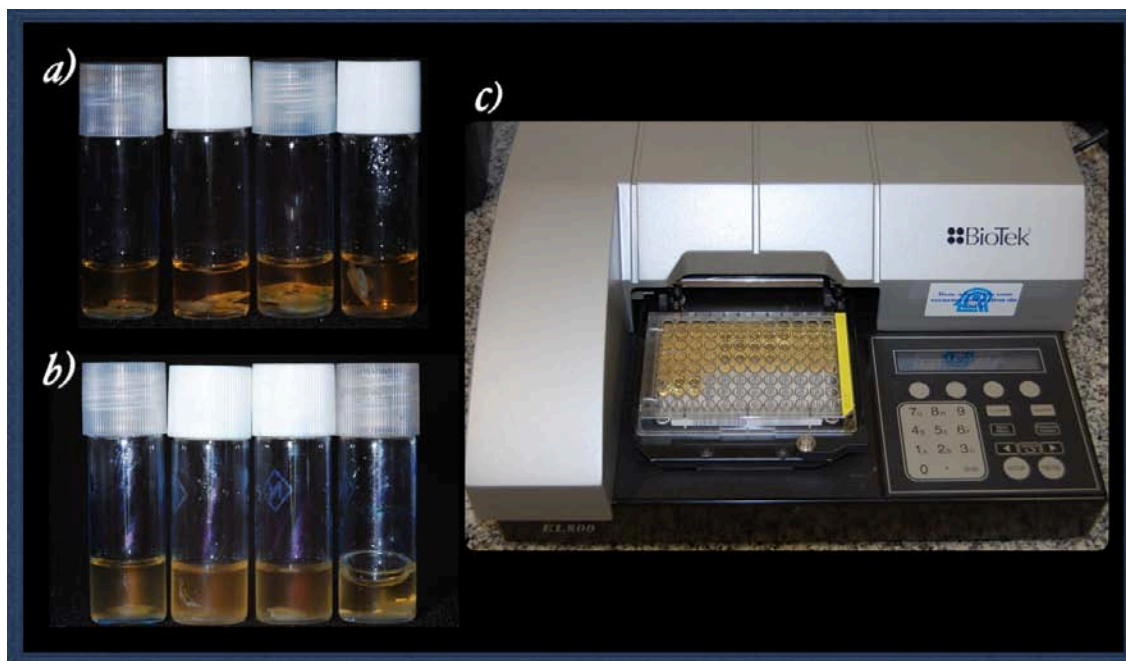


Figura 4. *Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.* **a)** Volumes de 10, 20, 40 e 80 μL dos adesivos em estudo foram espalhados na parte inferior de tubos de hemólise e fotoativados com LED por 20 s. A seguir, foi adicionado 1 mL de caldo BHI contendo cultura padrão de *S. mutans*. **b)** Tubos após serem deixados sob condições microaerofílicas durante 24h, a $35\pm 0,5^\circ\text{C}$. **c)** Leitor de microplacas espectrofotométrico (EL800, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, EUA).

3.6. Liberação dos compostos quaternários de amônio dos sistemas adesivos

Com o propósito de avaliar a porcentagem de liberação do composto quaternário de amônio a partir dos sistemas adesivos, uma massa polimerizada de 0,05 g do Clearfil® SE Bond contendo 5% de QAMP foi colocada em um frasco âmbar contendo 20 mL de saliva artificial em triplicata. Este sistema foi mantido a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por um período total de 30 dias. Após intervalos de tempo pré-determinados (1, 7, 14, 21 e 30 dias), alíquotas de 1 mL foram coletadas, com a reposição da saliva artificial em igual volume. Para a quantificação da porcentagem de liberação do composto quaternário de amônio presente em cada alíquota foi empregado o método do corante azul de dissulfina VN, como previamente reportado (3.2.3. *Espectroscopia visível*). Considerando-se que Clearfil® Protect Bond apresenta MDPB na sua composição, um monômero quaternário de amônio, este sistema adesivo comercial foi avaliado utilizando o

mesmo procedimento para fins de comparação. Devido à Clearfil® SE Bond não apresentar nenhum composto quaternário de amônio, foi utilizado como controle negativo.



Figura 5. *Teste de liberação do polímero quaternário de amônio dos sistemas adesivos. a)* Pesagem de 0,05 g de cada sistema adesivo por frasco âmbar contendo 20 mL de saliva artificial. *b)* Espectrofotômetro Thermo UV-Vis (Genesys 10S) utilizando cubetas de vidro de 1cm⁻¹ de caminho óptico, com leitura em $\lambda = 640$ nm.

Material e métodos referente ao Capítulo 2:

3.7. Delineamento experimental da avaliação da permeabilidade vascular de sistemas adesivos com potencial antimicrobiano em subcutâneo de ratos

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foi aprovado pelo Comitê de Ética local sob protocolo nº 09617/2011.

Foram utilizados quarenta ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Albinus Wistar*), com 2-3 meses de idade, pesando entre 200 e 250 g. Os animais foram mantidos em sala climatizada e receberam uma dieta balanceada e água à vontade. As substâncias testadas foram divididas em quatro grupos: solução

salina a 0,9% (controle); Clearfil® Protect Bond (um sistema adesivo autocondicionante disponível comercialmente com conhecido potencial antimicrobiano); Clearfil® SE Bond (um sistema adesivo autocondicionante de dois-passos amplamente utilizado); Clearfil® SE Bond, contendo 5% do polímero metacrílico quaternário de amônio (QAMP). Os ratos (n=5) foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (cetamina 75 mg/kg e xilazina 10 mg/kg). A pele dorsal foi tricotomizada e desinfetada com 5% de álcool iodado.

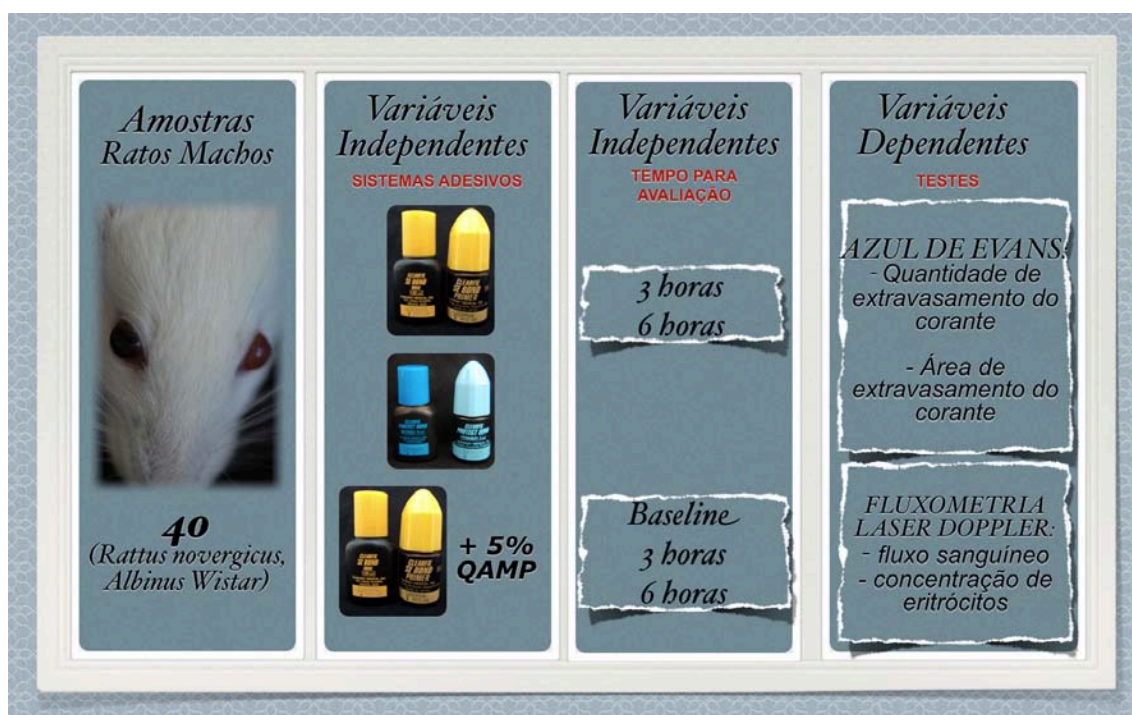


Figura 6. Esquema do desenho experimental da avaliação da permeabilidade vascular de sistemas adesivos com potencial antimicrobiano em subcutâneo de ratos.

3.7.1. Método azul de Evans. Inicialmente, as injeções de azul de Evans 2% (20 mg/kg) foram administradas por via intravenosa, utilizando uma agulha de calibre 28-30 G, que foi inserida cerca de 2 mm para dentro da veia gengival [Oliveira *et al.*³⁷ 2009]. A fim de investigar o efeito da permeabilidade vascular, 0,1 mL de cada sistema adesivo, obtido utilizando alíquotas iguais de primer e adesivo, foi injetado por via intradérmica em dois sítios experimentais (inferior e superior) e fotoativado com LED (LED Rádi-cal, SDI, São Paulo, Brasil) por 10s, com intensidade de luz aferida em 600mW/cm², conforme leitura em

radiômetro. Este procedimento também foi realizado com solução salina 0,9%, excluindo a fotoativação. A parte dorsal médio-lateral não recebeu nenhum tratamento e foi utilizada como controle. Os animais foram sacrificados 3 e 6 horas após a injeção de cada sistema adesivo. A pele dorsal foi dissecada e retirada. Os sítios experimentais foram então obtidos utilizando um vazador de 19,05 mm e pesados numa balança analítica (Shimadzu, Japão). Estas amostras foram fotografados (Câmera digital Nikon D40, Tokyo, Japão, equipado com uma lente Nikon de 105 mm de macro) e as imagens de 6,2 megapixels foram obtidas.

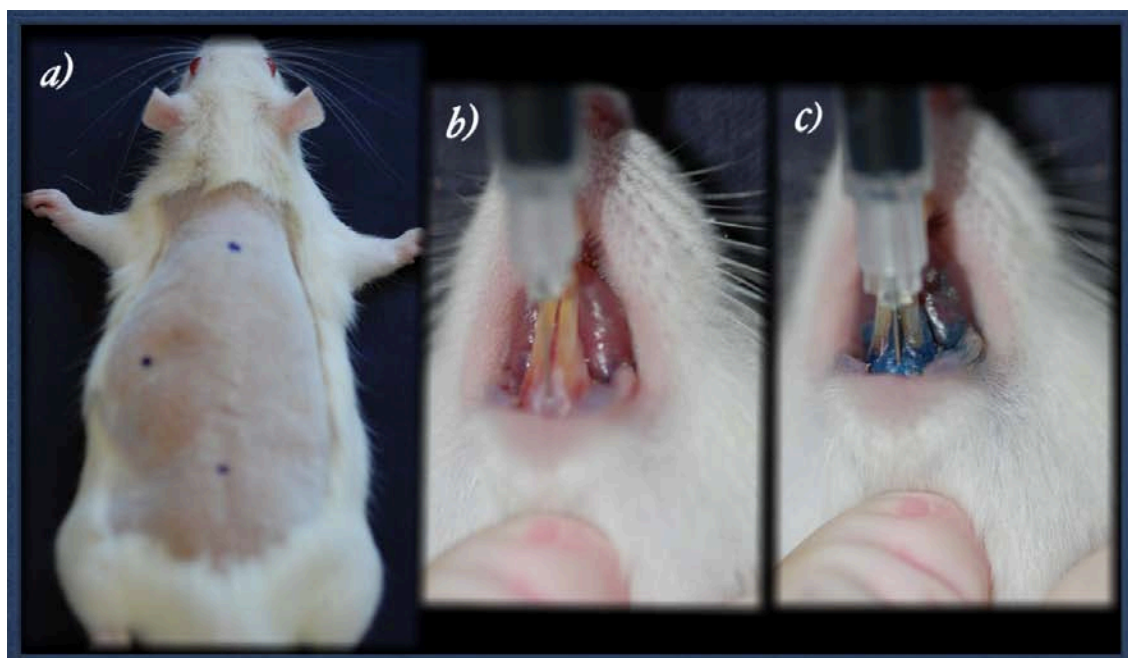


Figura 7. Método azul de Evans. *a)* Animal logo após procedimento anestésico e tricotomia. *b)* e *c)* Injeções de azul de Evans 2% administradas por via intravenosa, utilizando uma agulha de calibre 28-30, inserida cerca de 2 mm para dentro da veia gengival.

Para a análise de imagem, o software Image Pro Plus Versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, Bethesda, MD, EUA) foi utilizado. Estas imagens digitalizadas armazenados não foram melhoradas ou transformadas. Cada imagem foi calibrada individualmente com uma escala padrão em milímetros. A permeabilidade vascular foi avaliada através da medição da área de extravasamento de corante (mm^2). Três medições em cada local diferente experimental foram tomadas para cada animal e a média foi calculada. O

mesmo examinador realizou todas as medidas depois de testar a reprodutibilidade de dados.

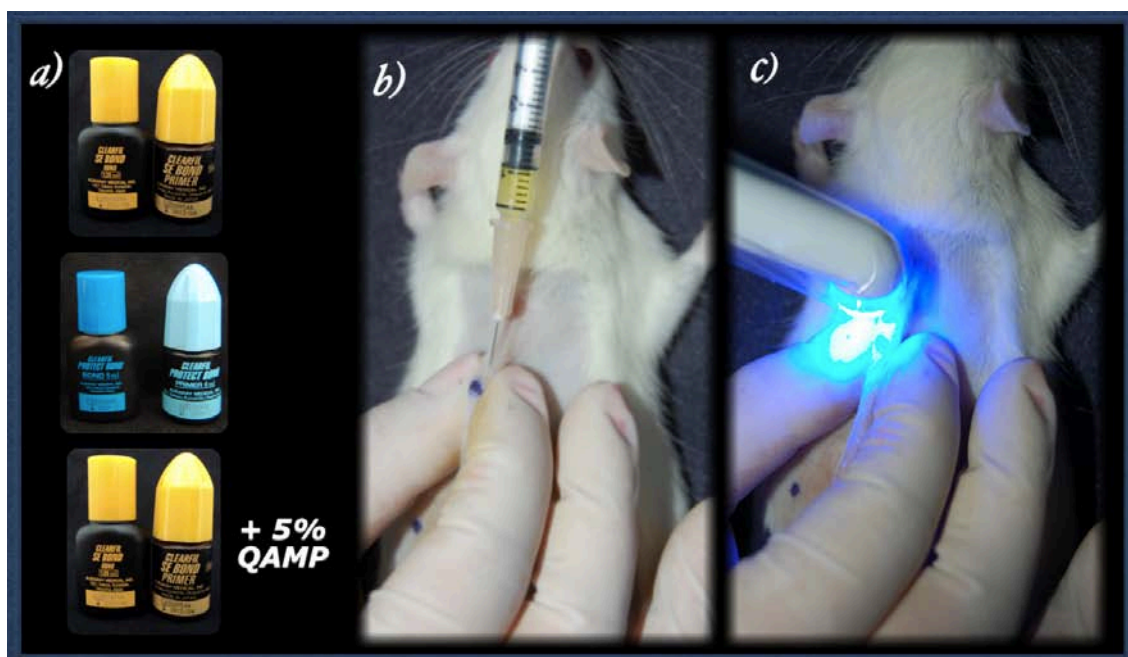


Figura 8. *a)* Sistemas adesivos em estudo. *b)* 0,1 mL de cada sistema adesivo foi injetado por via intradérmica em dois sítios experimentais (inferior e superior). *c)* Fotoativação com LED (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brasil) por 10s.

Além disso, cada sítio experimental de diâmetro 19.05 mm foi cortado em pequenos fragmentos e o corante azul de Evans foi extraído após imersão em 7 mL de formamida de grau de biologia molecular (99,9%) durante 72 horas a 37°C. Após centrifugação a 2.500 rpm durante 10 min e filtração através de lã de vidro, 200 µL de cada amostra foi colocada em uma placa de 96 poços. A absorvância foi medida a 630 nm em um espectrofotômetro (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, EUA). A quantidade total de corante extraído de cada amostra foi calculada utilizando uma curva padrão de análise dentro de um intervalo de 1 a 20 µg/mL.

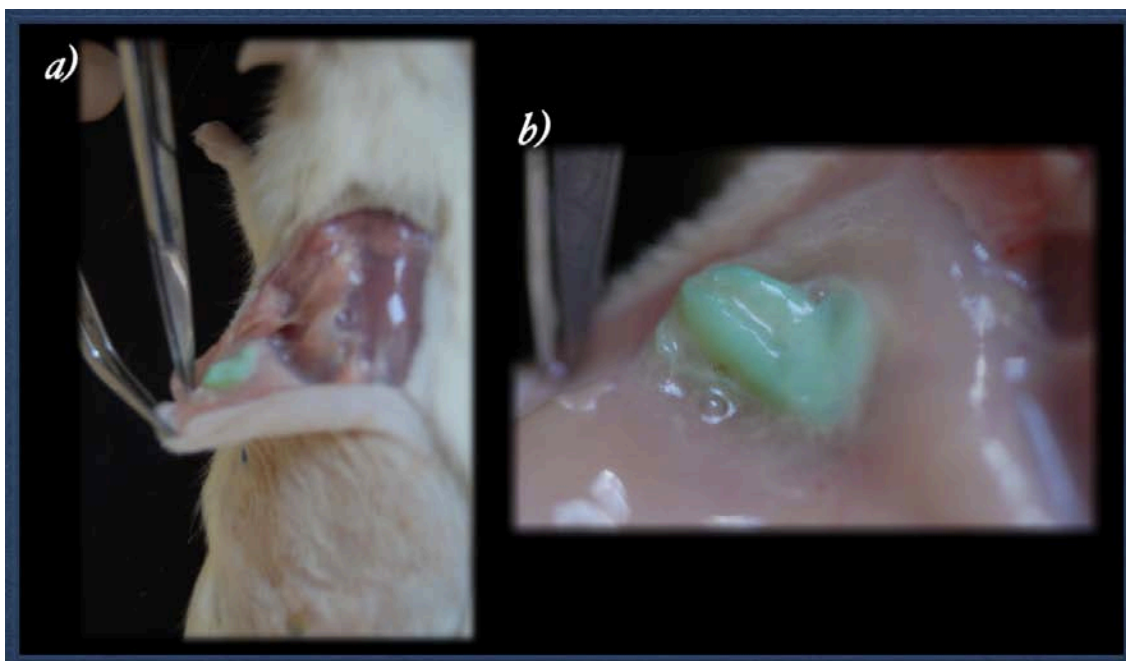


Figura 9. *a)* Após a sacrifício no tempo determinado, dissecação para retirada da pele dorsal. *b)* Vista aproximada da região do infiltrado inflamatório, com coloração azul referente ao corante azul de Evans.

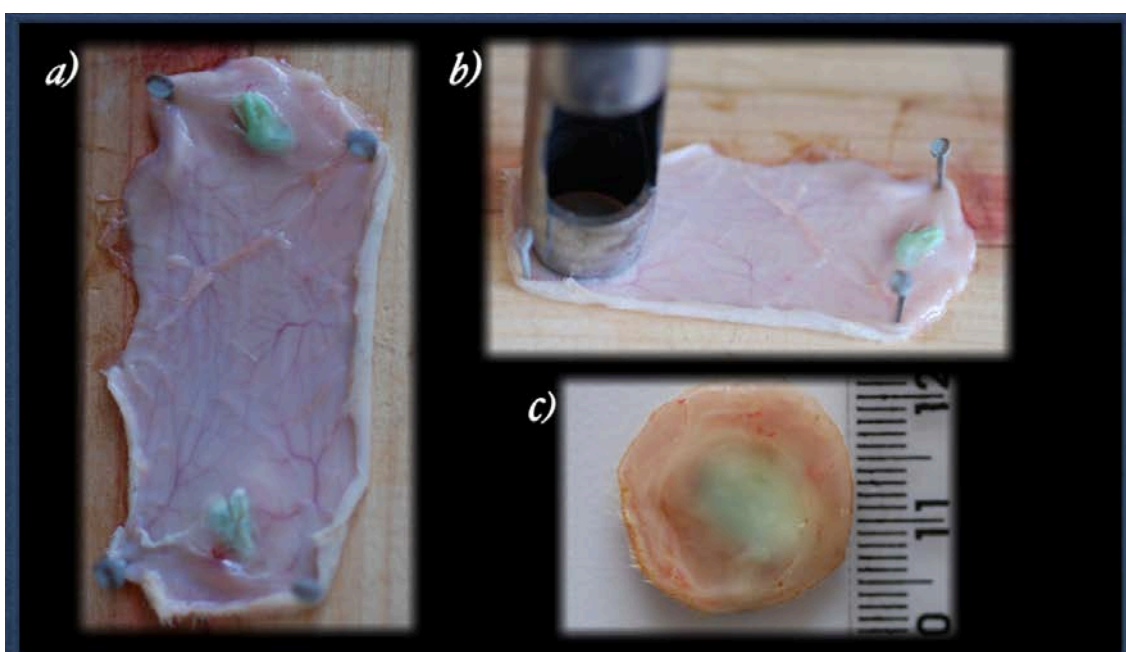


Figura 10. *a)* A pele dorsal dissecada, retirada e fixada em uma superfície para obtenção dos sítios experimentais. *b)* Utilização de um vazador de couro para obtenção das peças de forma padronizada. *c)* Uma das peças para exemplificar padrão de imagem de análise da área no software Image Pro Plus.

Análise estatística

Considerando a área de extravasamento do corante, a reprodutibilidade intra-examinador foi analisada pelo teste de Bland-Altman e pelo coeficiente de correlação intraclass. A normalidade da distribuição dos dados foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para o método do azul de Evans, as comparações entre os grupos foram testados por ANOVA com pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em $\alpha=5\%$ ($p<0,05$). As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

3.7.2. Fluxometria Laser-Doppler. Após o procedimento de anestesia, o fluxo sanguíneo foi medido nos mesmos locais experimentais descritos anteriormente, como um valor basal de microcirculação cutânea com o aparelho laser-Doppler (Moor LDI, Moor Instruments, mAxminster, UK) que consistia de um sistema de emissão de laser vermelho de hélio-neônio de baixa intensidade, operando com um comprimento de onda de 633 nm. Cada adesivo foi injetado por via intradérmica e fotopolimerizado como descrito anteriormente. A permeabilidade vascular foi avaliada após 3 e 6 horas, medindo o fluxo de sangue e o conteúdo de eritrócitos. Resumidamente, a sonda PH1-V2 foi fixada na pele dorsal dos animais usando uma fita adesiva dupla (Figura 11). Três medições de 30 segundos de duração foram realizadas em cada local experimental, para investigar o fluxo sanguíneo. Os dados experimentais foram analisados usando o software moorVMS-LDF™, obtendo-se os valores expressos como fluxo sanguíneo e concentração de células vermelhas do sangue que se deslocam (CMBC). Para executar as análises, demarcou-se cada um dos tempos de interesse (0 a 30 segundos) utilizando o ícone (ROI - região de interesse) e a partir desta delimitação o próprio software gera os dados estatísticos referente a média e desvio-padrão para esta área da leitura (Figura 12). Estes valores para cada uma das leituras foi utilizado para a análise estatística dos resultados, após a realização das médias das três medições realizadas.

Análise estatística

Dados obtidos da fluxometria por Laser-Doppler foram testados por ANOVA de dois critérios com o pós-teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em $\alpha=5\%$ ($p<0,05$). As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism™ 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA).

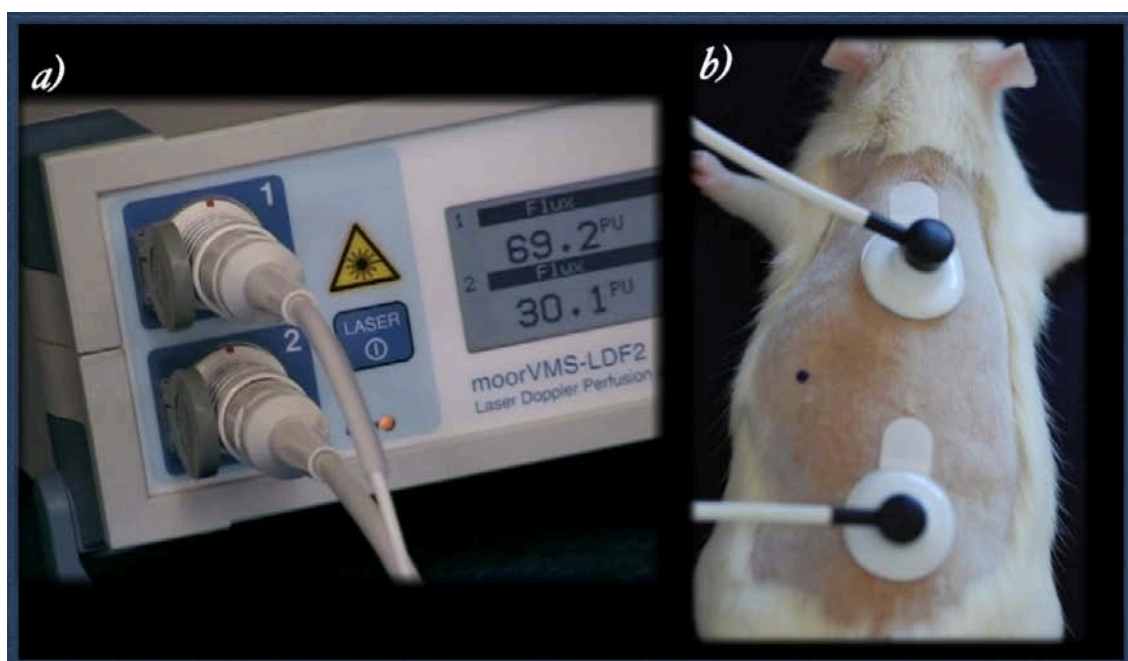


Figura 11. a) Laser-Doppler (Moor LDI, Moor Instruments, mAxminster, UK) com duas sondas acopladas. **b)** Sondas em posição no animal para obtenção dos valores de unidade de perfusão e da concentração de células vermelhas do sangue.

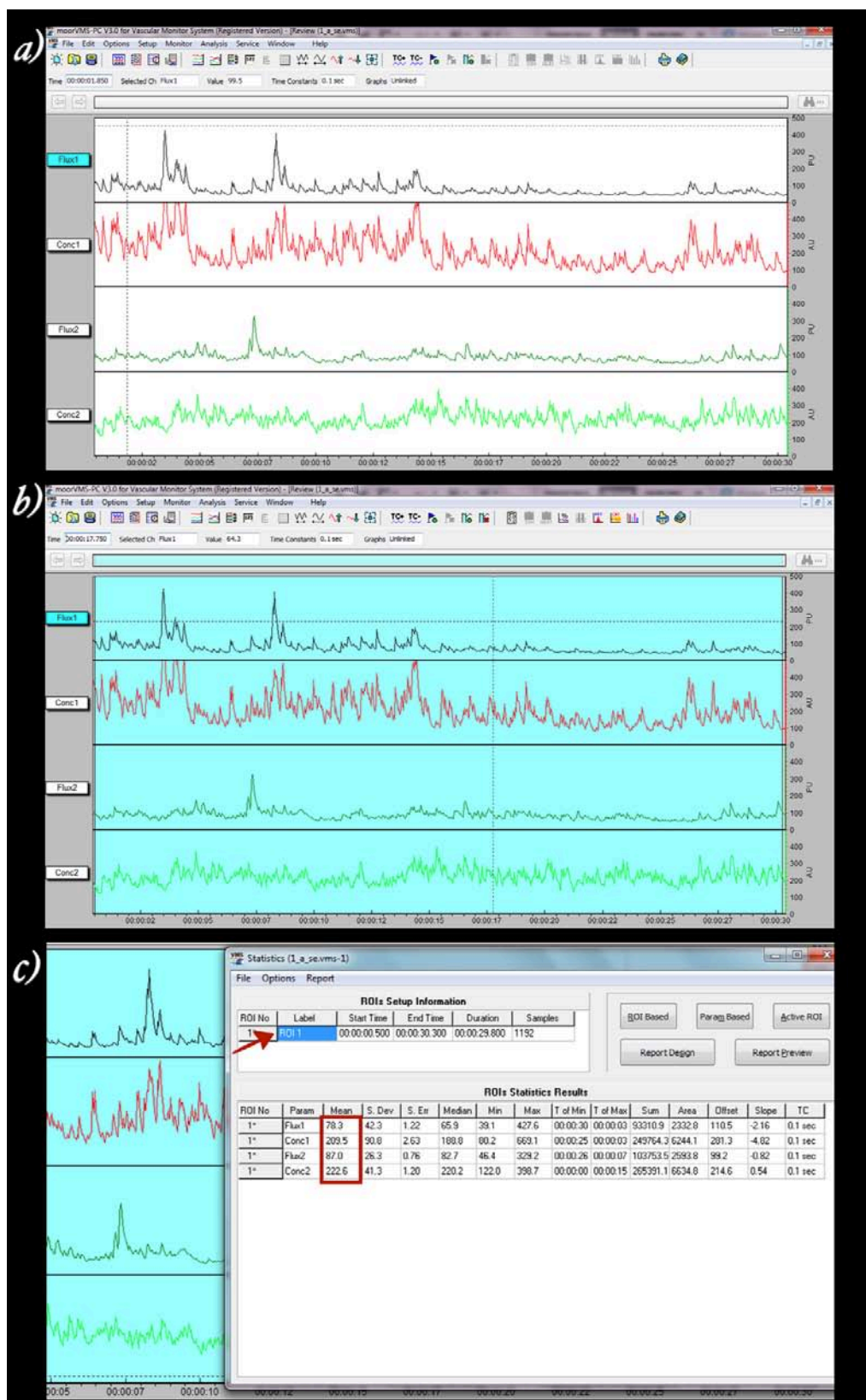


Figura 12. Dados fluxométricos obtidos no software moorVMS-LDF™. **a)** Fluxo e concentração para as sondas 1 e 2. **b)** Delimitação da região de interesse (ROI) de 0 a 30 segundos para cada leitura. **c)** Média fornecida pelo software moorVMS-LDF™ da região de interesse demarcada.

Material e métodos referente ao Capítulo 3

3.8. Avaliação da resistência de união à microtração e do grau de conversão de um sistema adesivo autocondicionante com incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] e na interface adesiva estabelecida por este sistema

3.8.1. Seleção e preparo dos dentes

Quarenta e dois terceiros molares humanos hígidos extraídos foram utilizados, sendo 30 preparados e restaurados para avaliação da resistência de união à microtração e 12 para a análise do grau de conversão na interface adesiva. Os dentes foram coletados após a obtenção do consentimento informado dos pacientes, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o protocolo número #17839/10. Os dentes foram desinfetados em cloramina a 0,5%, armazenados em água destilada e utilizados dentro de seis meses após extração. Uma superfície plana, da dentina superficial foi exposta após a remoção do esmalte oclusal com disco diamantado (Figura 13) e posteriormente utilizou-se lixa de carbeto de silício de granulação #180. Removeu-se o esmalte ao redor do dente com ponta diamantada cilíndrica #3216 em alta rotação (Figura 14a/b). As superfícies expostas de dentina foram polidas com lixa de carbeto de silício de granulação #600 úmida por 60 segundos para criar uma camada de esfregaço padronizada (Figura 14c).

3.8.2. Grupos experimentais e procedimentos restauradores.

Três sistemas adesivos autocondicionantes foram avaliados: Clearfil® SE Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japão) contendo QAMP 5%, Clearfil® Protect Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japão) e Clearfil® SE Bond (Kuraray Medical, Okayama, Japão) sem o QAMP (controle negativo) (Figura 15). Os sistemas adesivos foram aplicados sobre a dentina de acordo com as instruções dos seus fabricantes, em que o solvente foi cuidadosamente evaporado e polimerizados com LED por 10 s (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brasil) em 600 mW/cm². Depois da aplicação do adesivo, três incrementos de

1,0 mm de resina composta Filtek® Z350 XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foram inseridos e fotopolimerizados cada um durante 30 segundos. Todos os procedimentos de adesão foram realizados por um único operador, a uma temperatura ambiente de 24°C e umidade relativa constante.

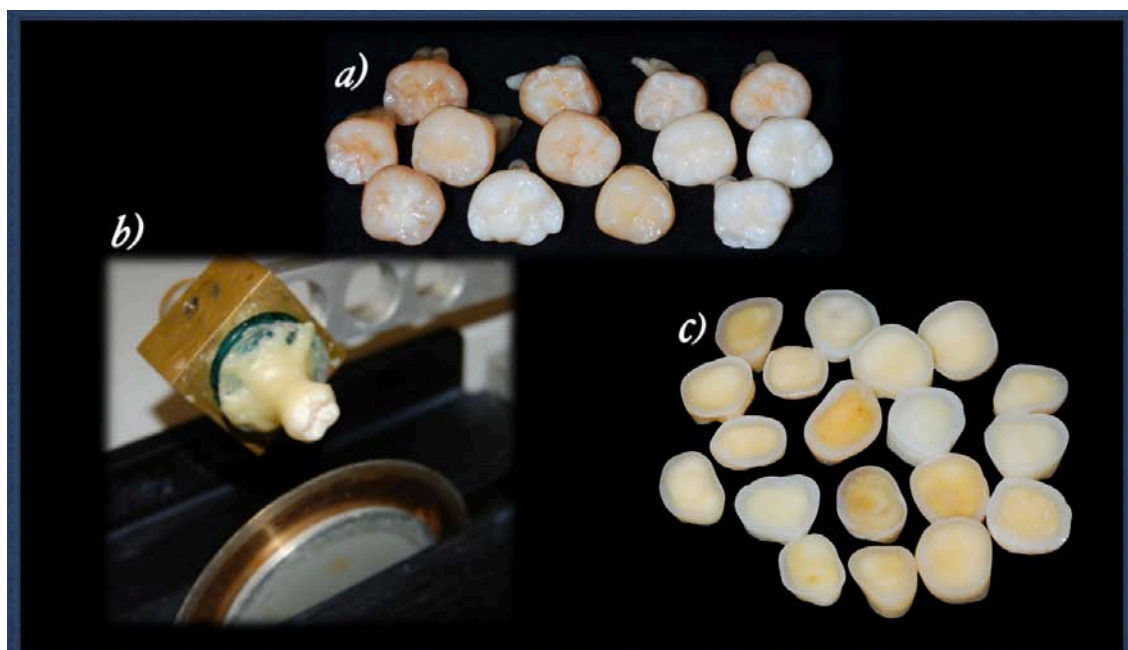


Figura 13. *a)* Terceiros molares hígidos. *b)* Corte da superfície oclusal. *c)* Dentes com a dentina exposta.

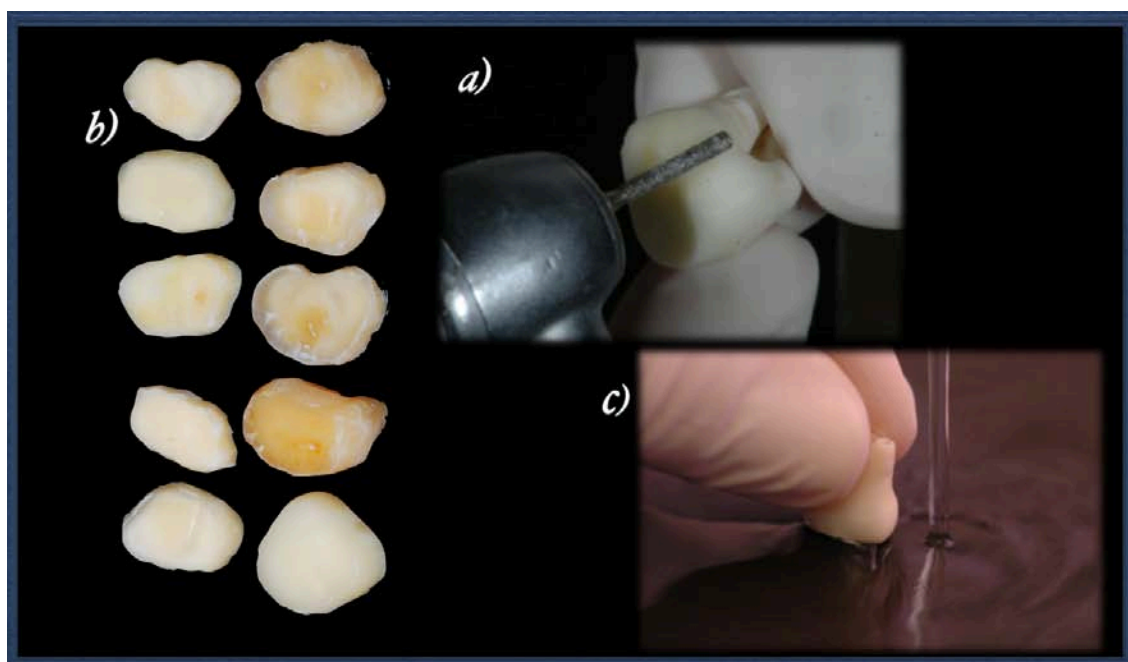


Figura 14. *a)* Remoção do esmalte ao redor do dente. *b)* Dentes sem esmalte ao redor. *c)* Superfície do dente preparada com lixas de granulação #180 e #600, padronizando a *smear layer*.

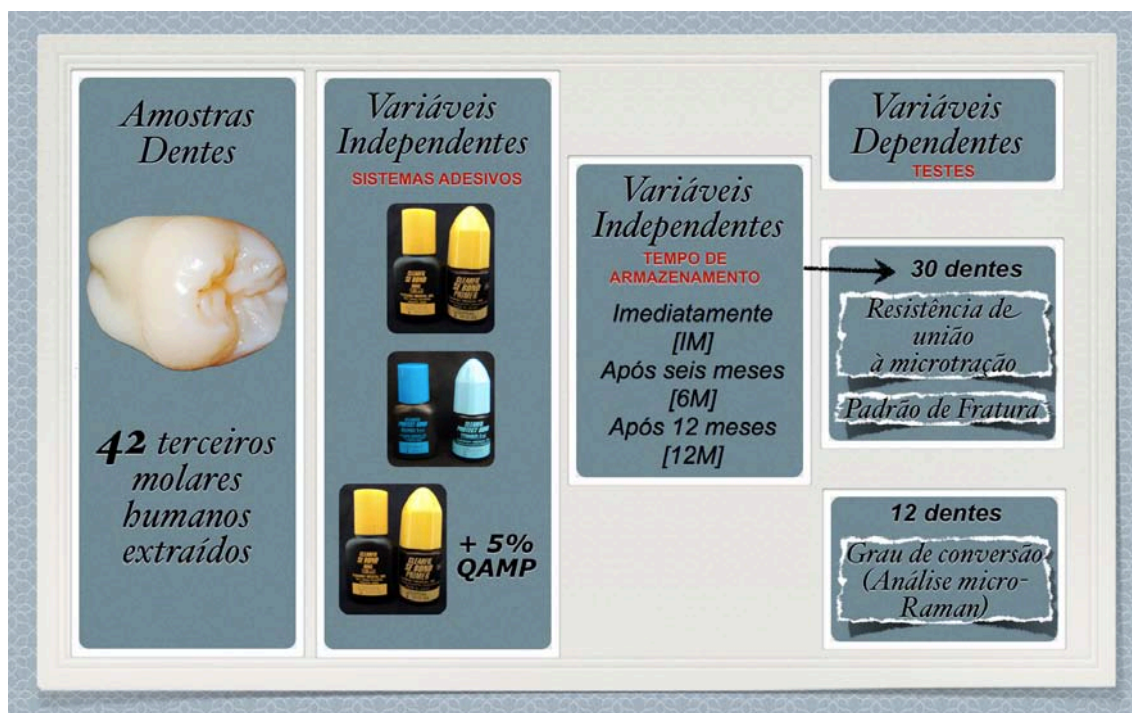


Figura 15. Esquema do desenho experimental da avaliação da resistência de união e grau de conversão *in situ* dos sistemas adesivos em estudo.

3.8.3. Teste de resistência de união à microtração na interface resina-dentina (μ TBS)

Após os 30 dentes ($n=10$) serem armazenados em água destilada por 24 horas a 37°C , foram fixados em suportes plásticos com cera pegajosa (Pasom, Brasil) (Figura 16a) e adaptados em um dispositivo “ad-hoc” para ser montado na máquina de cortes seriados (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) (Figura 17a). Os dentes foram longitudinalmente seccionados perpendicular a interface adesiva com um disco diamantado, com constante irrigação de água, a 300 rpm, para obter espécimes em forma de palitos, cada um com uma área de secção transversal de aproximadamente $0,8\text{ mm}^2$ (Figura 17b). O número de palitos perdidos prematuramente por dente durante a preparação de amostras foi considerado. A área da secção transversal de cada palito foi medida com um paquímetro digital com uma aproximação de $0,01\text{ mm}$ para o cálculo dos valores de resistência de união. Os palitos de cada dente foram aleatoriamente separados para serem testados imediatamente [IM], após seis [6M] e 12 meses [12M] de armazenagem em água destilada contendo $0,4\%$ de azida de sódio a 37°C . A solução de armazenamento não foi trocada [Kitasako *et al.*³⁸ 2000].

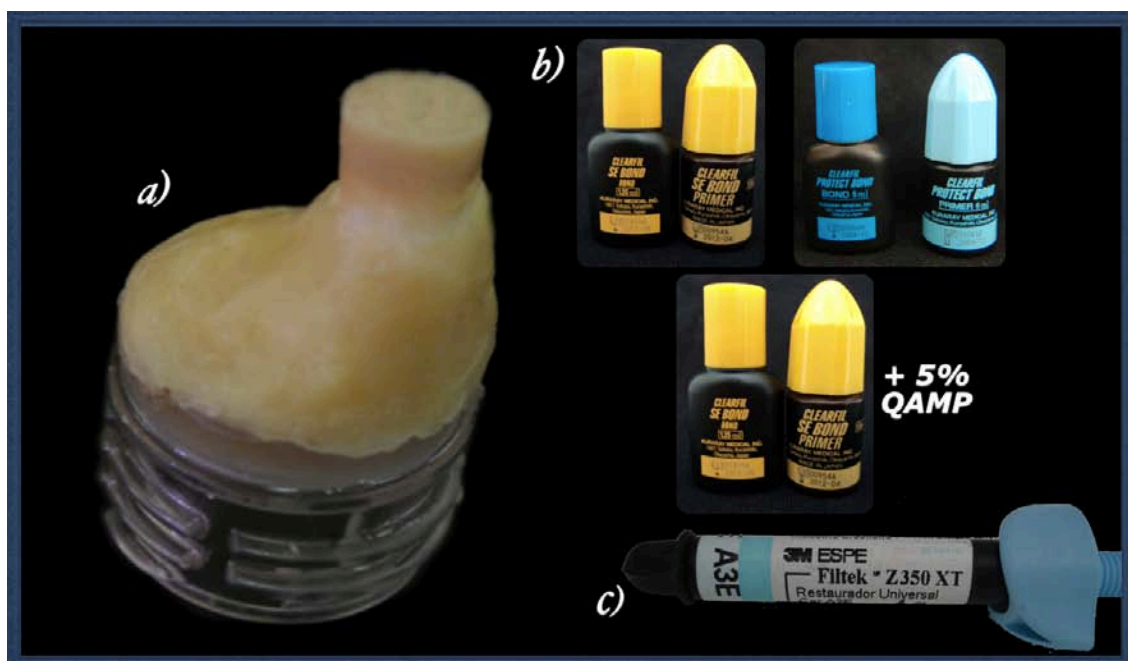


Figura 16. *a)* Após realização dos procedimentos adesivos e restauração com resina composta, o dente foi fixado em suporte plástico com cera pegajosa. *b)* Sistemas adesivos em estudo. *c)* Resina composta Filtek® Z350 XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA).

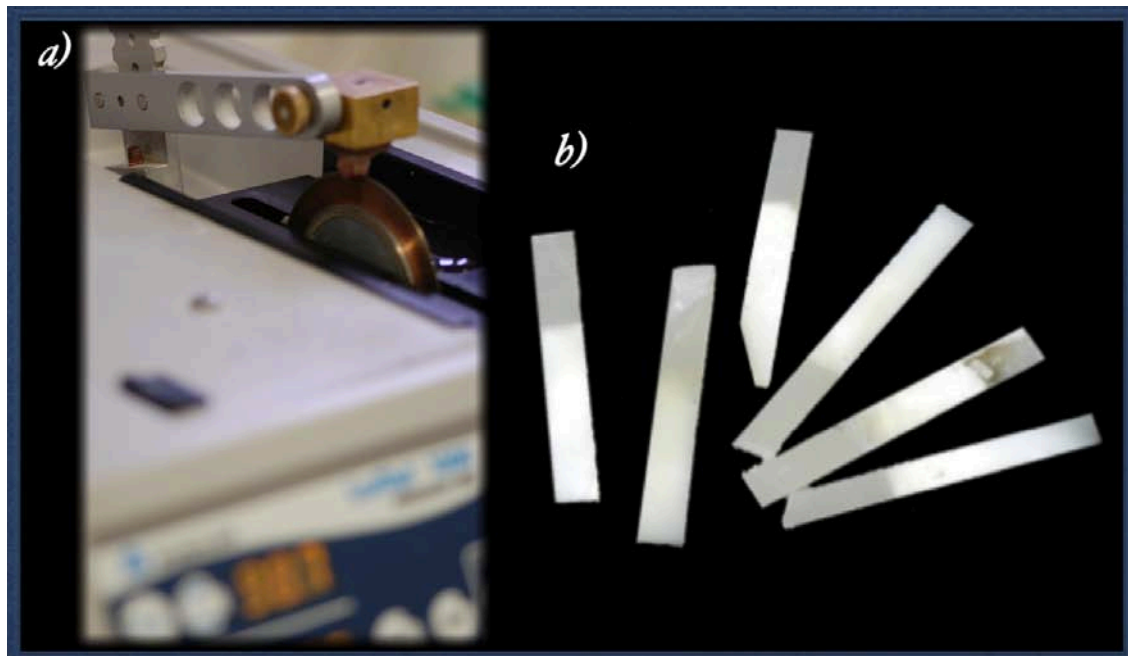


Figura 17. *a)* Realização dos cortes para obtenção dos espécimes *b)* Espécimes em forma de palitos.

Após decorrido cada período de armazenamento, os palitos separados eram fixados ao dispositivo para o teste de resistência de união à microtração com auxílio de uma cola a base de cianocrilato (Super Bonder Gel, Loctite Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) (Figura 18b). Cada palito foi submetido à fratura utilizando uma máquina de ensaios universal (Kratos Dinamometros, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 0,5 mm/min (Figura 18a). Padrões de fratura foram avaliados em luz sob um estereomicroscópio (Nikon Eclipse E200, Melville, NY, EUA) com aumento de 40X e classificados como coesiva (falha exclusiva dentro da dentina ou compósito, C), adesiva (falha na interface resina/dentina, A), ou adesiva/mista (falha na interface resina/dentina que incluiu os substratos vizinhos, A/M). Apenas modos de fratura adesivas ou mistas foram considerados para análise estatística.

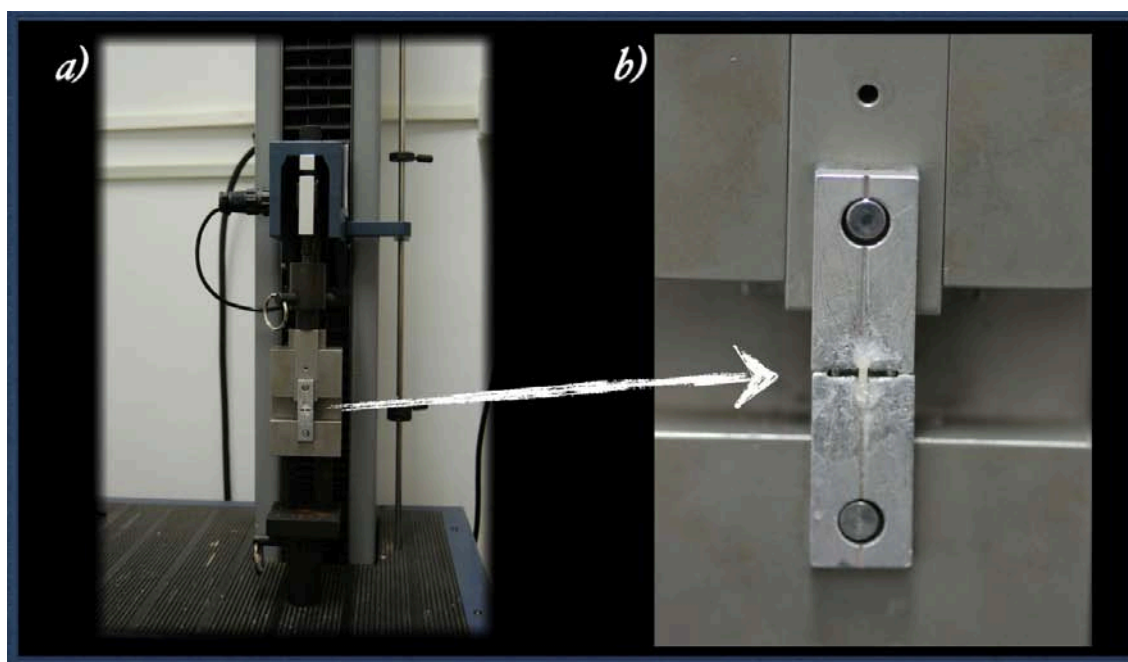


Figura 18. a) Máquina de ensaios universal (Kratos Dinamometros, São Paulo, SP, Brasil). **b)** Palito fixado ao dispositivo o para teste de microtração.

A média da resistência de união de todos os palitos do mesmo dente foi utilizada para fins estatísticos. Os espécimes prematuramente descolados foram incluídos na média de cada dente, considerando uma resistência de união de 5 MPa. A resistência adesiva média para cada grupo teste foi expressa como a média dentes usados por grupo. Os dados de resistência à

microtração de cada sistema adesivo foram submetidos à ANOVA de dois-fatores (sistema adesivo e do período de armazenamento) e pós-teste de Games Howell ($\alpha=0,05$) para comparações de pares. O software estatístico SPSS, versão 20.0 (SPSS Statistics, IBM Corporation, Somers, NY, EUA), foi utilizado para realizar as análises estatísticas deste estudo.

3.8.4. *Análise do grau de conversão in situ*

O preparo e restauração dos 12 dentes terceiros molares ($n=4$) para a espectroscopia de micro-Raman foi realizada como descrito no teste de resistência adesiva. Após armazenar os dentes restaurados em água destilada durante 24 horas a 37°C, foram seccionados longitudinalmente no sentido méso-distal em toda a interface adesiva utilizando um disco diamantado, em uma máquina de cortes seriados Isomet 1000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob constante irrigação com água a 300 rpm para se obter fatias de 2,0 mm de resina-dentina. Duas fatias do centro de cada dente foram selecionados para análise de micro-Raman.

3.8.4.1. *Espectroscopia micro-Raman da interface resina-dentina*

As fatias de resina-dentina ($n=8$ para cada condição experimental) foram individualmente e manualmente polidas com lixas de carbetto de silício impermeáveis de decrescente abrasividade (1000, 1200, 1500 e 2000). Os espécimes foram limpos ultrassonicamente durante 10 min e em seguida armazenados em água por 24 horas a 37°C antes da realização das leituras do grau de conversão.

A análise do grau de conversão da interface adesiva foi realizada *in situ* à temperatura ambiente utilizando um espectrofotômetro de Raman (BrukerOptikGmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany) com um laser de Nd:YAG (neodímio:ítrio-alumínio-granada), com 532 nm de comprimento de onda a 20 mW de potência (Figura 19a). Análises foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros experimentais: dispositivo CCD resfriado a 208 K, resolução espacial de ≈ 3 mm, resolução espectral ≈ 5 cm^{-1} , a potência sobre a amostra de 2 mW; intervalo de verificação de 1750-280 cm^{-1} , tempo de

acumulação de 30 s e 6 co-adições, em magnificação de 100 x (Olympus UK, Londres, UK) (Figura 19b), para um laser de $\approx 1 \mu\text{m}$ de diâmetro [Hass *et al.*³⁹ 2012]. Os espectros foram obtidos da interface adesiva em sítios aleatórios da camada híbrida formada entre os túbulos dentinários, sendo obtida uma imagem digital antes da realização das leituras (Figura 19c). Duas regiões foram analisadas para cada fatia de resina-dentina.

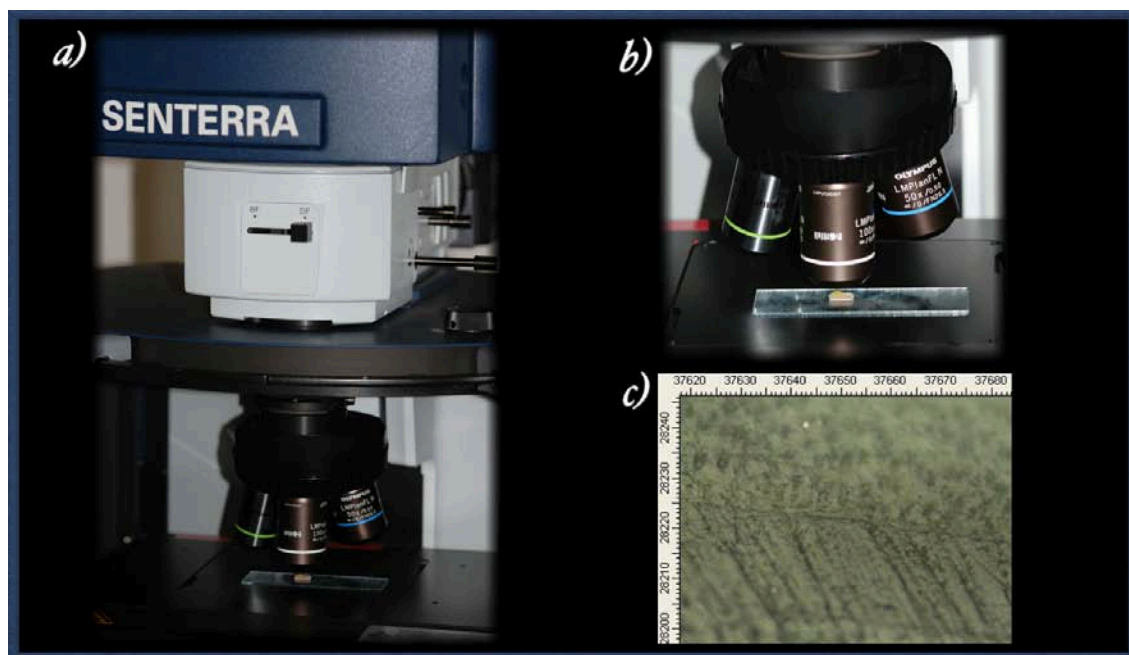


Figura 19. Espectroscopia micro-Raman da interface adesiva. **a)** Espectrofotômetro de Raman (BrukerOptikGmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany). **b)** Fatia posicionada para visualização em magnificação de 100 x. **c)** Fotomicrografia da região intertubular em análise.

Os espectros de Raman de adesivos não polimerizados foram obtidos para identificar as bandas de referência para cada sistema adesivo. As análises foram realizadas três vezes, com amostras diferentes, para cada sistema adesivo autocondicionante. O software Opus Spectroscopy (versão 6.5, BrukerOptikGmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha) foi utilizado para determinação dos valores das áreas integradas das bandas registradas. A proporção de ligações dupla do monômero convertidas em polímero de cada sistema adesivo foi calculada utilizando a relação entre a intensidade das bandas de reação (polimerizados) e de referência (não polimerizados) como segue:

$$\% \text{ convers\~ao} = 1 - \left\{ \frac{R_{\text{(polimerizado)}}}{R_{\text{(n\~ao polimerizado)}}} \right\} \times 100\%$$

onde "R" é a razão entre a intensidade das bandas dos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em 1639 cm⁻¹ e 1609 cm⁻¹ em sistemas adesivos polimerizados e não-polimerizados. Como os valores tinham distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnof), os valores de DC foram analisados com ANOVA de um fator e pós-teste de Tukey. A significância estatística foi estabelecida em p<0,05.

3.9. Espectroscopia Micro-Raman do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] e matérias-primas [Eudragit® E100 e brometo de n-octila]

Os espectros de QAMP e matérias-primas foram obtidos em temperatura ambiente utilizando um espectrofotômetro de Raman (BrukerOptikGmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany) com um laser de Nd:YAG (neodímio:ítrio-alumínio-granada), com 532 nm de comprimento de onda a 20 mW de potência (Figura 20). Os parâmetros experimentais utilizados foram: dispositivo CCD resfriado a 208 K, a resolução espectral de 3-5 cm⁻¹, a potência sobre a amostra de 2 mW; intervalo de verificação de 4000-200 cm⁻¹; tempo de acumulação de 20 s e 6 co-adições em magnificação de 100X. Software Opus Spectroscopy (versão 6.0) foi usado para processar os dados coletados.

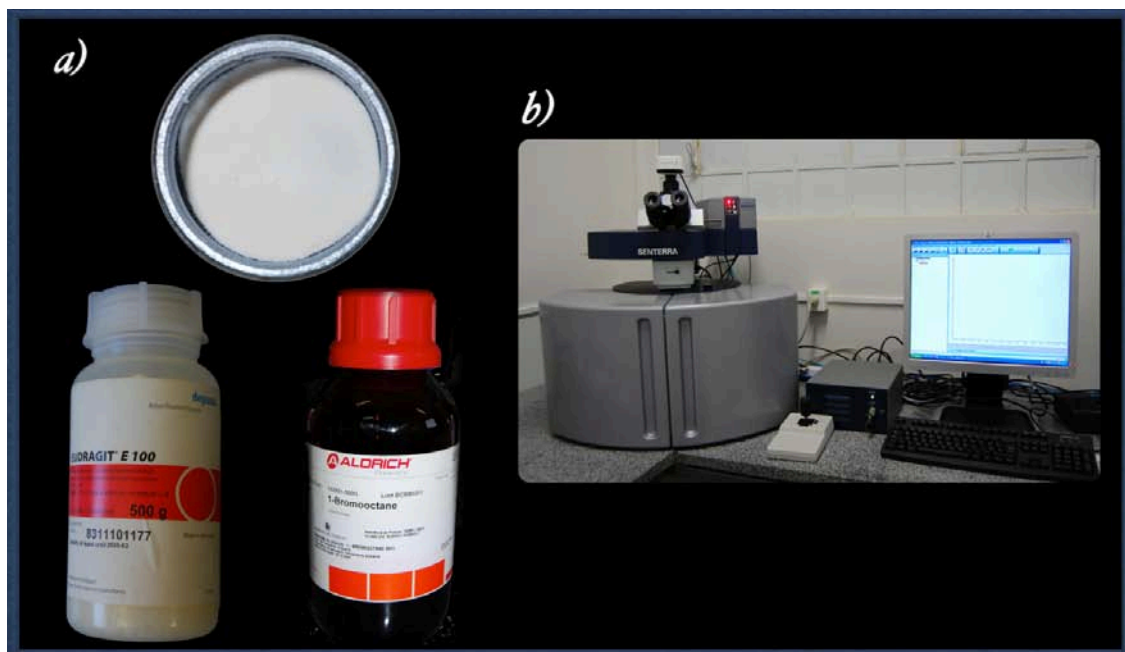


Figura 20. Espectroscopia micro-Raman do produto [QAMP] e matérias-primas. **a)** QAMP, Eudragit® E100 e brometo de *n*-octila. **b)** Espectrofotômetro de Raman (BrukerOptikGmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany).

3.10. Análise do grau de conversão dos sistemas adesivos *in vitro*

O grau de conversão foi analisado por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) (Spectrum 100, PerkinElmer, Shelton, EUA), a 24°C sob 64% de umidade relativa. Os sistemas adesivos autocondicionantes avaliados foram: Clearfil® SE Bond contendo 5% de QAMP, Clearfil® Protect Bond e Clearfil® SE Bond sem QAMP (controle negativo). Para obter os dados de grau de conversão de cada sistema adesivo, três amostras foram feitas dos sistemas adesivos não-polimerizados e cinco amostras dos sistemas adesivos polimerizados. Uma gota de cada sistema adesivo ($n=3$) foi aplicada sobre um acessório de cristal para reflexão total atenuada de seleneto de zinco (ZnSe) (PerkinElmer) e ângulo de incidência de 45°, para os espectros de absorção de sistemas adesivos não-polimerizados. Para o preparo de amostras dos sistemas adesivos polimerizados ($n=5$): uma lâmina de polipropileno de 3 cm² foi colocada sobre uma superfície plana, uma gota de adesivo foi colocada em cada lâmina, uma outra lâmina de 2 cm² foi colocada em cima da gota; polimerização foi realizada por 10 segundos, com um aparelho

fotopolimerizador LED (Radii-cal, SDI, São Paulo, Brasil; irradiância de 600 mW/cm^2). Para obtenção dos espectros, a película de adesivo polimerizada foi retirada das lâminas, colocada no centro do cristal para reflectância total atenuada e a partir do software do equipamento regulada a força aplicada no dispositivo pressionado na superfície da amostra. Após cada ajuste, iniciou-se a leitura, anotando-se os valores obtidos nas bandas correspondentes.

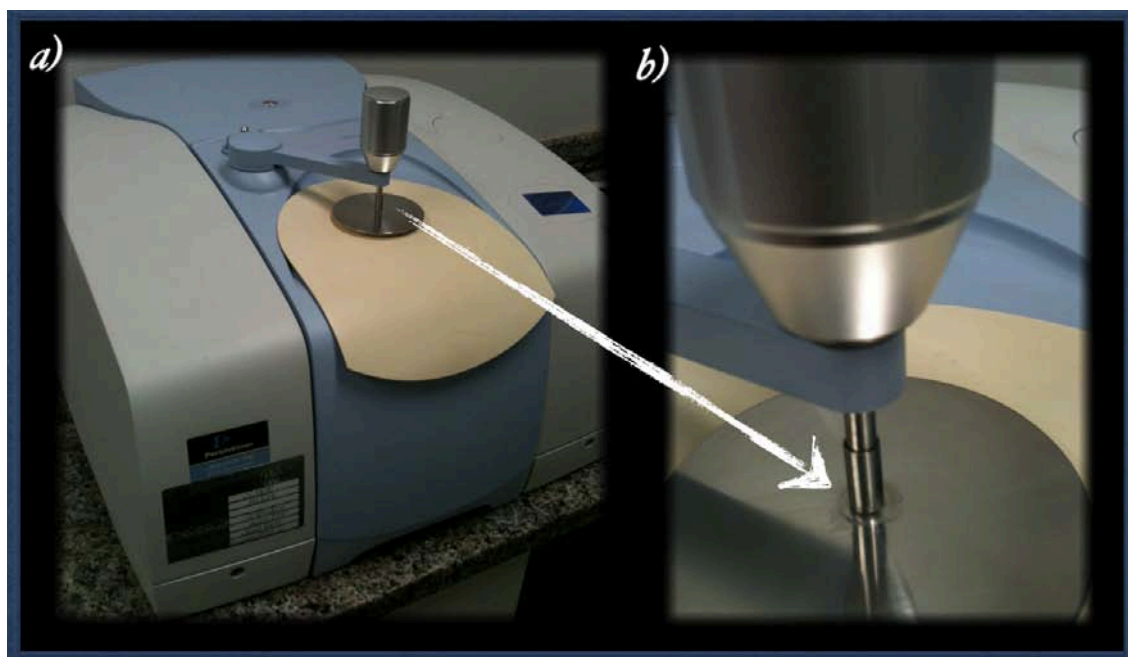


Figura 21. a) Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (Spectrum 100, PerkinElmer, Shelton, EUA). **b)** Amostra de sistema adesivo fotopolimerizado no centro do cristal para reflectância total atenuada.

Os espectros de absorção dos sistemas adesivos não-polimerizados e resinas polimerizadas adesivas foram obtidos na região entre 4000 e 650 cm^{-1} , com 32 varreduras de 4 cm^{-1} . Como referência, as bandas do grupo de $\text{C}=\text{C}$ metacrilato em 1639 cm^{-1} e o $\text{C}-\text{C}$ de anel aromático em 1609 cm^{-1} foram determinadas. A grau de conversão (%) foi calculado usando a equação utilizada na seção 3.8.4.1. Os dados foram analisados por meio da análise de variância de um fator e pós-teste de Tukey ($\alpha=0,05$). O software estatístico SPSS, versão 20.0 (SPSS Statistics, IBM Corporation, Somers, NY, EUA), foi utilizado para realizar as análises estatísticas deste estudo.

Material e métodos referente ao Capítulo 4

3.11. Efeito dos sistemas adesivos em estudo sobre as propriedades mecânicas, dureza e módulo de elasticidade, da interface resina-dentina, após métodos artificiais de indução de lesões cariosas

3.11.1. Seleção dos dentes, procedimentos restauradores e preparo para serem submetidos aos métodos de indução de lesão de cárie artificial.

Vinte e quatro terceiros molares humanos hígidos extraídos foram utilizados. Os dentes foram coletadas após a obtenção do consentimento informado dos pacientes, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob o protocolo número #17839/10. Os dentes foram desinfetados em cloramina a 0,5%, armazenados em água destilada e utilizados dentro de seis meses após a extração. Os sistemas adesivos autocondicionantes avaliados foram: Clearfil® SE Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japão) contendo QAMP 5%, Clearfil® Protect Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japão) e Clearfil® SE Bond (Kuraray Medical, Okayama, Japão) sem o QAMP (controle negativo). As amostras foram divididos em 6 grupos experimentais (n=4), sendo os fatores em estudo sistema adesivo e o método de indução de lesões de cárie (ciclagem de pH e solução de cárie microbiológica) (Figura 22).

A dentina superficial dos terceiros molares foi exposta após a remoção do esmalte oclusal com lixa de carbeto de silício de granulação #180. A seguir estas superfícies foram polidas em lixa de carbeto de silício úmida de granulação #600 por 60 s para criar uma camada de esfregaço padronizada. Os sistemas adesivos foram aplicados sobre a dentina de acordo com as instruções dos seus fabricantes, em que o solvente foi então cuidadosamente evaporado e polimerizados com LED por 10 segundos (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brasil) em 600 mW/cm². Após aplicação do sistema adesivo, três incrementos de 1,0 mm de resina composta Filtek® Z350XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foram inseridos e fotopolimerizados cada um por 30 segundos.

A superfície dos molares restaurados com os sistemas adesivos em estudo foi coberta com uma camada de resina epóxi (Araldite, Brascola Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil) e uma camada de verniz de unhas (Colorama Maybelline Ltda, São Paulo, Brasil), com exceção da região correspondente à interface adesiva. A seguir, estes molares de cada grupo experimental foram artificialmente desmineralizados pelos métodos de ciclagem de pH ou solução de cárie microbiológica e submetidos ao teste de nanoindentação na interface resina-dentina.



Figura 22. Esquema do desenho experimental do ensaio de nanoindentação.

3.11.2. Indução de lesão de cárie artificial por ciclagem de pH.

As lesões de cárie artificiais em dentina foram estabelecidas por um processo de ciclagem de pH (Figura 23), anteriormente descrito por Featherstone *et al.*⁴⁰ (1986). A **solução desmineralizante** foi preparada utilizando 2,2 mmol/L de CaCl_2 , 2,2 mmol/L NaH_2PO_4 e 75 mmol/L de ácido acético ajustado em pH de 4,3, contendo 0,02% de NaN_3 como conservante. A **solução remineralizante** foi obtida utilizando 1,5 mmol/L de CaCl_2 , 0,9 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 mmol/L de tampão tris, 0.15 mol/L de KCl e ajustada em pH de

7,0, contendo 0,02% de NaN_3 . Os dentes foram mantidos imersos em 5,0 mL de cada solução do sistema de ciclagem de pH em recipientes individuais fechados, permanecendo 8 horas em solução desmineralizante e 14 horas em solução remineralizante. Este procedimento foi realizado durante 14 dias sem agitação a 37°C.

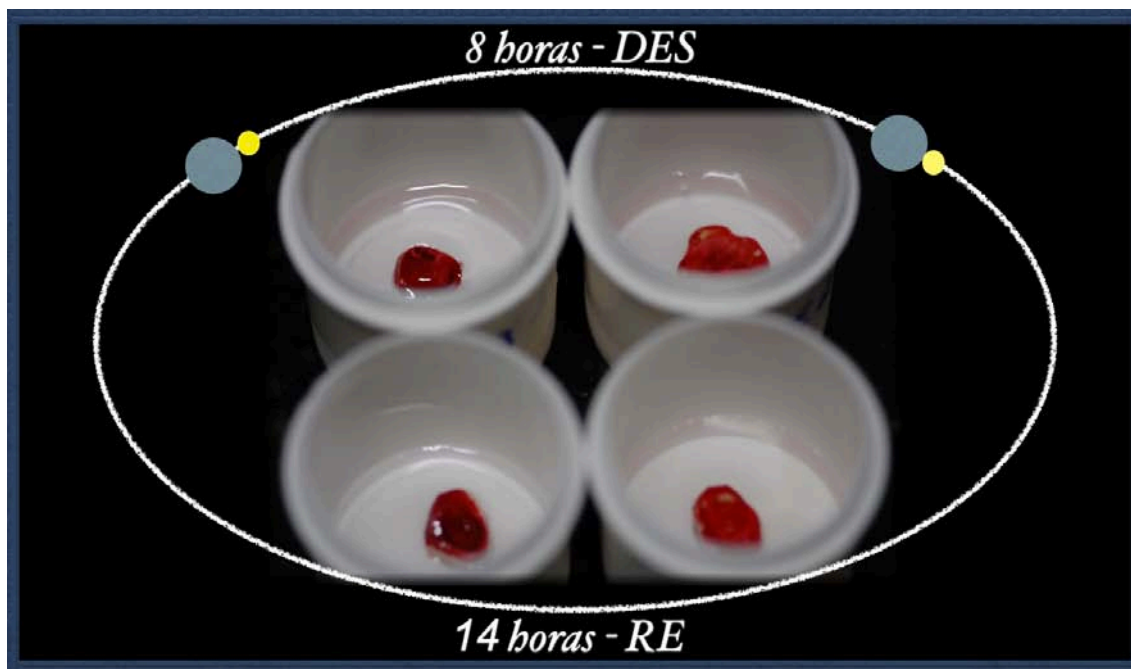


Figura 23. Indução de lesão de cárie artificial por ciclagem de pH: dentes imersos em 5,0 mL de cada solução do sistema de ciclagem de pH, mantendo-se 8 horas em solução desmineralizante e 14 horas em solução remineralizante.

3.11.3. Indução de lesão de cárie microbiológica.

Os dentes preparados foram colocados em tubos de ensaio esterilizados contendo 25 mL da solução de cárie artificial previamente preparada (Figura 24). A solução continha 3,7 g de ágar infusão de cérebro e coração (BHI) suplementado com 0,5 g de extrato de levedura, 2,0 g de sacarose, 1,0 g de glucose em 100 mL de água destilada e 100 mL de cultura jovem primária de *Streptococcus mutans* ATCC25175, com o pH em torno de 4,0. Os tubos em condições de microaerofilia foram incubados a 37°C (Figura 26). A cada 48 horas, removeu-se 20 mL da solução de cada tubo, mantendo-se 5 mL e acrescentou-se 20 mL de um caldo novo (Figura 25) acondicionado em geladeira. Após 14 dias, as amostras foram lavadas abundantemente em água deionizada. Esta metodologia seguiu o estudo de Marquezan *et al.*⁴¹ (2009).

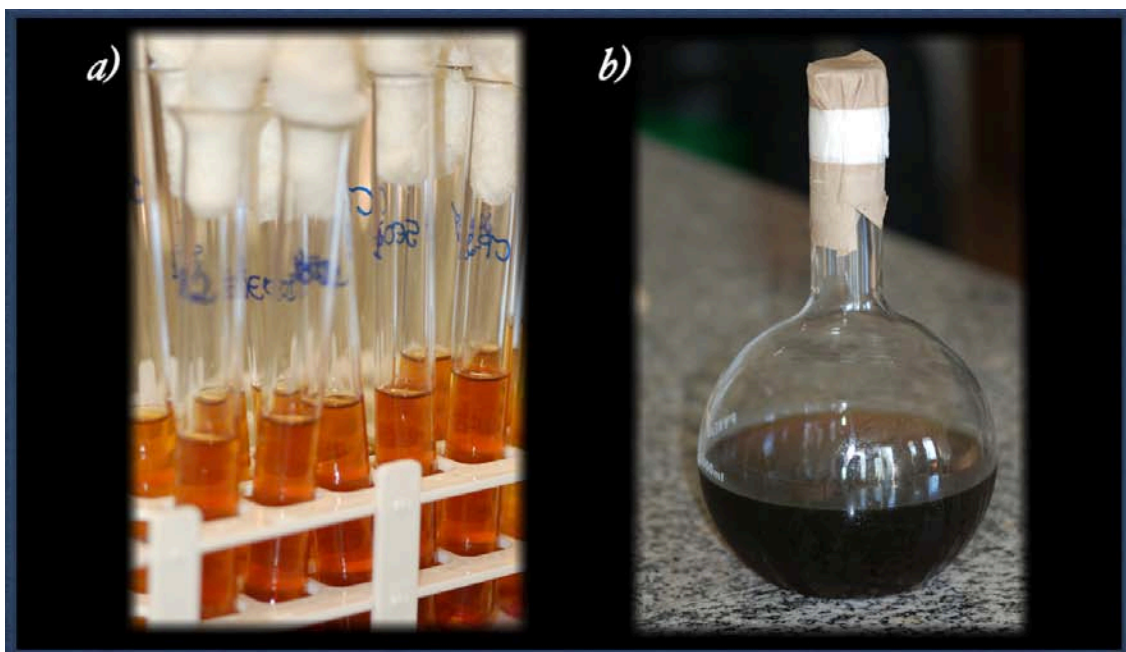


Figura 24. *Indução de lesão de cárie microbiológica. a)* Tubos de ensaio contendo uma solução de cárie artificial e os dentes restaurados com os sistemas adesivos em estudo. *b)* Caldo da solução de cárie artificial para troca a cada 48 horas.

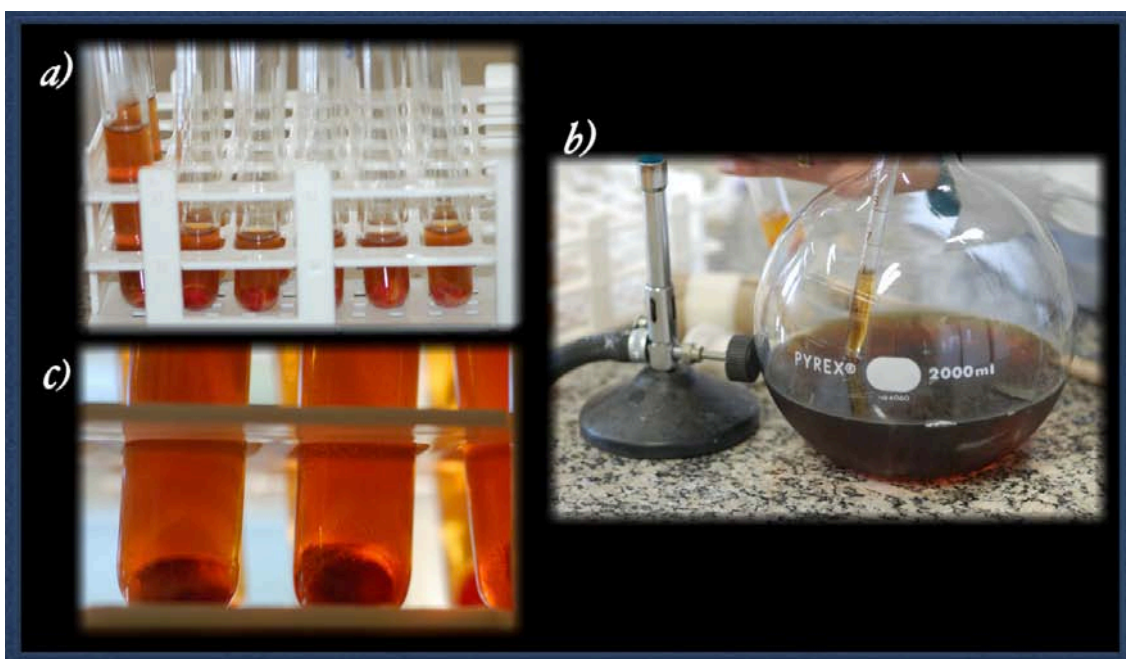


Figura 25. *a)* Tubos de ensaio mantendo 5 mL da solução de cárie artificial e os dentes. *b)* Troca do caldo a cada 48 horas ao lado do bico de Bunsen. *c)* Tubos com os dentes em condição de microaerofilia para crescimento do *S. mutans*.

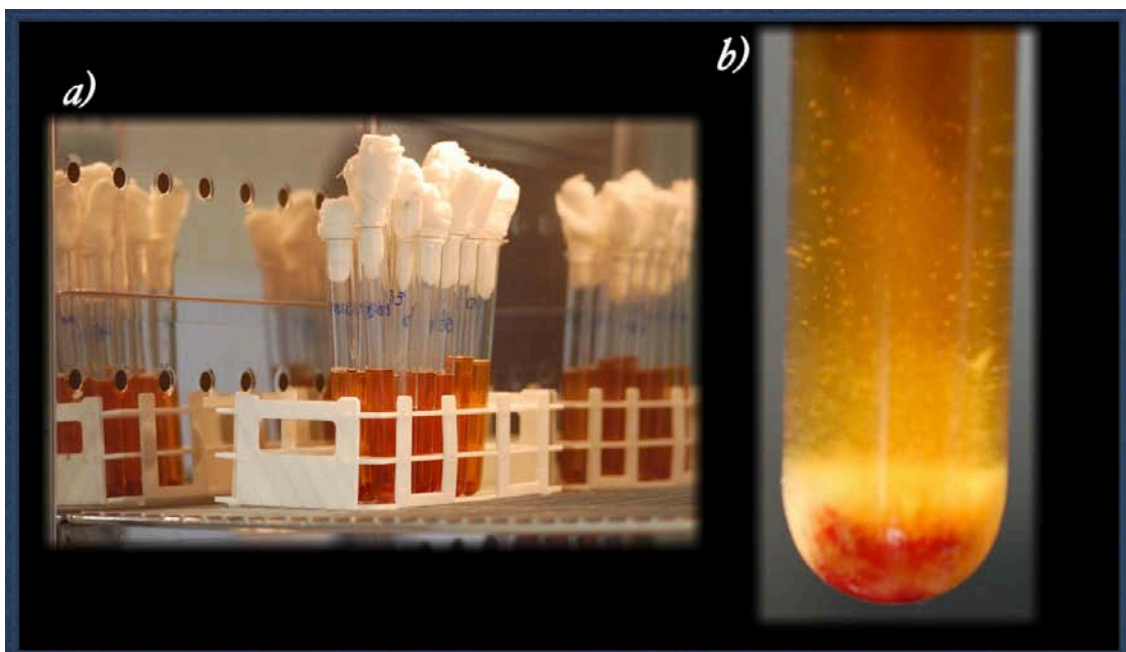


Figura 26. **a)** Tubos de ensaio incubados a 37°C. **b)** Tubo com película adquirida ao redor do dente, representando o intenso crescimento bacteriano.

3.10.4. Avaliação da dureza e módulo de elasticidade.

Os dentes restaurados e submetidos aos métodos de indução de lesões de cariosas em água destilada foram armazenados durante 24 horas a 37°C e então seccionados longitudinalmente no sentido mésio-distal em toda a interface utilizando um disco diamantado, em uma máquina de cortes seriados Isomet 1000 (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob constante irrigação com água, a 300 rpm, para se obter fatias com espessura de aproximadamente 1,0 mm (Figura 27). Duas fatias do centro de cada dente foram selecionadas para a técnica de nanoindentação.

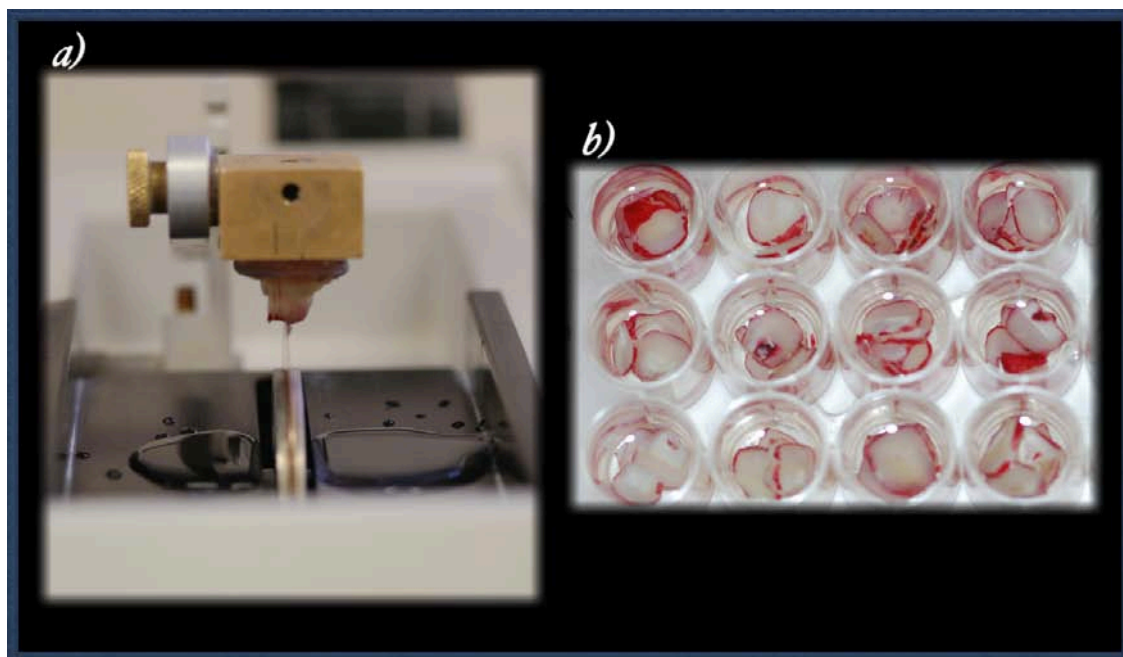


Figura 27. a) Máquina de cortes seriados para obtenção de fatias. **b)** Fatias obtidas de cada dente, mantidas em água deionizada.

As fatias foram fixadas ao "porta-amstras" de 33 mm de diâmetro e 22 mm de altura, para facilitar o manuseio durante o polimento metalográfico, com auxílio de parafina aquecida (Figura 29a). Inicialmente foram polidas manualmente com lixas de carbetto de silício de decrescente abrasividade (600, 1000, 1200, 1500, 2000 e 4000) (Figura 28). Posteriormente, foram utilizados discos de feltro macios com pasta diamantada, com tamanho de partícula de 1 e 1/4 μm , em uma máquina politriz Aropol S (Arotec, Cotia, SP, Brasil) em 300 rpm, produzindo superfícies lisas necessárias para os experimentos de nanoindentação. Entre cada passo e após o término do polimento, as amostras foram ultrassonicamente lavadas em água destilada por 20 min. Após estocagem em água à 37°C por 24 h, os espécimes foram submetidos ao teste de nanoindentação. A microscopia óptica foi utilizada com o microscópio OLYMPUS – BX 51 (Olympus, Tokyo, Japão) para análise da superfície das amostras durante o polimento metalográfico.

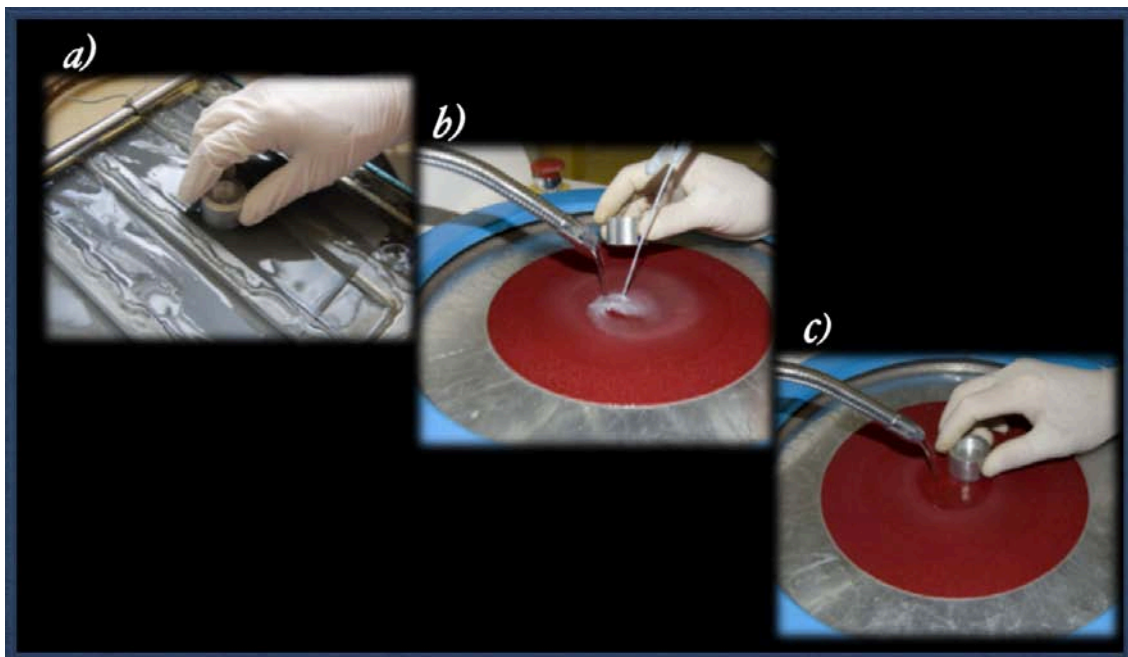


Figura 28. *Polimento metalográfico.* **a)** Polimento das fatias embutidas com lixas de decrescentes abrasividades. **b)** e **c)** Polimento das fatias com disco de feltro e pasta diamantada.

Os experimentos de nanoindentação para obtenção das grandezas dureza e módulo de elasticidade das amostras foram realizados usando um Nano Indenter® XP (MTS, MN, EUA), localizado no Laboratório de Propriedades Nanomecânicas da Universidade Federal do Paraná. Os testes foram realizados em temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), utilizando uma ponta Berkovich de base piramidal, com carga aplicada de 1 gf (10mN) (Figura 29b).

As amostras fixadas em um porta-amostra ficavam situadas sobre uma mesa que se movimenta, em relação ao microscópio ou ao penetrador, segundo as direções x, y (Figura 30b). A posição de penetração na amostra foi selecionada utilizando um microscópio óptico o qual faz parte do equipamento. Uma câmera CCD (dispositivo de carga acoplada) estava montada no topo do microscópio a qual permite visualizar a imagem da amostra. O microscópio produzia ampliações de até 1000 X na tela do monitor (Figura 30a). Todo o conjunto situava-se em uma cabine isoladora para que as medições fossem realizadas em alta precisão (Figura 30c).

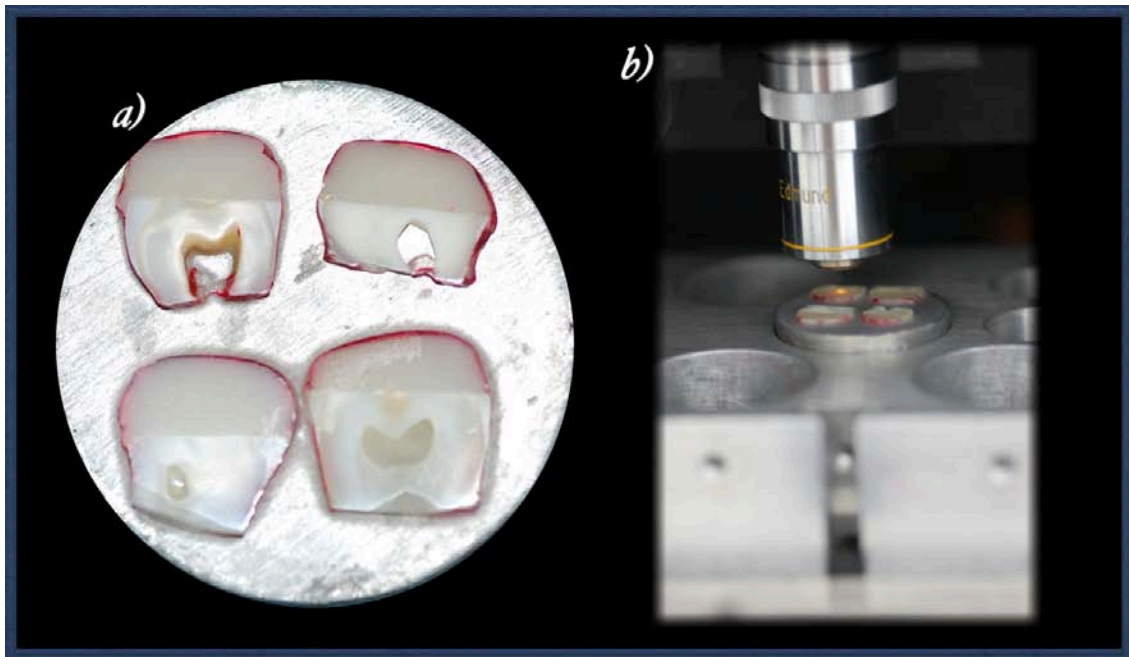


Figura 29. a) Fatias fixadas com parafina em porta-amostras metálicos. **b)** Porta-amostra com as fatias, situado sobre uma mesa que se movimenta, em relação ao microscópio ou ao penetrador.

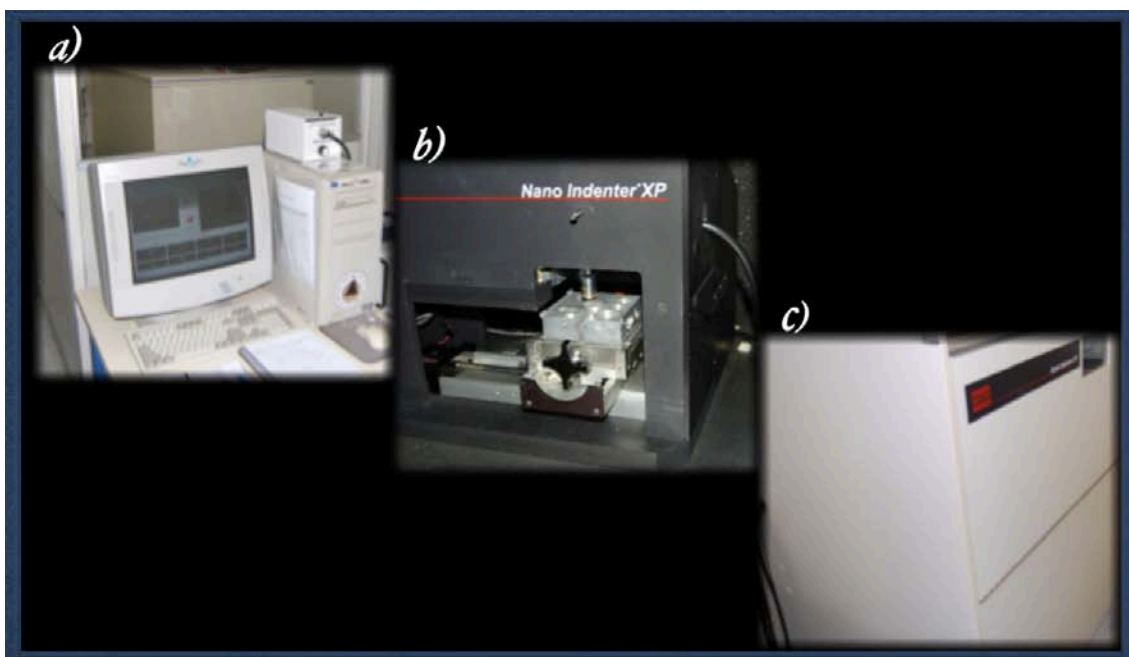


Figura 30. Vista do conjunto Nano Indenter® XP. **a)** Conjunto de programação e controle formado pela estação de trabalho com seus periféricos. **b)** Nano Indenter® XP. **c)** Cabine isoladora

A velocidade de aproximação do indentador em direção à superfície da amostra foi de 10 nm/s e a duração tanto do ciclo de carregamento como de

descarregamento foi de 10 segundos, sendo a carga mantida constante por 4 segundos em carga máxima. A distância pré-programada entre as indentações na camada híbrida foi de 30 μm com uma aplicação de carga de 0,1 gf e na dentina em 100, 200, 300, 400, 500, 600 μm da camada híbrida com 5gf. Doze indentações foram feitas para cada fatia, sendo seis na camada híbrida e seis na dentina. As grandezas dureza e módulo de elasticidade foram determinadas pelo método de Oliver e Pharr⁴² (1992).

Os valores de dureza e módulo de elasticidade (GPa) da interface resina-dentina foram submetidos a um teste ANOVA de dois critérios (sistema adesivo x métodos artificiais de indução de lesões de cárie). Para o contraste das médias foi utilizado o teste de Games Howell ($\alpha=0,05$). O software estatístico SPSS, versão 20.0 (SPSS Statistics, IBM Corporation, Somers, NY, EUA), foi utilizado para realizar as análises estatísticas deste estudo.

4 CAPÍTULOS

4.1 Capítulo 1: *Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de um polímero quaternário de amônio [QAMP] para incorporação em sistema adesivo*

Apresentação

Sais de amônio quaternário são moléculas carregadas positivamente com quatro grupos alquila, arila ou heterocíclico ligado ao nitrogênio. Estes compostos são capazes de reduzir microrganismos, tais como bactérias e fungos, interagindo com a membrana da célula [Dizman *et al.*⁴³ 2004]. Este efeito pode ser particularmente aumentado por pelo menos uma cadeia alquílica longa, proporcionando um segmento hidrofóbico para a estrutura do quaternário de amônio [Abel *et al.*⁴⁴ 2002]. Em Odontologia, a atividade antimicrobiana é desejada para sistemas adesivos, a fim de evitar a colonização bacteriana cariogênica na interface dente-restauração [Imazato *et al.*³⁵ 2001; Imazato *et al.*²¹ 2006; Esteves *et al.*³⁶ 2010].

Portanto, compostos antibacterianos são desenvolvidos com a finalidade de inibir lesões de cárie recorrente [Imazato *et al.*¹⁸ 1994; Imazato⁴⁶ 2003; Imazato⁴⁷ 2009]. Estudos anteriores incorporaram monômeros quaternários de amônio polimerizáveis em sistemas adesivos por formação de uma ligação covalente com a rede de polímero, imobilizando estes monômeros no compósito [Imazato *et al.*¹⁸ 1994; Imazato⁴⁵ 2003; Imazato⁴⁶ 2009; Beyth *et al.*⁴⁷ 2006; Li *et al.*⁴⁸ 2009; Xie *et al.*⁴⁹ 2011; Tezvergil-Mutluay *et al.*⁵⁰ 2011]. Neste sentido, o sistema adesivo com brometo de 12-methacriloloxidodecilpiridínio (MDPB) efetivamente reduziu a viabilidade e crescimento dos *Streptococcus mutans* [Imazato *et al.*¹⁸ 1994; Imazato⁴⁵ 2003; Imazato⁴⁶ 2009]. Outros agentes antibacterianos, incluindo o cloreto de cetil dimetil amônio e cloreto de cetilpiridínio, também foram adicionados em sistemas adesivos odontológicos [Li *et al.*⁴⁸ 2009; Namba *et al.*⁵¹ 2009].

No entanto, existem dados restritos disponíveis sobre a quaternização de polímeros à base de metacrilato que contêm pelo menos um grupo alquila de cadeia longa para fins odontológicos. Eudragit® E100 é um copolímero à

base de metacrilato com unidades de dimetilaminoetilo, metacrilato de metila e metacrilato de butila. O grupo dimetilaminoetilo de Eudragit® E100 é uma amina terciária que pode ser quaternizada por um processo de alquilação, utilizando um haleto de alquila tal como brometo de *n*-octila [Barney *et al.*²⁸ 2005; Lu *et al.*²⁵ 2007]. Os polímeros obtidos contendo grupos quaternários de amônio podem proporcionar algumas vantagens quando comparados com os monômeros metacrílicos quaternários de amônio como MDPB porque estes polímeros são não-voláteis, quimicamente estáveis e não permeáveis através da mucosa oral [Dizman *et al.*⁴³ 2004]. Além disso, estes polímeros quaternizados não revelam decomposição fotolítica [Nurdin *et al.*⁵² 1993] e podem mostrar uma menor migração de um sistema adesivo dental, quando comparados com os monômeros relacionados quimicamente.

Por conseguinte, o objetivo do presente capítulo é relatar a síntese e caracterização de um polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP], a fim de proporcionar propriedades antimicrobianas para sistemas adesivos dentais.

4.1.1. Artigo do capítulo 1:

Publicado em 18/02/2013 no *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*

An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system

Yasmine Mendes Pupo,^a Paulo Vítor Farago,^b Jessica Mendes Nadal,^b Luis Antônio Esmerino,^c Daniela Florencio Maluf,^d Sônia Faria Zawadzki,^d Milton Domingos Michél,^e Fábio André dos Santos,^a Osnara Maria Mongruel Gomes,^a João Carlos Gomes^a

^a Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave, 84030-900, Ponta Grossa, Brazil

^b Laboratory of Pharmaceutical Products, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave,

84030-900, Ponta Grossa, Brazil

^c *Laboratory of Clinical Microbiology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave, 84030-900, Ponta Grossa, Brazil*

^d *Department of Chemistry, Federal University of Paraná, P.O. Box 19081, 81531-990, Curitiba, Brazil*

^e *Department of Materials Engineering, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave, 84030-900, Ponta Grossa, Brazil*

*Correspondence should be addressed to Paulo Vitor Farago, pvfarago@gmail.com

Abstract

A quaternary ammonium methacrylate polymer with antimicrobial potential was synthesized. The resulting product (QAMP) was characterized by FTIR spectroscopy, NMR spectroscopy, visible spectrophotometry, XRPD and TGA. The *in vitro* susceptibility tests against *Streptococcus mutans* of QAMP was investigated prior and after incorporation into a commercial adhesive system (Clearfil™ SE Bond). The release of quaternary ammonium compounds from the experimental adhesive system (Clearfil™ SE Bond + 5% QAMP) was performed during 1, 7, 14, 21 and 30 days. Spectroscopic data confirmed that QAMP was successfully obtained. Thermogravimetric analysis indicated that QAMP was heat-stable. Prior incorporation into the adhesive system, QAMP revealed an inhibition halo of 18.33 ± 0.6 mm. By agar disk diffusion test, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP presented an inhibition halo (16.67 ± 1.5 mm) similar to Clearfil™ Protect Bond (positive control, 17.00 ± 1.7 , $p=0.815$) and significantly higher than Clearfil™ SE Bond (negative control, 11.00 ± 1.0 , $p=0.006$). The minimum inhibitory/bactericidal concentrations for Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP were $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$. The release of quaternary ammonium compounds from the experimental adhesive containing QAMP was very low (5.1%) when compared to Clearfil™ Protect Bond that released 47.2% of its quaternary ammonium monomer (MDPB) after 30 days.

The quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) can offer enhanced antimicrobial properties for self-etching adhesive systems.

Keywords: alkylation; antibacterial agents; quaternary ammonium compounds; spectrum analysis; *Streptococcus mutans*.

1. Introduction

Quaternary ammonium salts are positively-charged molecules with four alkyl, aryl or heterocyclic groups bonded to the nitrogen. These compounds are able to kill microorganisms such as bacteria and fungi by interacting with the cell membrane [1]. This effect can be particularly enhanced by at least one long alkyl chain to provide a hydrophobic segment for the quaternary ammonium structure [2]. In dentistry, this antimicrobial activity is desired for adhesive systems in order to avoid cariogenic bacterial colonization [3-5].

Several papers have been reported the use of polymerizable cationic monomers as precursors of polymeric materials in attempting to have antibacterial properties. The major antimicrobial monomer for use in dentistry is 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB). This product was first synthesized 20 years ago and was extensively investigated according its antibacterial properties and cytotoxicity [6-9]. Based on these previous results, a self-etching dental adhesive system containing 5% MDPB was developed and evaluated regarding their antibacterial effects. This material demonstrated strong antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* and *Actinomyces naeslundii* and currently is commercially available as Clearfil™ Protect Bond [4].

In order to investigate new antimicrobial monomers, three experimental quaternary ammonium salt monomers, methacryloxylethyl benzyl dimethyl ammonium chloride, methacryloxylethyl *m*-chloro benzyl dimethyl ammonium chloride and methacryloxylethyl cetyl dimethyl ammonium chloride (DMAE-CB) were also synthesized and evaluated against oral pathogenic bacteria. The monomer DMAE-CB exhibited the lowest minimal inhibitory concentrations, ranging from 1.2 and 4.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [10]. In a further study, DMAE-CB was incorporated into a total-etching dental adhesive system at 1, 2, and 3% (w/w).

The adhesive containing 3% DMAE-CB demonstrated higher antimicrobial activity against *S. mutans*. This monomer showed both integration with resin matrix of adhesive system due to their methacryloyl groups and antibacterial effect resulting of their quaternary ammonium structure [11]. Current papers are focused on comparing a two-step etch-and-rinse adhesive system (Adper™ Single Bond 2) containing 3% DMAE-CB to Clearfil™ Protect Bond and their oral biological effects. Both adhesive systems had anti-biofilm effect that can be partially explained by the detrimental effects of immobilized cationic moieties on the growth, adherence, and membrane integrity of *S. mutans*. The DMAE-CB-incorporated adhesive system can also hamper biofilm accumulation *via* selective down-regulation of the expression of *gtf* genes of *S. mutans* [12-13].

However more restrict data are available about quaternization of methacrylate-based polymers containing at least one long alkyl chain for dental purposes. Eudragit™ E100 is a methacrylate copolymer based on dimethylaminoethyl methacrylate, methyl methacrylate and butyl methacrylate units. This polymer is widely used in oral capsule and tablet formulations as film-coating agent. It is soluble in gastric fluid below pH 5.0 and is regarded as nontoxic and nonirritant material [14]. The dimethylaminoethyl group of Eudragit™ E100 is a tertiary amine that can be quaternized by a simple one-step alkylation using an alkyl halide as *n*-octyl bromide [15-16]. The obtained polymers containing quaternary ammonium groups can provide some advantages when compared to the quaternary ammonium methacrylate monomers as MDPB because these polymers are nonvolatile, chemically stable and not permeate through the oral mucosa [1]. In addition, these quaternized polymers do not reveal photolytic decomposition [17] and can show a lower migration from a dental adhesive system when compared to the chemically-related monomers.

Therefore, the aim of this paper was to synthesize and to characterize a novel quaternary ammonium methacrylate polymer in order to provide antimicrobial properties for a self-etching dental adhesive system.

2. Experimental

2.1. Materials

Eudragit™ E100 [poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate) 2:1:1, $\overline{M}_w = 150,000 \text{ g.mol}^{-1}$] was provided by Röhm Pharma Polymers (Darmstadt, Germany). *n*-Octyl bromide and patent blue VF sodium salt were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Clearfil™ Protect Bond and Clearfil™ SE Bond were acquired from the Kuraray Medical (Kurashiki, Japan). Other chemicals were of analytical grade and were used as received.

2.2. Synthesis of quaternary ammonium methacrylate polymer

The quaternization (Figure 1) was carried out by the Menshutkin reaction [18] using 2.00 g Eudragit™ E100 (7.20 mmol from dimethylaminoethyl methacrylate-mer unit) and 10.6 mL *n*-octyl bromide (40 mmol) in 60 mL ethanol [15-16]. Briefly, the reaction was kept on magnetic stirring under reflux at 80°C for 12 h. The reaction medium was then concentrated under reduced pressure of 300-500 mmHg at 40°C and the quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) was precipitated using 100 mL cold *n*-hexane. The resulting product QAMP was filtered, dissolved in 20 mL methanol, and precipitated again. Finally, it was dried for 2 days in a freeze dryer at -40°C and 400 μHg vacuum.

2.3. Characterization of quaternary ammonium methacrylate polymer

2.3.1. Fourier-transformed infrared (FTIR) spectroscopy. In order to confirm the synthesis of QAMP, the FTIR spectra of raw materials and synthesized polymer were recorded from 4000 to 400 cm^{-1} on a Biorad Excalibur Series (FTS-3500 GX) IR spectrophotometer using KBr pellets with 32 scans and resolution of 2 cm^{-1} [19].

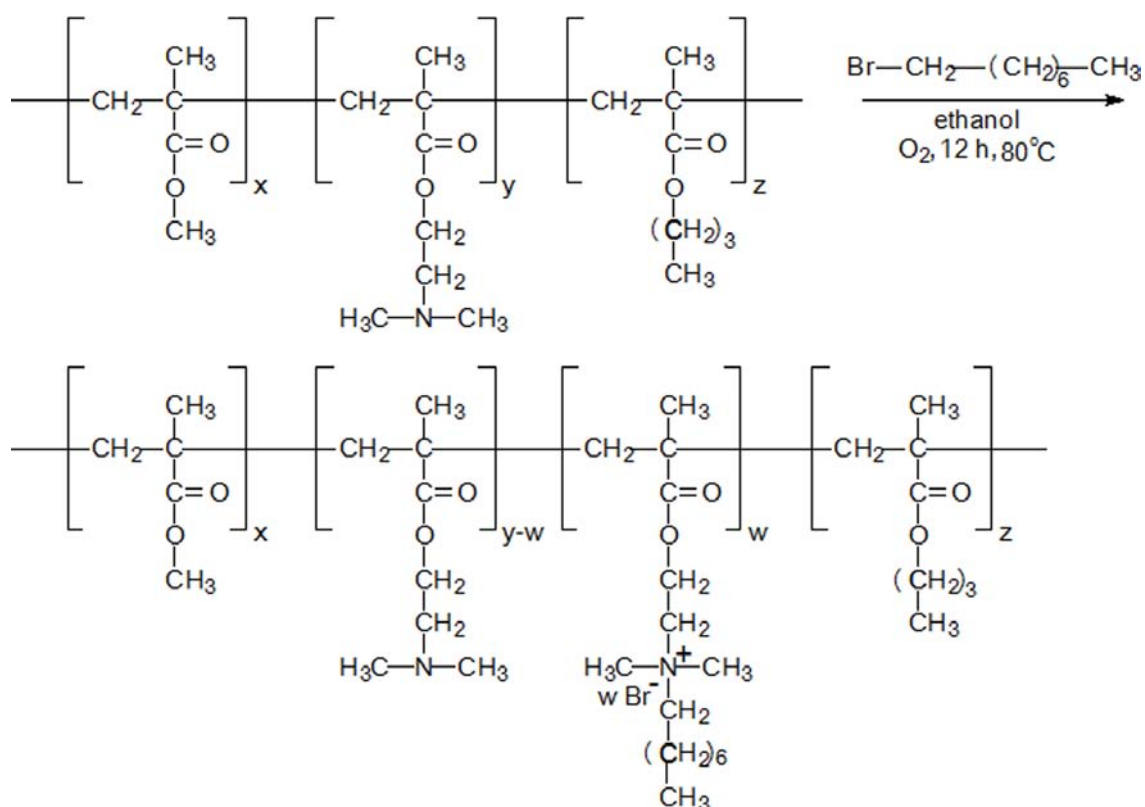


Figure 1. Scheme of synthesis of the quaternary ammonium methacrylate polymer QAMP

2.3.2. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. For structural elucidation of QAMP, the ^1H and ^{13}C NMR spectra were collected on Bruker Avance DRX-400 instrument operating at 9.4 T, observing ^1H at 400.13 and ^{13}C at 100.61. The spectrometer was equipped with either a 5-mm multinuclear inverse detection probe with z-gradient (2D experiments) or a 5-mm multinuclear direct detection probe (^1H and ^{13}C spectra). All ^1H and ^{13}C chemical shifts are related to TMS ($\delta=0$ ppm) as internal standard. Deuterated solvents were used, being CDCl_3 for *n*-octyl bromide and EudragitTM E100 and $\text{DMSO}-d_6$ for the resulting product (QAMP). As lock and reference ^1H NMR relative to the proton resonance resulting from incomplete deuteration of the CDCl_3 (δ 7.25) and DMSO (δ 2.50); ^{13}C NMR relative to the carbon of the CDCl_3 (δ 77.0) and DMSO (δ 39.51). The ^1H NMR spectra were processed using Fourier transform with 64 K data points, spectral width of 6443.3 Hz, and by an exponential multiplication of the FIDs by a factor of 0.3 Hz. The

distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) method was used as an instrumental mode for distinguishing among ^{13}C signals for CH_3 , CH_2 , and CH [20]. All pulse programs were supplied by Bruker BioSpin.

2.3.3. Visible spectrophotometry. The quantification of quaternary ammonium groups of QAMP was spectrophotometrically obtained in triplicate using patent blue VF (synonym: disulphine blue VN 150) [21]. A mass of 50 mg QAMP was accurately weighted, dissolved in 1 mL ethanol 90% (V/V) and placed into a pyrex glass tube (15 mL). The solvent was evaporated and the residue was dissolved into 1 mL of 1 mmol.L^{-1} disulphine blue VN 150 aqueous solution. This medium was extracted with 10 mL CHCl_3 . After this extraction procedure, the organic phase (5 mL) was transferred to other test tube containing 5 mL of 1 mol.L^{-1} NaClO_4 aqueous solution. This tube was then carefully shaken until the complete disappearance of the blue coloration from the organic phase. The absorbance of the aqueous solution was measured at 640 nm with a Thermo UV-Vis spectrophotometer (Genesys 10S) using glass cuvettes with 1-cm path length. The 1 mol.L^{-1} NaClO_4 aqueous solution was used as blank. The result was expressed as degree of quaternization of dimethylaminoethyl groups in percentage. The same procedure was also carried out for EudragitTM E100 as blank control.

2.3.4. Wide-angle X-ray powder diffraction (XRPD). In order to investigate the crystallinity of QAMP compared to EudragitTM E100, wide-angle XRPD was performed with a Shimadzu X-ray diffractometer (XRD-6000). The 2θ was increased from 5° to 80° at a scan rate of $2^\circ.\text{min}^{-1}$ using a $\text{Cu-K}\alpha$ source ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$) at 40 kV and 40 mA [19].

2.3.5. Thermogravimetric analysis (TG). In order to evaluate the thermal stability of QAMP, the thermogravimetric curves were obtained with a Shimadzu thermobalance (TGA-50) in the temperature range of $25\text{--}900^\circ\text{C}$, using open platinum crucibles with approximately 5 mg of sample under dynamic N_2 atmosphere (flow rate: 50 mL.min^{-1}) and heating rate of $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ [22].

2.4. Microbiological potential of quaternary ammonium methacrylate polymer

In order to confirm its antibacterial potential, QAMP was evaluated by agar-well diffusion method prior incorporation into an adhesive system. In brief, plates containing Mueller-Hinton (MH) agar with 5% sheep blood were inoculated with strains of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) from a previously standardized inoculum suspension at a concentration of 5×10^5 CFU.mL⁻¹ that achieved the turbidity of the 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU.mL⁻¹) by swab streaking [23,24]. Wells of 7 mm diameter were cut into agar plates and 10 mg of QAMP as powder was added to each well [16]. Plates were incubated under microaerophilic conditions for 24 h at $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The zone of growth inhibition was measured in millimeters. Tests were carried out in triplicate and Eudragit™ E100 (powder) and *n*-octyl bromide (liquid) were also evaluated as controls.

2.5. Incorporation of the quaternary ammonium methacrylate polymer into an adhesive system

The product QAMP was incorporated to Clearfil™ SE Bond, a commercially available light-cured self-etching adhesive system. An accurate mass of 0.1667 g of QAMP was weighted and added into 1.5 mL of primer component. The concentration incorporated into primer resulted then in 10% (w/v). Regarding that primer and bond components were used in a ratio of 1:1, the final concentration of QAMP into the adhesive system was 5% (w/w) after light-curing. Clearfil™ Protect Bond, a commercially available self-etching adhesive system with well-known antimicrobial potential [3,5], and Clearfil™ SE Bond without QAMP were used as positive and negative controls, respectively. These adhesive systems were also light-cured at the same experimental ratio (1:1) and used for the further analyses.

2.6. In vitro susceptibility tests

The antibacterial properties of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP were investigated by *in vitro* susceptibility tests of agar disk diffusion method

[16] and the minimum inhibitory/minimum bactericidal concentration assays [10,16].

2.6.1. Agar disk diffusion test. Each sterile filter paper disk (diameter: 6 mm, thickness: 1.5 mm) was treated with 20 μ L of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP (10 μ L volumes of primer and bond) or positive/negative control, light-cured with LED for 20 s (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brazil) on both sides. After light-curing, the disks were placed on MH agar supplemented with 5% sheep blood with streaking cultures of *S. mutans* as previously described. The diameter of the zone of growth inhibition around each disk was determined in millimeters after 24 h of incubation under microaerophilic conditions at $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Tests were performed in triplicate. Results were statistically evaluated using one-way ANOVA and Scheffé test (5% significance).

2.6.2. Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration assays. Volumes of 10, 20, 40, and 80 μ L of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, obtained by using equal aliquots of primer and bond, or positive/negative control were spread onto the bottom of hemolysis tubes, air-thinned and light-cured with LED for 20 s. After, brain-heart infusion (BHI) broth containing *S. mutans* culture as previously obtained (1 mL) was added. Tubes were shaken and the initial optical density (OD) was achieved by transferring 200 μ L of each culture medium to a 96-well microplate and measuring the absorbance at 450 nm using a spectrophotometric plate reader (EL800, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, USA). Tubes were then cultured under microaerophilic conditions during 24 h at $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The final OD was also spectrophotometrically assayed as previously reported. The bacterial growth was estimated by changes of OD values in each well considering the measurements taken before and after incubation. The minimum inhibitory concentration (MIC) required for growth inhibition of 90% of *S. mutans* isolate (MIC90) was calculated by linear regression using the GraphPad 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Tests were performed in triplicate with

fresh BHI serving as blank control. In order to obtain the minimum bactericidal concentration (MBC), subcultures were obtained by spreading the content from these wells on MH agar plates supplemented with 5% sheep blood. Plates were incubated under microaerophilic conditions for 24 h at $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The MBC value was evaluated using scores (0 = no bacterial growth; 1 = rare bacterial colonies; 2 = moderate bacterial growth; 3 = strong bacterial growth). Regarding the initial concentrations of each adhesive system (10, 20, 40, and $80 \mu\text{L.mL}^{-1}$), a concentration-kill curve against *S. mutans* was performed. In order to provide a comparative analysis, BHI broth containing *S. mutans* culture was also investigated.

2.7. Release of quaternary ammonium compounds from the adhesive systems

In order to investigate the percentage of release of quaternary ammonium compounds from the experimental adhesive system, a light-cured film of 0.05 g of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP was placed into an amber bottle containing 20 mL of artificial saliva in triplicate. This system was kept at $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ during 30 days. After predetermined intervals (1, 7, 14, 21, and 30 days), aliquots of 1 mL were collected and replaced by the same volume of fresh artificial saliva. The percentage of release of quaternary ammonium compounds was determined using the method of patent blue VN as previously reported (2.3.3. Visible spectrophotometry). Considering that Clearfil™ Protect Bond presents MDPB in its composition, a quaternary ammonium monomer, this commercial adhesive system was evaluated using the same procedure for comparative purposes. Due to Clearfil™ SE Bond shows no quaternary ammonium compound, it was used as negative control.

3. Results and discussion

The resulting product QAMP was prepared by the proposed one-step exhaustive alkylation. This quaternary ammonium methacrylate polymer was particularly obtained by direct quaternization between dimethylaminoethyl

groups of Eudragit™ E100 and *n*-octyl bromide (Figure 1). After drying, QAMP showed powder aspect and pale yellow color.

3.1. Characterization of quaternary ammonium methacrylate polymer

3.1.1. Fourier-transformed infrared spectroscopy

FTIR spectra performed for Eudragit™ E100, *n*-octyl bromide, and QAMP are shown in Figure 2. FTIR spectrum of Eudragit™ E100 presented typical bands of ester groups at 1150, 1240, and 1278 cm^{-1} . A strong C=O ester stretching band was observed at 1733 cm^{-1} . In addition, CH_x groups were assigned at 1387, 1461, and 2952 cm^{-1} . Dimethylamino groups led to bands at 2773 and 2824 cm^{-1} . Concerning *n*-octyl bromide, its infrared spectrum exhibited two bands at 2851 and 2925 cm^{-1} mainly due to symmetric and asymmetric $-\text{CH}_2$ stretching, respectively. A typical band assigned to C–Br stretching was observed between 565 and 645 cm^{-1} . The FTIR spectrum of QAMP demonstrated a band around 2685 cm^{-1} (a) attributed to the quaternary ammonium salt obtained from the tertiary amine. According to the literature [25, 26], all ammonium salts display a broad band between 2200 and 3300 cm^{-1} because of the combination of bands of NR_4^+ group. Particularly, this assignment was not verified in Eudragit™ E100 and *n*-octyl bromide. Moreover, the aliphatic C–Br band between 565 and 645 cm^{-1} (b) of *n*-octyl bromide disappeared as expected to obtain the quaternary ammonium compound. Furthermore, bands of dimethylamino groups at 2773 and 2824 cm^{-1} (c) were not observed because of the formation of the quaternary ammonium derivate. Therefore, these FTIR assignments confirm that the synthesis of the quaternary ammonium methacrylate polymer was successfully performed by the previously described alkylation.

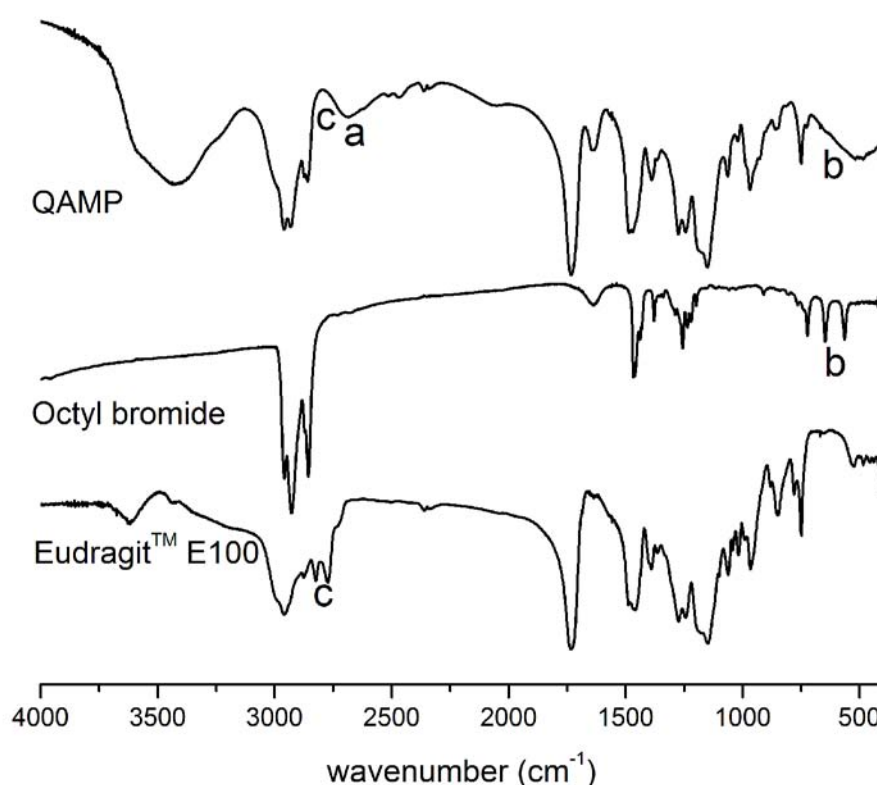


Figure 2. FTIR spectra of Eudragit™ E100, octyl bromide, and QAMP

3.1.2. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

The ^1H and ^{13}C -DEPT NMR spectral data confirmed the chemical structure of QAMP. Considering ^1H NMR spectrum of QAMP (Figure 3), ^1H chemical shifts of methyl and methylene groups attached to the quaternary ammonium were assigned at δ 3.18 and 3.39 ppm, respectively [20]. Regarding the ^{13}C -DEPT NMR spectrum, QAMP showed a deshielding effect on its methyl groups and shifted the peak (δ 45.8 ppm) assigned to the methyl groups adjacent to nitrogen of Eudragit™ E100 to downfield (δ 50.9) (Figure 4). This deshielding effect was previously observed during quaternization of methacrylamidopropyl-*N,N'*-dimethylamine with *n*-alkyl iodides in ethyl acetate for confirming the synthesis of quaternary ammonium methacrylate monomers [27].

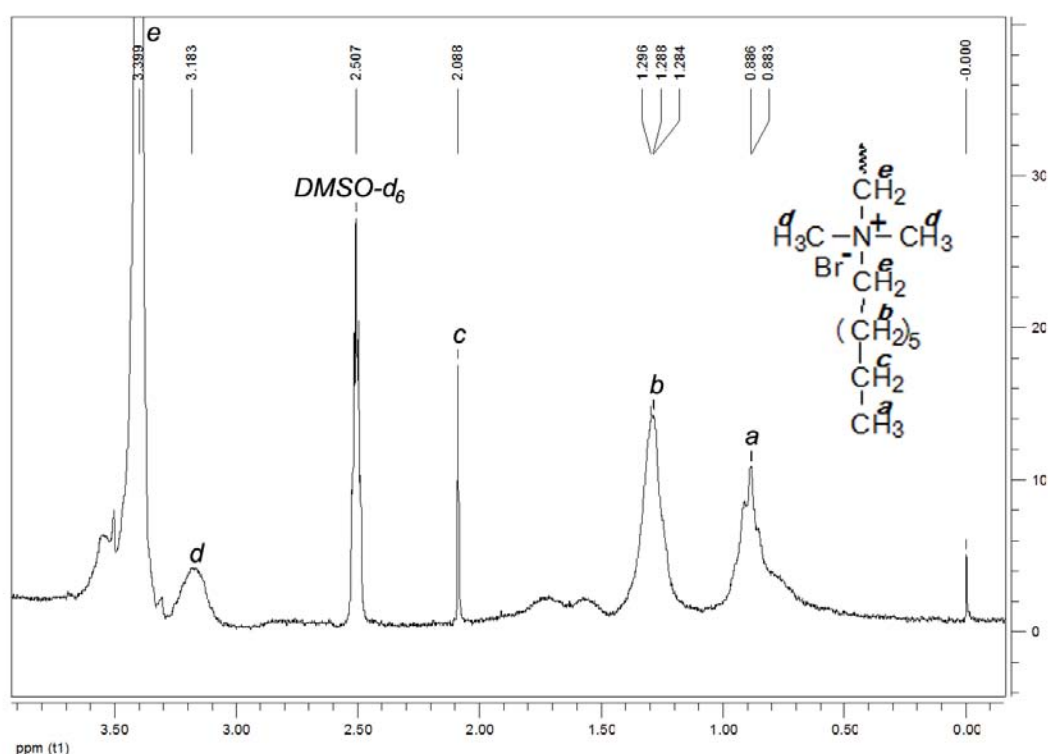


Figure 3. ^1H NMR spectrum of QAMP

3.1.3. Visible spectrophotometry

In order to explore whether the exhaustive alkylation led to quaternization, a spectrophotometric method using patent blue VF was performed. Patent blue VF or disulphine blue VN is an anionic dye indicator which forms an intensely colored ion-association complex with the positively-charged quaternary ammonium structure. In that sense, QAMP showed a degree of quaternization of $98.35 \pm 0.15\%$. Considering that EudragitTM E100 is based on dimethylaminoethyl methacrylate, butyl methacrylate, and methyl methacrylate with a ratio of 2:1:1, this high degree of quaternization indicates that approximately 50% (49.18%) of mer units of QAMP have quaternary ammonium cation with a remarkable potential as antimicrobial agent. This result is also consistent with FTIR and ^{13}C -DEPT NMR spectra of QAMP in which signals of dimethylamino groups were not detected after quaternization.

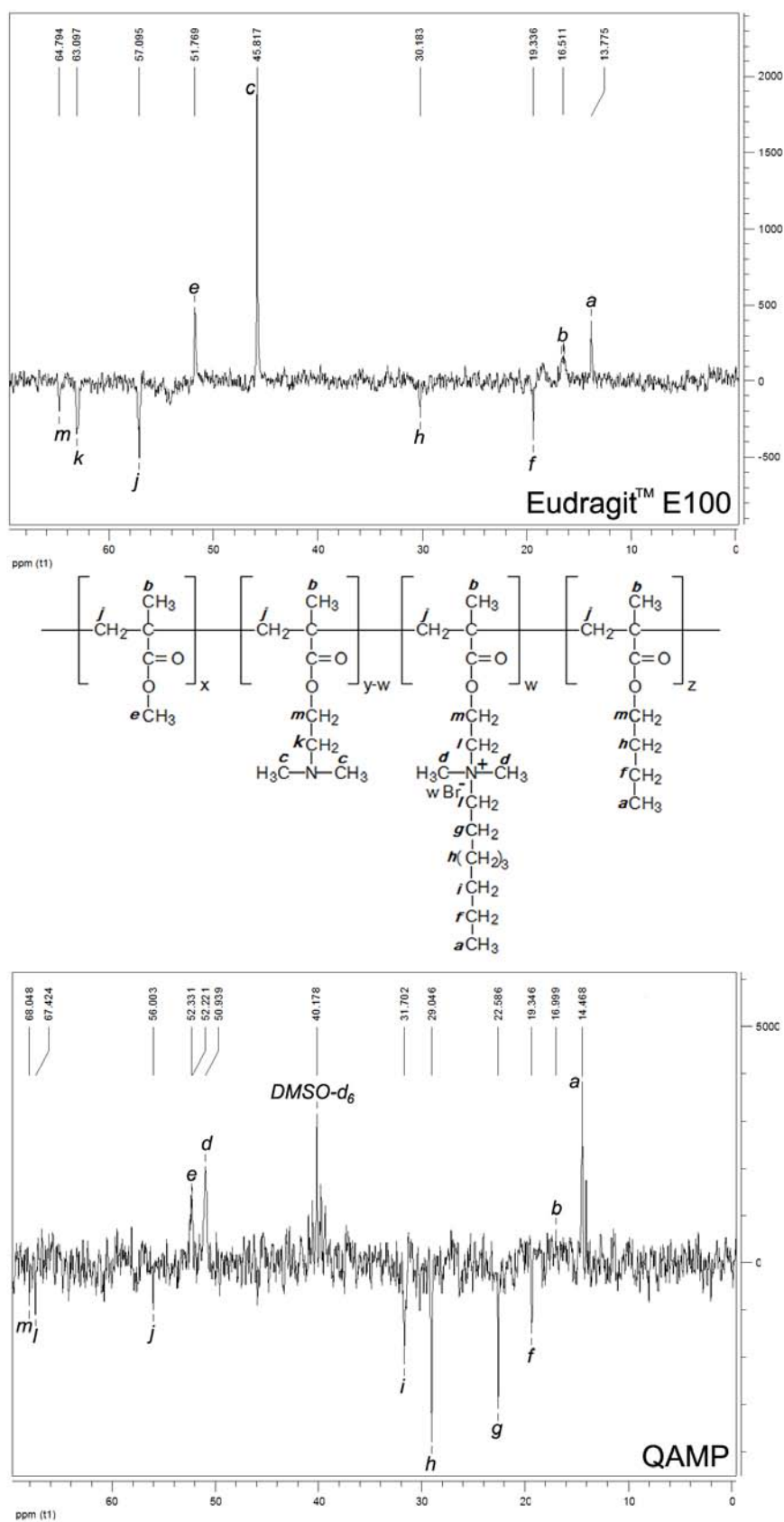


Figure 4. ¹³C-DEPT NMR spectra of a) Eudragit™ E100 and b) QAMP

3.1.4. Wide-angle X-ray powder diffraction

Samples of Eudragit™ E100 and QAMP were studied by XRPD in order to evaluate their crystallinity patterns (Figure 5). Eudragit™ E100 showed a non-crystalline (amorphous) behavior as previously reported [28]. Comparing to Eudragit™ E100, QAMP demonstrated no crystalline diffraction peak and a lower intensity pattern. Thus, it is possible to suggest that the quaternization process used for obtaining the quaternary ammonium methacrylate polymer led to decrease of the prior diffractogram intensities of Eudragit™ E100.

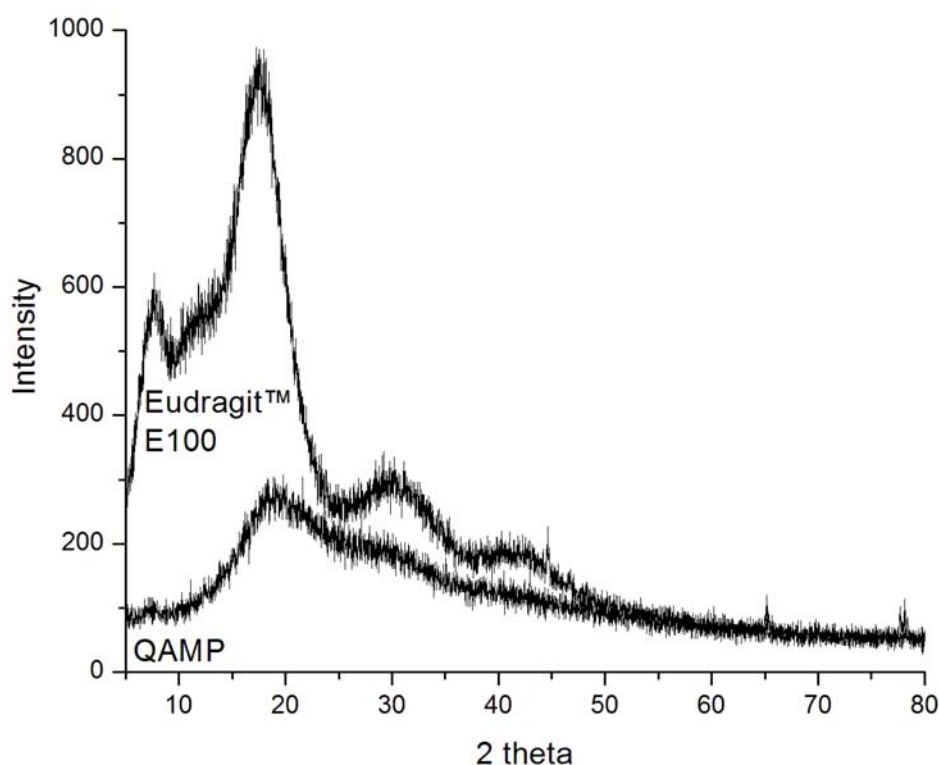


Figure 5. Wide-angle XRPD patterns of Eudragit™ E100 and QAMP

3.1.5. Thermogravimetric analysis

The TG curves of Eudragit™ E100, *n*-octyl bromide, and QAMP are indicated in Figure 6. Eudragit™ E100 presented two stages of mass loss. The first stage of mass loss ranged from 189 to 346°C ($\Delta m = 27.9\%$) while the second one occurred between 346 to 504°C ($\Delta m = 69.4\%$). Otherwise *n*-octyl bromide revealed only one stage of mass loss, ranging from 43 to 147°C ($\Delta m = 99.7\%$). QAMP showed a three-stage thermal decomposition profile that ranged

from 50 to 116°C ($\Delta m = 2.8\%$), from 132 to 328°C ($\Delta m = 51.1\%$), and from 328 to 504°C ($\Delta m = 44.7\%$). The first stage of mass loss was associated to the physical desorption of residual water. The second and third stages were attributed to cleavage of covalent bonds and volatilization of decomposition products. In despite of water loss observed for the resulting product, thermal decomposition profiles of Eudragit™ E100 and QAMP were similar. Therefore this result suggests a suitable thermal stability before 130°C, considering its potential use for dental purposes as an antimicrobial agent for self-etching adhesive system.

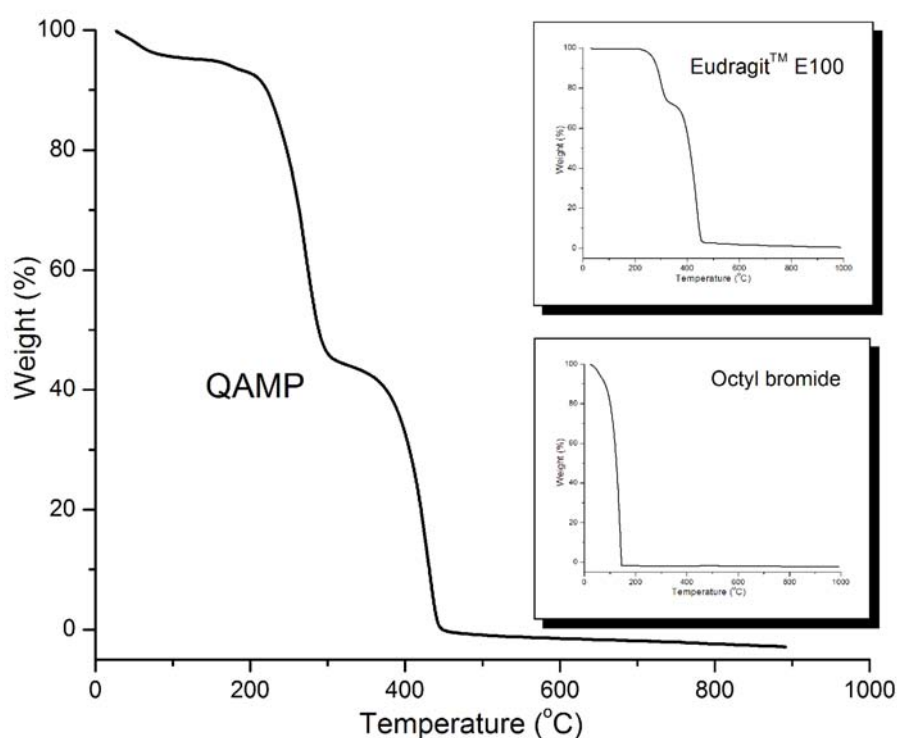


Figure 6. TG curves of Eudragit™ E100, *n*-octyl bromide, and QAMP

3.2. Microbiological potential of quaternary ammonium methacrylate polymer

Prior incorporation into self-etching adhesive system, the antimicrobial potential of QAMP was investigated using agar-well diffusion method. This resulting product revealed an inhibition halo of 18.33 ± 0.6 mm against *S.*

mutans. Otherwise no inhibition halo was observed for Eudragit™ E100 and *n*-octyl bromide. This result reinforces the previously described characterization data that indicated the formation of a quaternary ammonium methacrylate polymer with antibacterial potential. Quaternary ammonium compounds are some of the most commonly used antimicrobials which can be similar or different in chemistry and structure [1]. It has been demonstrated that an increase of the alkyl chain length providing an amphiphilic structure is followed by an enhanced hydrophobic interaction with the lipid bilayer of the cell membrane which in turn increases the antimicrobial activity of these compounds [1,29]. In that sense, *n*-octyl bromide was chosen for alkylation in order to form an innovative methacrylate polymer with amphiphilic quaternary ammonium groups that led to the antimicrobial properties as shown. Furthermore, it is possible to suggest that QAMP can be further used to provide antimicrobial effect for dental adhesive systems to protect against cariogenic bacterial colonization.

3.3. *Incorporation of the quaternary ammonium methacrylate polymer into an adhesive system*

As previously described, QAMP was incorporated to Clearfil™ SE Bond resulting in a final concentration of 5%. QAMP was freely miscible into the primer due to its solvents (*N,N*-diethanol *p*-toluidine and water) were suitable for this synthesized polymer. After light-curing according to manufacturer's instructions, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed exactly the same aspect of Clearfil™ SE Bond.

3.4. *In vitro susceptibility tests*

In attempting to determinate the antibacterial effect of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP against *S. mutans*, agar disk diffusion test and the minimum inhibitory/minimum bactericidal concentration assays were performed.

3.4.1. Agar disk diffusion test. The diameter of the zone of complete inhibition observed for each adhesive system in millimeters is summarized in

Table 1. The experimental self-etching dental adhesive system prepared by adding 5% QAMP to Clearfil™ SE Bond showed a mean inhibition halo of 16.67 mm. Clearfil™ Protect Bond and Clearfil™ SE Bond exhibited mean inhibition halos of 17.00 and 11.00 mm, respectively. Considering the parametric procedure of one-way ANOVA in combination with Scheffé test, no statistically significant difference in inhibition zone ($p=0.815$) was observed between Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP and Clearfil™ Protect Bond that was used as positive control. However Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP provided a statistically significant increase in inhibition zone ($p=0.006$) when compared to Clearfil™ SE Bond (negative control).

Table 1. Results of agar disk diffusion test for the self-etching dental adhesive systems under study

Self-etching dental adhesive system	Inhibition zone (mm)
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	16.67 ^a ± 1.5
Clearfil™ SE Bond (negative control)	11.00 ^b ± 1.0
Clearfil™ Protect Bond (positive control)	17.00 ^a ± 1.7

Legend: the different superscript letters indicate significant differences ($p<0.05$) between the diameters of inhibition zones

Clearfil™ Protect Bond has been widely used in adhesive dentistry due to the presence of their antibacterial monomer MDPB which is considered to be beneficial for reducing the risk of secondary caries and improving the longevity of restorations [4,30]. This self-etching adhesive containing MDPB can be particularly recommended in situations where total disinfection of cavity is not accomplished due to lack of accessibility [31] or where a lack of cooperation of children or patients with special needs is observed during restorative procedure. Regarding that Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP demonstrated similar results as compared to Clearfil™ Protect Bond in inhibition of *S. mutans*, it is possible to suggest that the innovative quaternary ammonium methacrylate polymer offer a feasible system to disinfect cavities containing residual bacteria. Despite Clearfil™ SE Bond was used as negative control, this self-etching

adhesive system also provided an antibacterial effect against *S. mutans*. This behavior can be explained because the primer of Clearfil™ SE Bond contains 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate and this acidic monomer can contribute to the reduction of bacterial count [32]. However, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP presented statistically increased values of inhibition zones which also demonstrate the enhanced antibacterial effect of the studied quaternary ammonium methacrylate polymer.

3.4.2. Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration assays. In order to provide reference concentrations regarding the antimicrobial activity of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP as compared to Clearfil™ Protect Bond for further use in dentistry, MIC and MBC tests were also performed.

The MIC values for the investigated adhesive systems were estimated using MIC₉₀, a concentration of an antimicrobial agent that causes 90% decrease in absorbance by preventing the suspension of 10^5 CFU.mL⁻¹ microbial stain from becoming turbidity [33], as presented in Figure 7. Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed MIC = 20 μ L.mL⁻¹ while Clearfil™ Protect Bond had MIC = 10 μ L.mL⁻¹. These adhesive systems were able to provide a higher effect against *S. mutans* than Clearfil™ SE Bond that exhibited MIC = 80 μ L.mL⁻¹.

MIC is considered the gold standard for determining the susceptibility of organisms to antimicrobials and is also used to judge the performance of all other methods of susceptibility testing [34]. Therefore MIC is a good starting point to investigate the potential of novel antimicrobial agents as the studied self-etching dental adhesive system prepared by adding 5% QAMP to Clearfil™ SE Bond.

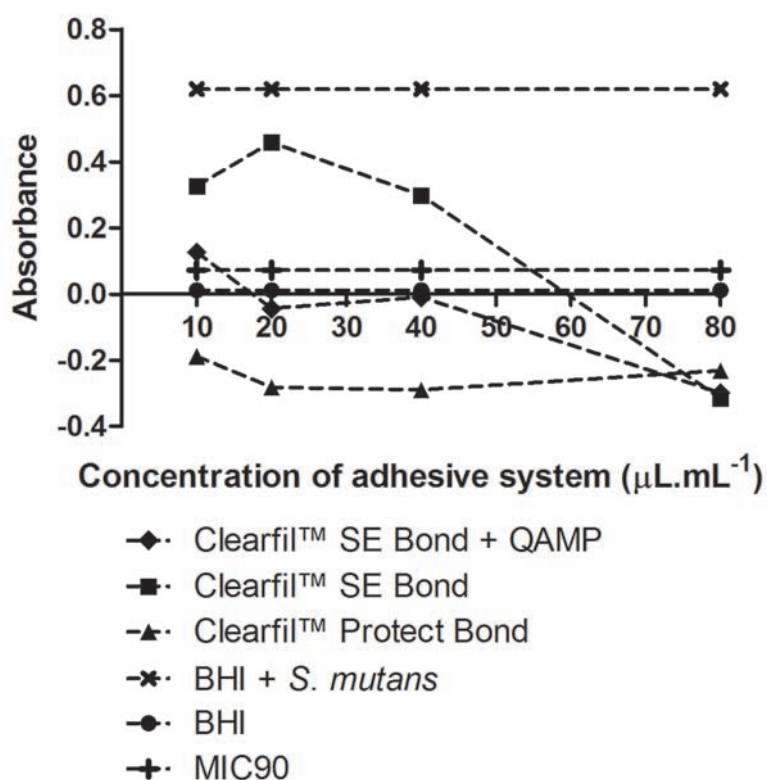


Figure 7. Absorbance values concerning the microbial growth of *S. mutans* in presence of different concentrations of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ SE Bond, and Clearfil™ Protect Bond. MIC value for each adhesive system was determined by comparing to MIC90. BHI broth and BHI broth containing *S. mutans* culture were used as reference parameters.

The results obtained in MBC assay are represented in Figure 8. No bacterial growth (score = 0) that corresponded to MBC value was observed in 20 and 10 μL.mL⁻¹, respectively for Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP and Clearfil™ Protect Bond. These adhesives systems also demonstrated a higher lethality against *S. mutans* than Clearfil™ SE Bond which presented a MBC value = 80 μL.mL⁻¹.

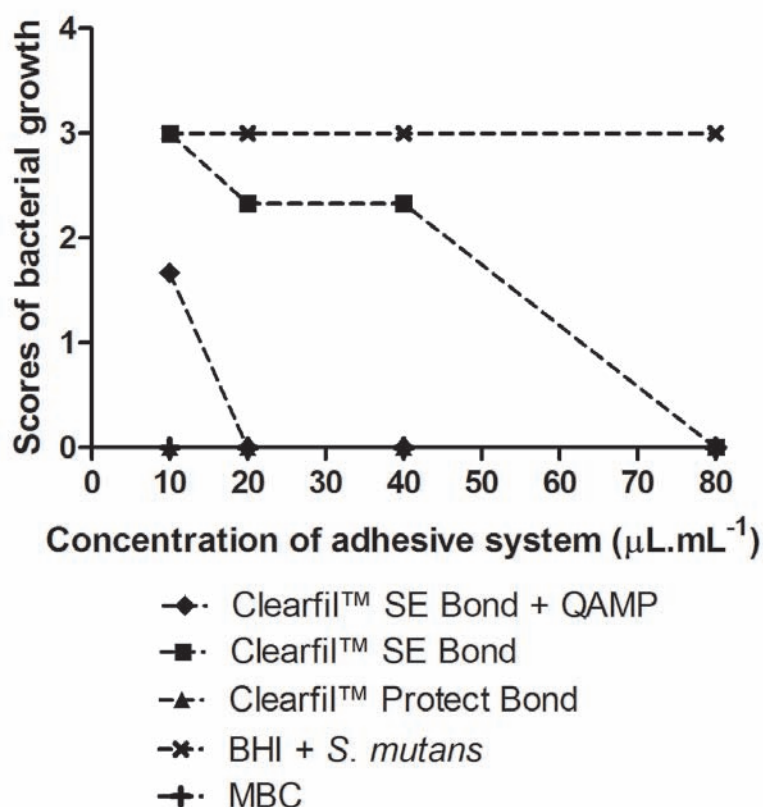


Figure 8. Scores obtained from the microbial growth of *S. mutans* in presence of different concentrations of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ SE Bond, and Clearfil™ Protect Bond. MBC value for each adhesive system was determined as the eradication concentration which provided a score = 0. BHI broth containing *S. mutans* culture was used as reference parameter. Scores: 0 = no bacterial growth; 1 = rare bacterial colonies; 2 = moderate bacterial growth; 3 = strong bacterial growth.

MBC is the lowest concentration of an antimicrobial agent required to kill the microorganism. Although MIC is widely used in clinical setting, the elimination of the pathogen indicated by MBC is evidently a more relevant outcome due to it confirms the bactericidal potential of an antimicrobial agent [35]. In that sense, an antimicrobial substance is considered bacteriostatic when MBC/MIC ratio is greater than or equal to 16 for the pathogen isolated. When MBC/MIC ratio is less than or equal to 4, the agent is considered bactericidal [36]. In the present study, MBC was equal to MIC which confirms the

bactericidal effect of the evaluated adhesive systems. The antimicrobial properties of these polymeric quaternary ammonium salts can be related to four mechanisms as previously reported: (1) adsorption onto the negatively charged bacterial cell surface; (2) penetrating the cell wall; (3) binding to the cytoplasmic membrane; and (4) damaging the cytoplasmic membrane [16]. Moreover MBC reveals a further advantage in order to confirm the antimicrobial potential of adhesive system. This test is based on a subculture procedure that avoids the influence of an additional turbidity provided by the adhesive system that could lead to inappropriate results for MIC.

Considering MIC/MBC results, Clearfil™ Protect Bond showed better antimicrobial values than the experimental adhesive system (Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP). However only Clearfil™ Protect Bond contains fluoride in its bonding resin that can provide an additional antimicrobial effect. In that sense, the presence of fluoride may have led to the improved results achieved for this commercial adhesive system.

3.5. Release of quaternary ammonium compounds from the adhesive systems

As demonstrated in Figure 9, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed a cumulative release of quaternary ammonium compounds of only 5.1% while Clearfil™ Protect Bond released 47.2% of MDPB after 30 days. Clearfil™ SE Bond presented no release of quaternary ammonium compounds as expected.

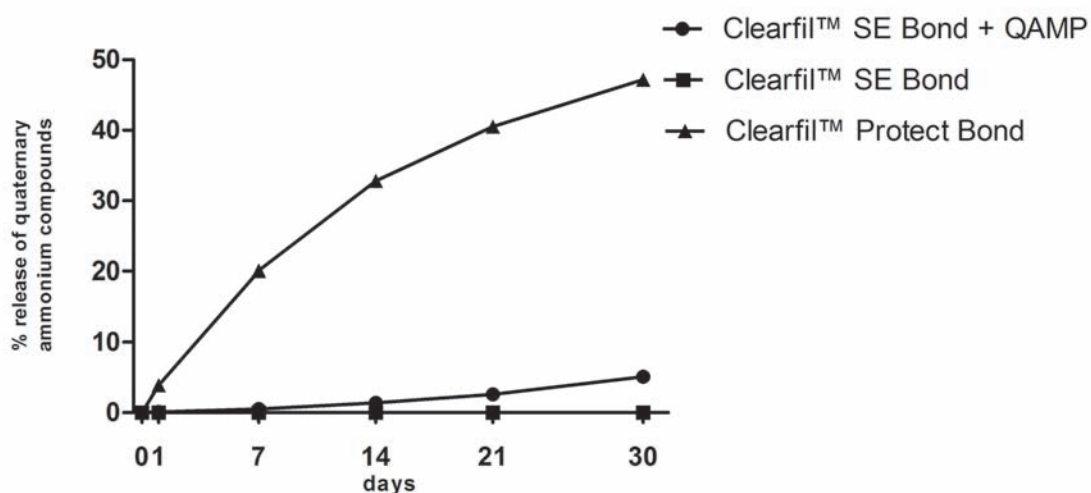


Figure 9. Release profile of the quaternary ammonium compounds from the adhesive systems

Feuerstein and colleagues [33] performed a study to investigate the immediate and long-lasting antibacterial properties of four self-etching adhesive systems including Clearfil™ Protect Bond during 14 days. Clearfil™ Protect Bond exhibited potent antibacterial effect for seven days. But no antibacterial result against *S. mutans* was observed after 14 days.

Regarding the current results provided by the release experiments, QAMP could be considered an innovative antimicrobial approach for the development of new dental adhesive systems due to its polymeric structure in order to prevent the rapid release of quaternary ammonium molecules in contrast to that observed for the commercial product containing MDPB.

In general, these findings indicate that QAMP can provide improved antibacterial effect for commercial self-etching adhesive systems that can be particularly recommended for reducing recurrent caries. However additional studies of induction of artificial caries lesions (pH-cycling and microbiological methods) and *in situ* antibacterial activity of the experimental adhesive systems containing QAMP are still in progress. Further investigations are also needed to clarify whether the antibacterial activity of QAMP can be kept after its incorporation into resin-based restorative materials. Moreover its effect on the mechanical properties and degree of conversion of adhesive systems remains to be investigated in further manuscripts.

4. Conclusions

The quaternary ammonium methacrylate polymer QAMP was successfully obtained by a simple one-step exhaustive alkylation as confirmed by FTIR, ^1H and ^{13}C -DEPT NMR data. A high degree of quaternization was also demonstrated. Thermogravimetric analysis indicated that the QAMP is heat-stable before 130°C which is appropriate for dental proposes. Prior incorporation into adhesive system, QAMP exhibited suitable inhibition against *S. mutans*. Concerning the antimicrobial potential, the experimental self-etching dental adhesive system prepared by adding QAMP to Clearfil™ SE Bond showed inhibition values that were comparable to Clearfil™ Protect Bond. Further antimicrobial tests supported that Clearfil™ SE Bond containing QAMP provided a bactericidal effect. Therefore this innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can offer a feasible system to disinfect cavities containing residual bacteria during restorations and can be useful for treating children or patients with special needs that exhibit low levels of cooperative social behavior and for management of root surface caries or caries with lack of accessibility.

The release of quaternary ammonium compounds from the experimental adhesive containing QAMP was very low when compared to Clearfil™ Protect Bond after 30 days. Therefore QAMP is a nonvolatile and chemically stable polymer due to its high molar mass and showed a lower migration from the dental adhesive system as compared to MDPB, a chemically-related quaternized monomer. Thus this antimicrobial activity can be maintained for a longer time. Furthermore these data can also pave the way for future development of other polymeric quaternary ammonium salts to provide additional benefices to dental adhesive system widely used in dentistry.

Acknowledgments

The authors thank to Postgraduate Program in Dentistry of State University of Ponta Grossa for providing infrastructure, constant support and encouragements. Y. M. Pupo wishes also to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a research grant. The authors have no direct relation or financial involvement with any

commercial organization with interest in the subject or materials discussed in this paper.

References

- [1] Dizman B, Elasri MO, Mathias LJ. Synthesis and antimicrobial activities of new water-soluble bisquaternary ammonium methacrylate polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004;94:635–642.
- [2] Abel T, Cohen JI, Engel R, Filshtinskaya M, Melkonian A, Melkonian K. Preparation and investigation of antibacterial carbohydrate-based surfaces. *Carbohydr. Res.* 2002;337:2495–2459.
- [3] Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J. Oral Rehabil.* 2001;28:314–319.
- [4] Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of clearfil protect bond. *Dent. Mater.* 2006;22:527–532.
- [5] Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral Streptococci. *Oper. Dent.* 2010;35:448–453.
- [6] Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y. Immobilization of an antibacterial component in composite resin. *Dent. Jpn.* 1993;30:63–68.
- [7] Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RRB. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J. Dent. Res.* 1994;73:1437–1443.
- [8] Imazato S, Russell RRB, McCabet JF. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. *J. Dent.* 1995;23:177–181.
- [9] Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RRB, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials.* 1999;20:899–903.
- [10] Xiao YH, Chen JH, Fang M, Xing XD, Wang H, Wang YJ, Li F. Antibacterial effects of three experimental quaternary ammonium salt (QAS) monomers on bacteria associated with oral infections. *J. Oral Sci.* 2008;50:323–327.

- [11] Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F, Wang YJ. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 2009;90:813–817.
- [12] Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L, Fang M, Chen JH. Antibiofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. *J. Dent. Res.* 2009;88:372–376.
- [13] Li F, Chen J, Chai Z, Zhang L, Xiao Y, Fang M, Ma S. Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. *J. Dent.* 2009;37:289–296.
- [14] Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2003. p. 125–131.
- [15] Barney R, Stark T, Deleat D. Synthesis and surfactant studies of dialkyl dimethyl quaternary ammonium bromide formulations. *Am. J. Undergrad. Res.* 2005;5:1–5.
- [16] Lu G, Wu D, Fu R. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React. Funct. Polym.* 2007;67:355–366.
- [17] Nurdin N, Helary G, Sauvet G. Biocidal polymers active by contact. II. Biological evaluation of polyurethane coatings with pendant quaternary ammonium salts. *J. Appl. Polym. Sci.* 1993;50:663–670.
- [18] Menschutkin N. Über die Affinitätskoeffizienten der Alkylhaloide und der Amine. *Z. Phys. Chem.* 1890;6:41–57.
- [19] Mendes JBE, Riekes MK, Oliveira VM, Michel MD, Stulzer HK, Khalil NM, Zawadzki SF, Mainardes RM, Farago PV. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. *Sci. World J.* 2012;2012:1–13.
- [20] Pazhanisamy P, Ariff M, Anwaruddin Q. Synthesis and characterization of quaternary ammonium ionomers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2005;98:1100–1105.
- [21] Bucci R, Balestrieri F, Magrì AD, Magrì AL, Marini F. UV–vis spectrophotometric method for the quantitation of all the components of Italian general denaturant and its application to check the conformity of alcohol

samples. *Talanta* 2006;68:781–790.

[22] Farago PV, Raffin RP, Pohlmann AR, Guterres SS, Zawadzki SF. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *J. Braz. Chem. Soc.* 2008;19:1298–1305.

[23] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI document M100–S21 (ISBN 1-56238-742-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, USA (2011).

[24] Karamoddini MK, Fazli-Bazzaz BS, Emamipour F, Ghannad MS, Jahanshahi AR, Saed N, Sahebkar A. Antibacterial efficacy of lytic bacteriophages against antibiotic-resistant *Klebsiella* species. *Sci. World J.* 2011;11:1332–1340.

[25] Yang SY, Cho SJ. Formation of organophilic [DEACOOH]/montmorillonite intercalation complexes. *J. Ind. Eng. Chem.* 2005;11:62–65.

[26] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy. 4th ed. Belmont (CA): Brooks/Cole Cengage Learning; 2009. p. 15–94.

[27] Patrick G. Instant notes in Organic Chemistry. 2nd ed. New York (NY): Garland Science; 2012. p. 323–336.

[28] Ratnaparkhi MP. Formulation and development of taste masked orally disintegrating tablets of perindopril erbumine by direct compression method. *Pharmaceut. Anal. Acta.* 2012;3:1–10.

[29] Borman S. Designed surface kills bacteria. *Chem. Eng. News.* 2002;80:36–38.

[30] Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent. Mater.* 2003;19:313–319.

[31] Hedge MN, Hedge P, Shetty V, Sampath PB. Assessment of antibacterial activity of self-etching dental adhesive systems: an in vitro study. *J. Conserv. Dent.* 2008;11:150–153.

- [32] Başeren M, Yazici AR, Ozalp M, Dayangaç B. Antibacterial activity of different generation dentinbonding systems. *Quintessence Int.* 2005;36:339–344.
- [33] Feuerstein O, Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J. Am. Dent. Assoc.* 2007;138:349–354.
- [34] Shreaz S, Bhatia R, Khan N, Muralidhar S, Manzoor N, Khan LA. Influences of cinnamic aldehydes on H⁺ extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. *J. Med. Microbiol.* 2013;62:232–240.
- [35] Liu YQ, Zhang YZ, Gao PJ. Novel concentration-killing curve method for estimation of bactericidal potency of antibiotics in an in vitro Dynamic Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:3884–3891.
- [36] Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 2004;38:864–870.

4.2. Capítulo 2: Avaliação da permeabilidade vascular de sistemas adesivos com potencial antimicrobiano em subcutâneo de ratos

Apresentação

O mecanismo de ação dos materiais resinosos, especialmente de seus componentes isolados ou em combinação, não está completamente esclarecido [Costa, Hebling⁵³ 2006]. Todavia, os testes de citotoxicidade em cultura de células e de biocompatibilidade em subcutâneo de ratos podem determinar o potencial agressivo dos materiais sobre as células e direcionar os cuidados que devem ser tomados quando da utilização e recomendação de aplicação desses materiais em procedimentos clínicos [Costa, Hebling⁵³ 2006]. A maioria das pesquisas revela que os componentes solúveis liberados pelos materiais resinosos experimentais, particularmente os diluentes de baixo peso molecular, são os principais responsáveis pela citotoxicidade *in vitro* [Costa, Hebling⁵³ 2006; Hanks *et al.*⁵⁴ 1992]. Neste sentido, o potencial irritativo de resinas adesivas aplicadas diretamente sobre a dentina não depende apenas do potencial citotóxico de seus componentes, mas também da sua capacidade de interdifusão por meio dos túbulos de dentina [Nagem-Filho *et al.*⁵⁵ 2003]. Assim, é fundamental analisar a biocompatibilidade dos sistemas adesivos, a fim de compreender o seu comportamento após contato íntimo com o complexo dentino-pulpar [Nagem-Filho *et al.*⁵⁵ 2003].

Aliado ao teste de implante ou inoculação de produtos em subcutâneo de animais, um método usual é atribuído pela avaliação do aumento da permeabilidade vascular envolvendo a coloração da albumina do plasma sanguíneo com Azul de Evans [Manaenko *et al.*⁵⁶ 2011; Nicolau *et al.*⁵⁷ 1993]. Durante as fases iniciais do processo inflamatório, o extravasamento de proteínas do plasma e da água ocorre como resultado desta alteração [Zhang, Wolf⁵⁸ 1991]. Assim, a análise do grau de inflamação em diferentes grupos experimentais possibilita estabelecer a melhor biocompatibilidade, colocando o material em contato com tecidos vascularizados e observando as diferentes reações [Santos *et al.*⁵⁹ 2010].

Outro método apresentado neste capítulo é a determinação fluxométrica por laser-Doppler, considerado um método não invasivo e indolor para medir o

fluxo de sangue e o conteúdo de eritrócitos em tecidos e órgãos [Grga *et al.*⁶⁰ 2010]. Durante as fases exsudativas do processo inflamatório, a microcirculação é alterada influenciando a velocidade e o número de células do sangue em movimento. Por conseguinte, o laser-Doppler é um procedimento fluxométrico viável para investigar diferenças de permeabilidade vascular.

Frente ao exposto, dados adicionais para suportar uma utilização clínica segura de um sistema adesivo autocondicionante com incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] é requerido. Assim, este capítulo tem como objetivo relatar o efeito deste adesivo dental na permeabilidade vascular utilizando os métodos azul de Evans e fluxometria por laser-Doppler a fim de fornecer informações sobre a sua influência na fase exsudativa do processo inflamatório no tecido subcutâneo de ratos.

4.2.1. Artigo do capítulo 2:

Effect on vascular permeability of a self-etching adhesive system containing an antimicrobial quaternary ammonium polymer QAMP into subcutaneous tissue of rats

Running title: **Rat subcutaneous tissue response to QAMP**

Yasmine Mendes Pupo¹, Paulo Vitor Farago², Ana Cristina Kovalik¹,
Fábio André dos Santos¹, Jessica Mendes Nadal², Milton Domingos Michél³,
Osnara Maria Mongrue Gomes¹, João Carlos Gomes¹

¹ *Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa;* ² *Laboratory of Pharmaceutical Products, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa;* ³ *Department of Materials Engineering, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil*

Abstract

This study investigated the effect of a self-etching adhesive system (Clearfil™ SE Bond) containing an innovative antimicrobial quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) on the vascular permeability using Evans blue and laser-Doppler flowmetric methods in order to provide some insights about its influence on the exudative phase of the inflammatory process in the subcutaneous tissue of rats. Concerning the Evans blue method, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed an extravasation area statistically similar to Clearfil™ SE Bond and statistically lower than Clearfil™ Protect Bond. No statistical difference was verified among experimental groups for the amount of dye extracted using formamide. In general, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP provided better laser-Doppler flowmetric parameters than Clearfil™ Protect Bond and was more suitable than Clearfil™ SE Bond. Thus these results support that the experimental adhesive system containing QAMP had lower effect on the exudative phase of the inflammatory process than is indicative of an adequate biocompatibility.

Keywords: Acute-phase reaction, Evans blue, Inflammation, Laser-Doppler flowmetry, Quaternary ammonium compounds.

1 Introduction

Self-etching dental adhesives systems with antimicrobial potential have been widely studied in order to prevent recurrent caries and to provide longevity for dental restoration. In general, this antibacterial effect is related to quaternized monomers containing cationic groups as 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) that are able to prevent cariogenic bacterial colonization (1-4). However these monomers are partially polymerized and their long-lasting antibacterial properties can be reduced (5). In order to avoid these risks, our research group recently developed a novel quaternary ammonium methacrylate polymer [poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl

methacrylate-co-butyl methacrylate)] with suitable properties for dental proposes using a simple one-step alkylation. This innovative product was then incorporated into self-etching adhesive systems and provided an enhanced antibacterial effect against *Streptococcus mutans* (6).

Despite great progress concerning new dental polymers, their use as dental products is still controversial due to the high interdiffusion ability through dentin tubules of the volatile primers combined with their irritative potential for the pulpal connective tissue cells. In that sense, quaternary ammonium compounds can show cytotoxicity to human pulpal cells, which requires their use in low concentration to ensure clinical safety (7). In addition, it is well-known that monomers containing reactive vinyl group as 2-hydroxyethyl methacrylate produced cytotoxic effects on human pulpal cells (8). In spite of their advantages as nonvolatile, chemically stable and not permeate through the oral mucosa, methacrylate polymers containing quaternary ammonium groups as poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate) (QAMP) also need to be evaluated on their potential toxic effects, mainly when incorporated into dental adhesive systems due to the clinical use.

In order to avoid or limit pulp tissue irritation or degeneration and to provide safety data for clinical use, several investigations about cytotoxicity in cultured cells and subcutaneous biocompatibility/vascular permeability have been carried out for dental materials (9-11). As a simple, low cost and easy handling approach, subcutaneous implantation/inoculation model using rats has been successfully performed in previous studies to evaluate the biocompatibility and vascular permeability of a variety of endodontic drugs, prosthetic materials, topical anesthetics and dental adhesives (12-16). In particular, vascular permeability studies can provide supporting data concerning the exudative phase of inflammatory process when phlogistic agents as novel dental materials are in contact with the connective tissue of rats. These investigations are crucial to have a better understanding of their behavior since they tend to get an intimate contact with the pulp-dentin complex.

A usual method for evaluating the vascular permeability involves the staining of plasma serum albumin with Evans Blue (17). The major property of Evans Blue stain is its ability to bind to serum albumin immediately after stain injection into the blood stream (18). During the initial phases of inflammatory process, extravasation of plasma proteins and water occurs as a result of increased vascular permeability (19). Considering that Evans Blue can pass through gap between endothelial cells as small as 7 nm, this stain also binds to albumin related to the exudative process (20). Thus a spectrophotometric determination of Evans Blue stain accumulation is an easy procedure to estimate changes in vascular permeability (17).

The laser-Doppler flowmetric determination is a noninvasive and painless method for measuring blood flow and erythrocyte content in tissues and organs (21). This device also allows examining detailed information regarding spatio-temporal hemodynamic characteristics (22). When laser light is directed into a tissue, the light is scattered by both stationary tissue matrix and moving elements in the blood vessels, mainly red blood cells (23). Light scattered by the tissue matrix retains its original frequency whereas light scattered by blood components is Doppler shifted (23). Spectral analysis can determine the average frequency shift as an index of the average velocity of the blood cells and the extent of spectral broadening as an index of the number of moving blood cells generating Doppler events, which are designated as blood volume or concentration of moving blood cells (CMBC) (23). In microcirculation, the product of average velocity times the concentration of moving blood cells is the flux of blood within the sampling volume of the tissue (23). During the exudative phases of inflammatory process, microcirculation is changed which alters the velocity and the number of moving blood cells. Consequently, laser-Doppler flowmetric procedure is a feasible method to investigate differences in vascular permeability.

Considering that further data for supporting a safe clinical use of a self-etching adhesive system containing the innovative quaternary ammonium polymer poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate) is

required, this paper aims at reporting the effect of this dental adhesive on the vascular permeability using Evans Blue and laser-Doppler flowmetric methods in order to provide some insights about its influence on the exudative phase of the inflammatory process in the subcutaneous tissue of rats.

2 Material and Methods

This study was performed in accordance to the Ethical Principles of Animal Experimentation of COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) and was approved by the local Research Ethics Committee under protocol #09617/2011.

Forty 2-3 month-old male rats (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar) weighing between 200 and 250 g were used. The animals were kept in an acclimatized room and received a balanced diet and water *ad libitum*. The tested substances were divided into four groups: 0.9% saline solution (control); Clearfil™ Protect Bond (a commercially available self-etching adhesive system with well-known antimicrobial potential); Clearfil™ SE Bond (a widely used two-step self-etching adhesive system); Clearfil™ SE Bond containing 5% of the quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) that was previously obtained for our research group (6). Detailed composition of the adhesive systems are described in Table 1. The rats (n=5) were anesthetized with an intraperitoneal injection (ketamine 75 mg/kg and xylazine 10 mg/kg). The dorsal skin was shaved and disinfected with 5% iodine in alcohol.

Table 1 - Adhesive Systems: Composition and Batch #

Adhesive Systems	Composition	Batch #
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, water, QAMP . Bond: MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica.	Primer: 00969A Bond: 01441A
Clearfil™ Protect Bond	Primer: MDPB, MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, water. Bond: MDP, HEMA, Bis-GMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica, surface-treated sodium fluoride.	Primer: 00083A Bond: 00136A
Clearfil™ SE Bond	Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, water. Bond: MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica.	Primer: 00969A Bond: 01441A
Abbreviations: MDP (10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate); HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate); Bis-GMA (bisphenol-glycidyl methacrylate); MDPB (12-methacryloyloxydodecyl pyridinium bromide); QAMP [poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate)]		

2.1 Evans blue method

Initially, the injections of 2% Evans blue (20 mg/kg) was administrated intravenously using a 28-30 gauge needle that was inserted about 2 mm into the gingival vein (24).

In order to investigate the effect on vascular permeability, 0.1 mL of each adhesive system, obtained by using equal aliquots of primer and bond, was injected intradermally into two different experimental sites (lower and higher) and light-cured with LED (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brazil) for 10s. This procedure was also performed for 0.9% saline solution, excluding light-cure. The lateral-medium back received no treatment and was used as control.

The animals were euthanized 3 and 6 hours after injection of the each adhesive system. The dorsal skin was dissected and removed. The experimental sites were then obtained using a 3/4-inch hollow punch and weighed on an analytical balance (Shimadzu, Japan). These samples were

photographed (Nikon D40 digital camera, Tokyo, Japan equipped with a Nikon 105-mm macro lens) and images of 6.2 megapixels were obtained. For image analysis, the software Image Pro Plus™ Version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, Bethesda, MD, USA) was used. These stored digitalized images were not enhanced or transformed. Each image was calibrated individually with a standard scale in millimeters. The vascular permeability was evaluated by measuring the dye extravasation area (mm²). Three measurements at each different experimental site were taken for each animal and the mean was calculated. The same examiner performed all the measurements after testing the data reproducibility.

In addition, each experimental site of 3/4-inch diameter was cut into small fragments and the Evans blue dye was extracted after immersion in 7 mL of formamide of molecular biology grade (99.9%) for 72 h at 37°C. After centrifugation at 2,500 rpm for 10 min and filtration using glass wool, 200 µL of each sample was placed into a 96-well plate. The absorbance was measured at 630 nm in a spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). The total amount of dye extracted from each sample was calculated using a previously standard analytical curve within a range of 1 to 20 µg/mL.

2.2 Laser-Doppler flowmetric method

After anesthesia procedure, the blood flow was measured at the same experimental sites as a basal value for cutaneous microcirculation using a laser-Doppler imaging apparatus (Moor LDI, Moor Instruments, mAxminster, UK) that consisted of a system for issuing red helium-neon laser of low intensity which operated with a wavelength of 633 fÅm. Each adhesive was intradermally injected and light-cured as previously described. The vascular permeability was evaluated after 3 and 6 hours by measuring blood flow and erythrocyte content. Briefly, the probe skin PH1-V2 was fixed on the dorsal skin of animals using a double adhesive tape. Three 30 seconds-long measurements were performed at each experimental site in order to investigate the blood flux. This assay was also carried out for 0.9% saline solution as control, excluding light-cure. An untreated area on the dorsal skin of each animal was used as baseline. Experimental data were analyzed using the moorVMS-LDF™ application

software and expressed as blood flow and concentration of moving blood cells (CMBC).

Statistical analysis

Concerning the dye extravasation area, the intra-examiner reproducibility was analyzed by the Bland-Altman test and intraclass correlation coefficient. The normality of the distribution of data was confirmed using the Kolmogorov-Smirnov test. For Evans blue assay, comparisons among groups were tested by one-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc* test. Laser-Doppler flowmetric data were tested by two-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test. The significance level was set at $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$). The analyses were performed using GraphPad Prism 5.00™ (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

3 RESULTS

3.1 Evans blue method

Concerning the extravasation area (mm^2) of the blue dye, the intra-examiner intraclass correlation coefficient was 0.98 and the Bland-Altman plot resulted a suitable agreement. Therefore both tests demonstrated the accuracy of examiner. The dye extravasation areas (mm^2) obtained for each adhesive system are summarized in Figure 1. Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed mean extravasation areas of 31.81 and 58.06 mm^2 , 3 and 6 h after intradermal injection, respectively. Although these mean values were lower than those verified for both commercial adhesive systems, statistically significant difference on vascular permeability ($p < 0.05$) was only observed between Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP and Clearfil™ Protect Bond (positive control).

The exudative phase of the inflammatory process was also investigated by extracting the dye using formamide as represented in Figure 2. Mean concentrations of Evans blue of 3.854 and 2.161 $\mu\text{g}/\text{site}$ were obtained for Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, 3 and 6 h after intradermal injection, respectively. This modified adhesive system showed no significant difference to Clearfil™ Protect Bond and Clearfil™ SE Bond ($p > 0.05$).

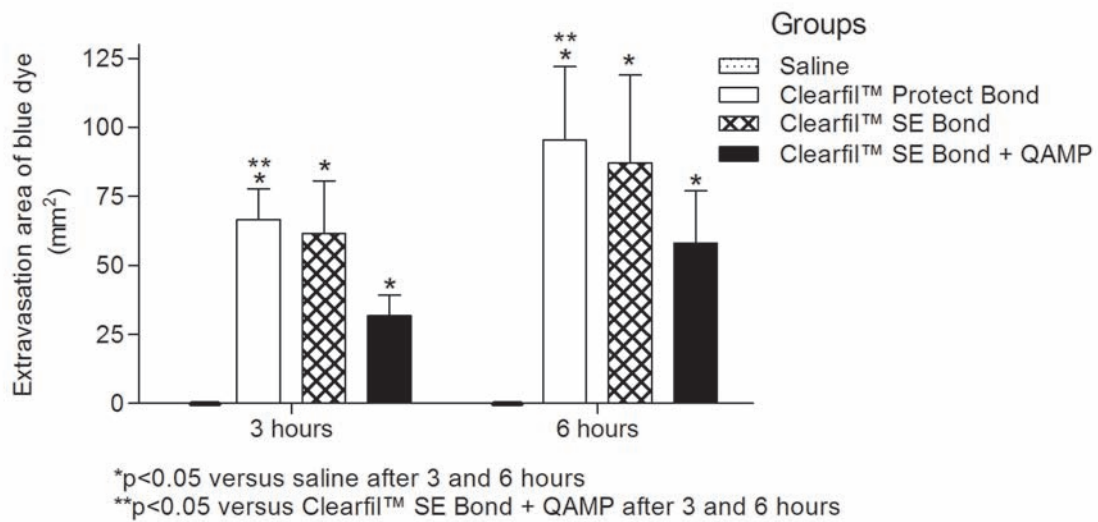


Figure 1. Extravasation area (mm²) of blue dye in dorsal skin tissue of rats for the experimental groups, 3 and 6 h after intradermal injection

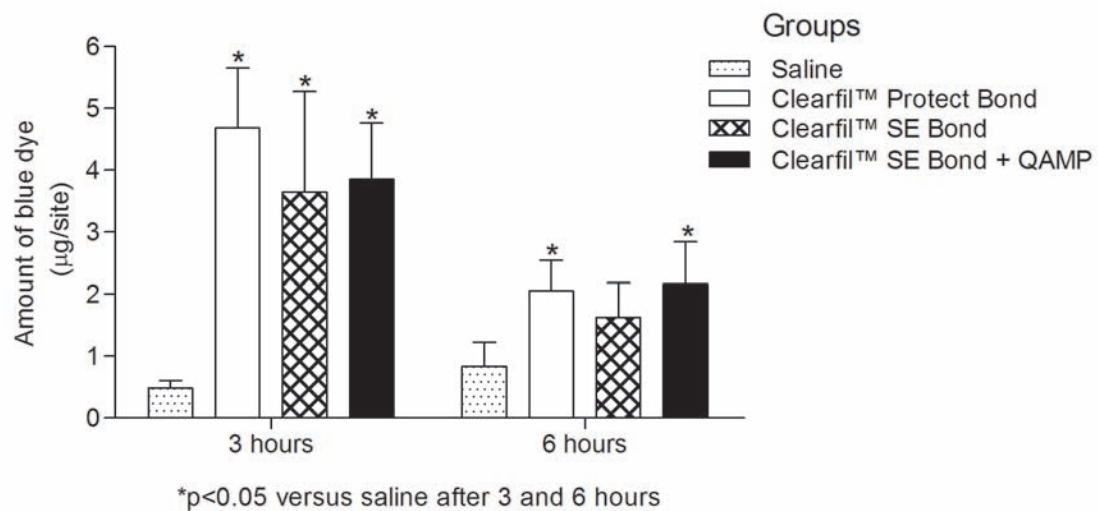


Figure 2. Amount of dye extracted (µg/site) using formamide for the experimental groups, 3 and 6 h after intradermal injection

3.2 Laser-Doppler flowmetry (LDF)

Changes of blood flow in perfusion units (PU) verified for adhesive systems and saline are demonstrated in Figure 3. Baseline values of 79.97 ± 11.07 , 70.05 ± 8.61 , and 73.84 ± 12.08 PU were achieved for the untreated areas immediately, 3, and 6 h after intradermal injection, respectively.

Regarding these reference data, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed a mean reduction rate in blood flow of 0.42 PU immediately after injection, 23.18 PU after 3 h, and 38.23 PU after 6 h. This experimental adhesive system demonstrated a significantly lower reduction rate in blood flow ($p < 0.05$) compared to Clearfil™ Protect Bond immediately and 3 h after injection. Similarly, a statistically significant difference between Clearfil™ SE Bond and Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP ($p < 0.05$) was observed only immediately after intradermal injection.

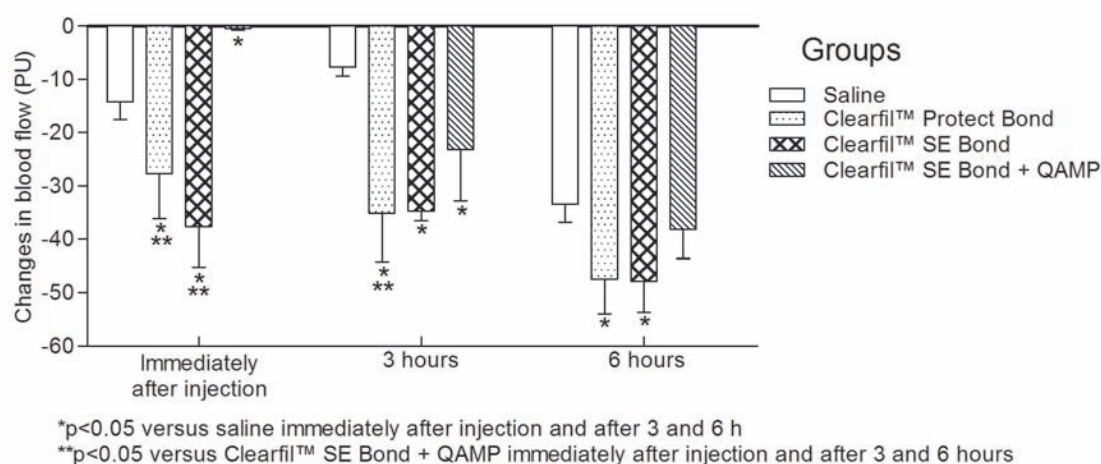


Figure 3. Changes in blood flow for the experimental groups immediately, 3, and 6 h after intradermal injection

Laser-Doppler measurements were also performed by concentration of moving blood cells (CMBC) in arbitrary units (AU) as shown in Figure 4. CMBC values of 204.18 ± 15.88 , 214.22 ± 12.52 , and 209.86 ± 21.41 AU were obtained as baseline for the untreated areas immediately, 3, and 6 h after intradermal injection, respectively. Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP exhibited a mean reduction in CMBC of 0.75 AU immediately after injection, 62.37 AU after 3 h, and 74.17 AU after 6 h. A significantly lower reduction in CMBC ($p < 0.05$) was observed to Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP compared to Clearfil™ Protect Bond in all evaluated time intervals. The experimental adhesive system had also a statistically significant difference versus Clearfil™ SE Bond ($p < 0.05$) immediately and 6 h after injection.

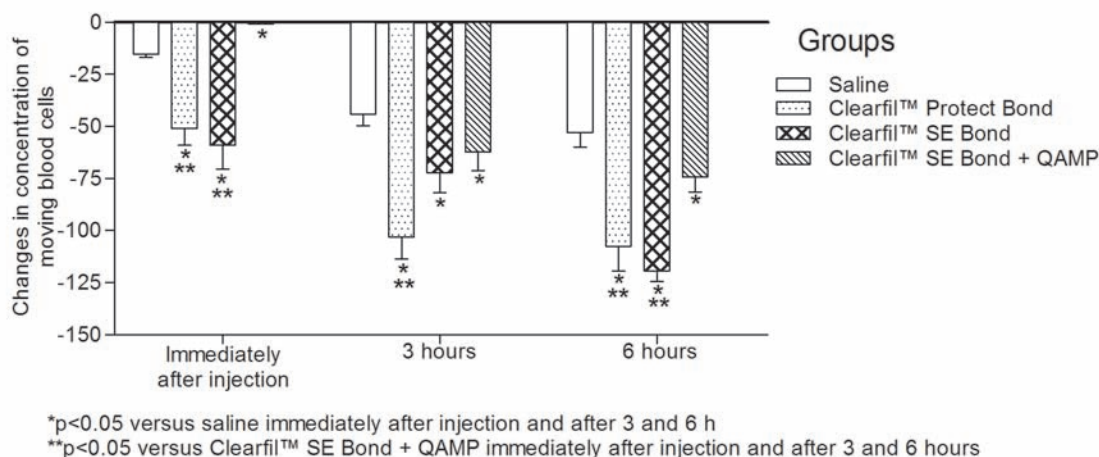


Figure 4. Changes in CMBC for the experimental groups immediately, 3, and 6 h after intradermal injection

4 DISCUSSION

Whereas an antimicrobial potential are required for dental materials, data about their irritative potential are also needed. In a previous paper, our research group reported the synthesis of a novel quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) using a one-step alkylation and demonstrated its antimicrobial potential after incorporating into dental adhesive system (6). However the biocompatibility of this adhesive system containing QAMP investigated as its effect on vascular permeability is even lacking in order to provide further evidence about its interrelationship with dental pulp and periodontal tissues.

Regarding the general biocompatibility of dental adhesives, the literature confirms that quaternary ammonium monomers incorporated into adhesive systems showed cytotoxicity on cells of dentin-pulp complex (25,26). Considering that the chemical structure can influence the cytotoxicity of dental materials, QAMP show a polymeric structure with high molecular weight, which can reduce its interdiffusion through dentin and can provide a lower irritating potential for dental use. In order to assess this hypothesis and to ensure a safe clinical use, the effect of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP on vascular permeability using both Evans blue dye testing and Laser-Doppler flowmetry was performed.

Concerning the Evans blue method, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed a extravasation area statistically similar to Clearfil™ SE Bond and statistically lower than Clearfil™ Protect Bond. No statistical difference was verified among experimental groups for the amount of dye extracted using formamide. These results indicate that QAMP provided no changes in the vascular permeability expected for Clearfil™ SE Bond. In that sense, QAMP did not affect the biocompatibility of the dental material used for its incorporation. Moreover the results verified for extravasation area suggest that Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP can demonstrate a better subcutaneous biocompatibility than Clearfil™ Protect Bond, a commercially available self-etching adhesive system with well-know antimicrobial potential (27-29).

Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed lower statistical changes in blood flow and concentration of moving blood cells (CMBC) than Clearfil™ SE Bond and Clearfil™ Protect Bond immediately after injection in LDF. A statistical difference between Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP and Clearfil™ Protect Bond in blood flow and CMBC was also observed 3 h after injection. Furthermore a statistically significant difference in CMBC was obtained for Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP compared to Clearfil™ SE Bond and Clearfil™ Protect Bond 6 h after injection. Considering that an increase in vascular permeability causes a decrease of blood flow and diminishes the number of moving red blood cells (30), the experimental adhesive system containing QAMP provided, in general, better laser-Doppler flowmetric parameters than Clearfil™ Protect Bond. Moreover Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP was also better than the adhesive system used for its incorporation (Clearfil™ SE Bond) in some of the experimental conditions. Furthermore LDF results were consistent with those observed for the Evans blue method.

Therefore the experimental results support that the experimental adhesive system containing QAMP had lower effect on the exudative phase of the inflammatory process that is indicative of an adequate biocompatibility. In spite of similar studies are limited, present data are consistent with the effect of a quaternary ammonium polymer [poly(benzyltrimethylammonium ethyl

methacrylate chloride), poly(DMAEMA-BC)] on skin damage in rabbits and acute oral toxicity in rats (7). These authors demonstrated that poly(DMAEMA-BC) provided no irritating effect on skin of rabbits and showed an oral LD₅₀ of 3,160 mg/kg for rats which represents a low toxicity level.

In summary, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP showed mild initial inflammatory response when implanted in subcutaneous connective tissue of rats. Similar or improved results of vascular permeability using Evans Blue and laser-Doppler flowmetric methods were observed compared to the evaluated commercial adhesive systems. These data suggest that self-etching adhesive systems containing QAMP are safe for clinical use. Nevertheless further investigations must be carried out to assess the effects on inflammatory cell for longer periods.

5 CONCLUSION

Regarding the Evans blue and laser-Doppler flowmetric methods, our findings demonstrated that Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP provided mild initial inflammatory response when implanted in subcutaneous connective tissue of rats which is indicative of an adequate biocompatibility.

REFERENCES

1. IMAZATO S, KAWAKAMI M, TORII M, TSUCHITANI Y. Antibacterial activity of composites containing chemically bound non-releasing antibacterial component. *J Dent Res* 1992; **72**: 721.
2. IMAZATO S, TORII M, TSUCHITANI Y, MCCABE JF, RUSSELL RRB. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res* 1994; **73**: 1437-1443.
3. IMAZATO S, RUSSELL RRB, MCCABET JF. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. *J Dent* 1995; **23**: 177-181.
4. IMAZATO S, EBI N, TARUMI H, RUSSELL RRB, KANEKO T, EBISU S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 1999; **20**: 899-903.

5. FEUERSTEIN O, MATALON S, SLUTZKY H, WEISS EI. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J Am Dent Assoc* 2007; **138**: 349-354.
6. PUPO YM, FARAGO PV, NADAL JM, ESMERINO LA, MALUF DF, ZAWADZKI SF, MICHÉL MD, SANTOS FA, GOMES OMM, GOMES JC. An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system. *J Biomater Sci Polym Ed* 2013; **24**: 1443-1458.
7. LU G, WU D, FU R. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React Funct Polym* 2007; **67**: 355-366.
8. IMAZATO S, TARUMI H, EBI N, EBISU S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent* 2000; **28**: 61-67.
9. COSTA CAS, TEIXEIRA HM, NASCIMENTO ABL, HEBLING J. Biocompatibility of an Adhesive System and 2-hydroxyethylmethacrylate. *J Dent Child* 1999; **66**: 337-342.
10. HEBLING J, GIRO EMA, COSTA CAS. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod* 1999; **25**: 676-682.
11. COSTA CAS, NASCIMENTO ABL, TEIXEIRA HM, FONTANA UF. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. *Dent Mater* 2001; **17**: 230-240.
12. NAGEM-FILHO H, MONTEIRO CR, NAGEM HD, LAGE-MARQUES JL. Effect of dental adhesives on the exudative phase of the inflammatory process in subcutaneous tissue of rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003; **17**: 109-112.
13. ZMENER O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 2004; **30**: 348-351.
14. ZAFALON EJ, VERSIANI MA, DE SOUZA CJ, MOURA CC, DECHICHI P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers

- implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; **103**: 88-94.
15. SÖNMEZ NS, SÖNMEZ E, AKÇABOY C. Evaluation of biocompatibility of Targis Dentin and Artglass by using subcutaneous implantation test. *Indian J Dent Res* 2010; **21**: 537-543.
 16. POCHAPSKI MT, NETO JL, JASSEN JL, FARAGO PV, SANTOS FA. Effect of lidocaine and prilocaine-based topical anesthetics on the exudative phase of the inflammatory process in subcutaneous tissue of rats. *Anesthesia Progress* 2012; **59**: 57-61.
 17. MANAENKO A, CHEN H, KAMMER J, ZHANG JH, TANG J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods* 2011; **195**: 206-210.
 18. NICOLAU M, SIROIS MG, BUI M, PLANTE GE, SIROIS P, REGOLI D. Plasma extravasation induced by neurokinins in conscious rats: receptor characterization with agonists and antagonists. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; **71**: 217–221.
 19. ZHANG JX, WOLF MB. Effects of cold on microvascular fluid movement in the cat limb. *J Appl Physiol* 1991; **71**: 703–708.
 20. MATTHEW CB, SILS IV, BASTILLE AM. Tissue-specific extravasation of albumin-bound Evans blue in hypothermic and rewarmed rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; **80**: 233-243.
 21. GRGA D, DŽELETOVIĆ B, ŽIVKOVIĆ S, KRŠLJAK E. Blood Flow Measurement by Laser Doppler Method in Orofacial Region. *Serb Dent J* 2010; **57**: 141-148.
 22. NIIOKA T, ISHII H, IZUMI H. Regional differences in blood flow variation in rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 2009; **54**: 1022-1028.
 23. STROHMAIER C, WERKMEISTER RM, BOGNER B, RUNGE C, SCHROEDL F, BRANDTNER H, RADNER W, SCHMETTERER L, KIEL JW, GRABNER G, REITSAMER HA. A novel, microscope based, non-invasive laser Doppler flowmeter for choroidal blood flow assessment. *Exp Eye Res* 2011; **92**: 545-551.

24. OLIVEIRA DT, SOUZA-SILVA E, TONUSSI CR. Gingival Vein Punction: A New Simple Technique for Drug Administration or Blood Sampling in Rats and Mice. *Scand J Lab Anim Sci* 2009; **36**: 109-113.
25. DEMIRCI M, HILLER KA, BOSL C, GALLER K, SCHMALZ G, SCHWEIKL H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008; **24**: 362-371.
26. EL-KHOLANY NR, ABIELHASSAN MH, ELEMBABY AE, MARIA OM. Apoptotic effect of different self-etch dental adhesives on odontoblasts in cell cultures. *Arch Oral Biol* 2012; **57**: 775-783.
27. IMAZATO S, TORII Y, TAKATSUKA T, INOUE K, EBI N, EBISU S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Rehabil* 2001; **28**: 314-319.
28. IMAZATO S, KURAMOTO A, TAKAHASHI Y, EBISU S, PETERS MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater* 2006; **22**: 527-532.
29. ESTEVES CM, OTA-TSUZUKI C, REIS AF, RODRIGUES JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. *Oper Dent* 2010; **35**: 448-453.
30. NÚÑEZ SC, NOGUEIRA GEC, RIBEIRO MS, GARCEZ AS, LAGE-MARQUES JL. He-Ne Laser Effects on Blood Microcirculation During Wound Healing: A Method of In Vivo Study Through Laser Doppler Flowmetry. *Lasers Sug Med* 2004; **35**: 363-368.

4.3. Capítulo 3: Avaliação da resistência de união à microtração de um sistema adesivo autocondicionante com incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] e do grau de conversão e da interface adesiva estabelecida por este sistema

Apresentação

A versatilidade da Odontologia Adesiva incentiva o desenvolvimento constante de novos agentes de adesão, com objetivos de simplificação da sua utilização clínica, reduzindo a sensibilidade técnica dos procedimentos e melhorando o desempenho clínico de restaurações adesivas [Navarra *et al.*⁶¹ 2012].

Dentro deste contexto, os sistemas adesivos autocondicionantes compostos por materiais resinosos convencionais com pH ácido, podem ainda apresentar pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana, podendo estas propriedades serem alteradas ou aprimoradas com a incorporação de outras moléculas com potencial antimicrobiano [Matee *et al.*⁶² 1993; Imazato *et al.*⁵ 1998]. Entretanto, a impossibilidade do controle rigoroso da cinética de liberação destes produtos, devido permanecerem simplesmente dispersos na matriz orgânica dos sistemas adesivos, pode comprometer a estabilidade e consequente resistência adesiva. Para superar os inconvenientes causados por agentes de lixiviação, compostos catiônicos polimerizáveis, ligados covalentemente na matriz polimérica, são constantemente estudados e relatados na literatura.

Nos capítulos anteriores, descreveu-se a síntese, caracterização e análise da permeabilidade vascular do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] com comprovada efetividade antimicrobiana após permanecer quimicamente imobilizado na matriz do sistema adesivo polimerizado. Assim, é desejável avaliar a influência da adição de QAMP na resistência de união *in vitro* de sistemas adesivos, sendo o primeiro passo para assegurar a longevidade dos procedimentos restauradores e reabilitadores na área da Odontologia.

Em continuidade, estudos relatam que uma baixa porcentagem de conversão de monômeros em polímeros em sistemas adesivos está

relacionada com propriedades físico-químicas desfavoráveis, sendo que materiais resinosos polimerizados insatisfatoriamente podem apresentar maior eluição de monômeros que os com maiores graus de conversão, influenciando na estabilidade da adesão [Cadenaro *et al.*⁶³ 2005; Nunes *et al.*⁶⁴ 2006; Hass *et al.*³⁹ 2012; Navarra *et al.*⁶¹ 2012]. Objetiva-se desta forma, no presente capítulo avaliar a resistência de união e também o grau de conversão *in situ* e *in vitro* de um sistema adesivo autocondicionante com incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] em estudo.

4.3.1. Artigo do capítulo 3:

Effect of an antimicrobial adhesive system containing QAMP on bond strength and degree of conversion

Short Title: Bond ability and degree of conversion of an antimicrobial adhesive system

Yasmine M. Pupo^{1,*}, Paulo Vitor Farago^{1,2}, Jessica M. Nadal², Luzia C. Simão³, Milton D. Michél⁴, Osnara M. M. Gomes¹, João Carlos Gomes¹

¹ *Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil*

² *Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil*

³ *Multi-user Laboratory, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil*

⁴ *Department of Materials Engineering, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil*

Disclosure statement: The authors have no conflict of interest or financial involvement with any commercial organization with interest in the subject or materials discussed in this paper.

Abstract

Objectives: This study investigated the resin–dentin bond strength (μ TBS) and degree of conversion (DC) using *in situ* and *in vitro* assays of an antimicrobial adhesive system containing a quaternary ammonium methacrylate polymer [QAMP]. **Methods:** Forty-two human third molars were flattened until the dentin was exposed and were randomly distributed into three experimental groups of self-etching adhesive systems: Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond and Clearfil™ SE Bond. After light curing, three 1 mm-increments of composite resin were bonded to each dentin surface. A total of thirty of these bonded teeth (10 teeth per group) was sectioned to obtain stick-shaped specimens and tested under tensile stress immediately, after 6 and 12 months of storage in distilled water. Twelve bonded teeth (4 teeth per group) were longitudinally sectioned in a mesio-to-distal direction to obtain resin-bonded dentin slabs. *In situ* DC was evaluated by micro-Raman spectroscopy. *In vitro* DC of thin films of each adhesive system was measured using Fourier Transform Infrared spectroscopy. **Results:** No statistically significant difference in μ TBS was observed between Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP and Clearfil™ SE Bond ($p>0.05$) immediately, after 6 and 12 months of water storage. However Clearfil™ Protect Bond showed a significant reduction of μ TBS after 12 months of storage ($p=0.039$). In addition, QAMP provided no significant change in DC after incorporating into Clearfil™ SE Bond. **Significance:** The use of the antibacterial polymer QAMP into adhesive system may provide effective bond strength and suitable degree of conversion.

Keywords: Antibacterial agents; Bond strength; Dentin-bond agents; Quaternary ammonium compounds; Polymerization; Raman spectroscopy.

1. Introduction

Residual bacteria in tooth-restoration interface may increase the risk of recurrent caries which remain as a continuous challenge in dentistry [1,2]. In order to avoid this undesirable condition, adhesive systems should present a

long-lasting antibacterial activity for inactivating bacteria which enter into this interface leading to microleakage [1-3]. In that sense, some antimicrobials freely dispersed into adhesive systems such as antibiotics, glutaraldehyde, and fluorides, were extensively evaluated [4-9]. However these agents show an inappropriate control of the release kinetic and provide a decreased bond strength between restorative material and dentin [10,11].

Other current papers have been devoted to assess the use of quaternary ammonium-based antibacterial monomers into dental resins as 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) [12-20]. MDPB was first synthesized 20 years ago and demonstrated antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, and *Actinomyces naeslundii* [20-23]. This monomer was incorporated into an adhesive system and is now commercially available as Clearfil™ Protect Bond [19].

In spite of the use of quaternary ammonium monomers into adhesive systems may be considered as a feasible approach, some works have reported their limitations. Feuerstein *et al.* [1] performed a study to investigate the immediate and long-lasting antibacterial properties of four self-etching adhesive systems, including Clearfil™ Protect Bond for 14 days. Clearfil™ Protect Bond exhibited an antibacterial effect for only seven days. Moreover, no adhesive system showed antibacterial effect against *S. mutans* in 14 days. Thus the MDPB molecules that were not polymerized were leached out of the adhesive system leading to a reduced antimicrobial effect. In addition, quaternary ammonium compounds of low molecular weight as MDPB may have cytotoxicity to human pulp cells which compromises their clinical safety [23-24].

In a previous paper, our research group investigated an innovative quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP): poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate) [25]. The self-etching adhesive containing QAMP had antibacterial activity against *S. mutans* and was particularly recommended for reducing recurrent caries. Due to its high molecular weight, QAMP demonstrated a lower migration from the adhesive system as compared to MDPB. In addition, QAMP is non-volatile, chemically stable and not

permeable through the oral mucosa contrasting to the main problems of the chemically-related quaternized monomers. However further studies are required in order to evaluate the behavior of QAMP into adhesive systems concerning their physicochemical properties, *e.g.* resin-dentin bond strength (μ TBS) and degree of conversion (DC) which are strongly related to the dental restoration longevity.

The microtensile test is a laboratory procedure used to quantify the bond strength of adhesive biomaterials to tooth substrates [26]. This assay shows a pre-clinical value for dental adhesives, based on the assumption that the stronger the tooth-biomaterial adhesion, the more effectively it will resist to the stress imposed by polymerization shrinkage and oral function [27]. The microtensile test may also provide insights about the strength of adhesion of restorative materials used in dentistry as a function of time [28].

The degree of conversion plays a crucial role in the long-lasting resin/dentin bond study due to monomer conversion after polymerization of light-cured materials may affect various mechanical properties of the adhesive system including the tensile, compressive, and flexural strengths, elastic modulus, wear, and hardness. High DC may also reduce permeability at the bond interface which increases the resistance to degradation [29]. Moreover an incomplete polymerization of adhesive monomers has been reported as one of the reasons for nanoleakages [30].

Taking all these into account, the aim of this paper was to investigate μ TBS and DC of a self-etching adhesive system containing QAMP in order to explore whether this quaternary ammonium methacrylate polymer may affect the dental restoration longevity. The null-hypothesis tested was that there is no difference in bond characteristics and degree of conversion among the primer/bond-resin containing QAMP and other control groups.

2. Materials and Methods

2.1. Teeth selection and preparation

A total of forty-two extracted caries-free human third molars was used. Microtensile bond strength (μ TBS) was performed using 30 teeth whereas

analysis of *in situ* degree of conversion (DC) was carried out with 12 teeth. These teeth were collected after obtaining the patients' informed consent under Protocol Number #17839/10 that was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects from the State University of Ponta Grossa. The teeth were disinfected using 0.5% chloramine, stored in distilled water, and used within six months after extraction. A flat dentin surface was exposed after wet grinding the occlusal enamel on #180-grit silicon-carbide (SiC) paper. The exposed dentin surfaces were further polished on wet #600-grit SiC paper for 60 s to create a standardized smear layer.

2.2 Experimental groups and restorative procedures

Three self-etching adhesive systems were evaluated: Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japan) and Clearfil™ SE Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japan) as negative control. Detailed composition and application mode of these commercial adhesive systems are described in Table 1.

The self-etching adhesive systems were applied onto the dentin in accordance with the manufacturer's instructions. After light curing of each adhesive, three 1 mm-increments of composite resin Filtek™ Z350 XT (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) were bonded to each dentin surface. Each increment was light cured with LED (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brazil) for 30s at 600 mW/cm². All bond procedures were carried out by a single operator at room temperature and constant relative humidity.

Table 1 - Adhesive Systems: Composition, Application Mode and Batch #

Adhesive Systems	Composition	Application Mode	Batch #
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, water, 5% QAMP . Bond: MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica.	- Application of two coats of the primer under pressure (20 seconds); - Gentle air stream (10 seconds at 20 cm) after application of each coat; - Application of one coat of the adhesive (15 seconds); - Gentle air stream to make the bond film uniform (3 seconds at 20 cm); - Light cured (10 seconds at 600 mW/cm²).	Primer: 00954A Bond: 01415A
Clearfil™ Protect Bond	Primer: MDPB, MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, water. Bond: MDP, HEMA, Bis-GMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica, surface-treated sodium fluoride.		Primer: 00081B Bond: 00134B
Clearfil™ SE Bond	Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, water. Bond: MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica.		Primer: 00954A Bond: 01415A

Abbreviations: MDP (10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate); HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate); Bis-GMA (bisphenol-glycidyl methacrylate); MDPB (12-methacryloyloxydodecyl pyridinium bromide); **QAMP** [poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate)]

2.3. Resin–dentin bond strength (μ TBS)

After storing the bonded teeth in distilled water for 24 h at 37°C, thirty teeth (10 teeth per group) were longitudinally sectioned in both the mesio-distal and buccal-lingual directions across the bonded interface using a diamond saw in an Isomet 1000 machine (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) at 300 rpm in order to obtain bonded sticks with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm². The number of premature debonded sticks per tooth during specimen preparation was recorded. The cross-sectional area of each stick was measured with a digital caliper (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tokyo, Japan). The bonded sticks of each tooth were divided to be tested immediately [IM], after six [6M], and 12 months [12M] of storage in distilled water containing 0.4% sodium azide at 37°C. The storage solution was not changed during μ TBS experiments [31].

At each storage period, individual bonded stick was attached to a Geraldelli's device for μ TBS using cyanoacrylate resin (Super Bonder Gel, Loctite, Piracicaba, SP, Brazil). Each stick was stressed to failure using a universal testing machine (Kratos Dinamometros, São Paulo, SP, Brazil) at a crosshead speed of 0.5 mm/min. Failure modes were evaluated in a light stereomicroscope (Nikon Eclipse E200, Melville, NY, USA) at 40 x magnification and were classified as cohesive (failure exclusive within dentin or resin composite, C), adhesive (failure at resin/dentin interface, A), or adhesive/mixed (failure at resin/dentin interface that included cohesive failure of the neighboring substrates, A/M). Cohesive failures were excluded from the statistical analysis.

All tested sticks from the same tooth were averaged for statistical purposes. The prematurely debonded specimens were included in tooth mean. For each experimental group, μ TBS mean was then obtained. Data were analyzed using two-way ANOVA (adhesive system and storage period) and Games Howell's *post-hoc* test ($\alpha = 0.05$) for pair-wise comparisons.

2.4. *In situ* analysis of degree of conversion (DC)

Twelve bonded third molars (4 teeth per group) were longitudinally sectioned in a mesio-to-distal direction across the bonded interface using a

diamond saw in an Isomet 1000 machine at 300 rpm to prepare 2.0 mm resin-bonded dentin slices. Two slices from the center of each tooth were selected for the micro-Raman analysis.

2.4.1 Micro-Raman spectroscopy of the resin-dentin interface

The resin-bonded dentin slices (n=8 for each experimental group) were individually and manually polished using SiC papers of decreasing abrasiveness (#1000, #1200, #1500, and #2000 grits). Specimens were ultrasonically cleaned for 10 min and then stored in water for 24 h at 37°C before performing the analysis of DC.

Raman spectra were collected at room temperature using a computer-controlled laser Raman Microscope Spectrometer (Senterra, Bruker Optik, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha) with a 532 nm neodymium:yttrium-aluminium-garnet (Nd:YAG) laser line (20 mW) as an excitation source. Analysis were performed according to the following experimental parameters: charge-coupled device detector cooled at 208 K, spatial resolution of $\approx 3 \mu\text{m}$, spectral resolution of $\approx 5 \text{ cm}^{-1}$, power on the sample of 2 mW, scanning range of $1750\text{--}280 \text{ cm}^{-1}$, accumulation time of 30 s and 6 co-additions, and 100 x magnification (Olympus, London, United Kingdom) to a $\approx 1 \mu\text{m}$ beam diameter [32]. Spectra were taken into the middle of the hybrid layer, in an arbitrary area of the intertubular dentin. Two sites were examined per each dentin-adhesive slice.

Raman spectra of uncured adhesives were collected to identify the characteristic bands. Measurements were recorded three times with different specimens for each self-etching adhesive system. Opus spectroscopy software (version 6.5, Bruker Optik) was used to process the collected data. The double-bond content for converting monomer to polymer of each adhesive was calculated using the ratio between cured and uncured band intensities (Equation 1).

$$\% \text{ conversion} = 1 - \left\{ \frac{R(\text{cured})}{R(\text{uncured})} \right\} \times 100\% \quad \text{Equation 1}$$

where “R” is the ratio between aliphatic and aromatic band intensities at 1639 cm⁻¹ and 1609 cm⁻¹ for cured and uncured adhesives.

Considering that the obtained values were normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test), DC (%) was evaluated using a one-way ANOVA and Tukey’s *post hoc* test ($\alpha = 0.05$).

2.5. Micro-Raman spectroscopy of the quaternary ammonium methacrylate polymer [QAMP]

Micro-Raman spectroscopy was also used for characterizing QAMP. Raman spectra of QAMP and raw materials [Eudragit™ E100 and *n*-octyl bromide] were collected at room temperature using a Bruker Raman Microscope Spectrometer with a 532 nm Nd:YAG laser line (20 mW) as an excitation source. Analysis were performed according to the following experimental parameters: charge-coupled device detector cooled at 208 K; spectral resolution of 3-5 cm⁻¹; power on the sample of 2 mW; scanning range of 4000-200 cm⁻¹; accumulation time of 20 s and scan number of 4. Opus spectroscopy software (version 6.5) was used to process the collected data.

2.6. *In vitro* analysis of degree of conversion (DC)

The *in vitro* DC was investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) with an attenuated total reflectance (ATR) device (Spectrum 100, PerkinElmer, Shelton, CT, USA) at 24°C, under 64% relative humidity. The self-etching adhesive systems evaluated were: Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond and Clearfil™ SE Bond (negative control). In order to obtain DC, three samples of each uncured adhesive system and five thin films (0.2-0.3 mm thick) of each cured adhesive were applied on the plate with ZnSe crystal for acquiring the absorption spectra.

The absorption spectra of cured and uncured adhesive systems were collected from 4000 to 650 cm⁻¹ with 32 scans at 4 cm⁻¹. The ratio between

band intensities of C=C aliphatic methacrylate group (1639 cm^{-1}) and the reference C—C aromatic ring (1609 cm^{-1}) was obtained for cured and uncured adhesives. The DC (%) was then calculated using Equation 1. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's *post-hoc* test ($\alpha = 0.05$). The SPSS Statistics software, version 20.0 (SPSS Statistics, IBM Corporation, Somers, NY, USA) was used to perform all the statistical analysis in this study.

3. Results

3.1. Resin–dentin bond strength (μ TBS)

The results of μ TBS (MPa) are summarized in Table 2. The mean cross-sectional area ranged from 0.80 to 0.95 mm^2 and no difference among groups was verified ($p>0.05$). No cohesive failure was observed in the present investigation. Two-way ANOVA revealed that the interaction adhesive system vs. storage period was statistically significant ($p=0.02$). A significant decrease on μ TBS value was achieved for Clearfil™ Protect Bond after 12M in water storage ($p=0.039$). However, QAMP provided no statistical changes in μ TBS after its incorporation into Clearfil™ SE Bond when compared to the negative control ($p>0.05$). The percentage of specimens with premature debonding and the frequency of each fracture mode are shown in Table 3. The major fracture mode was adhesive/mixed for the three adhesive systems under study immediately, after 6M and 12 M.

Table 2 - Mean and standard deviation values of overall resin-dentin bond strength (MPa) from the evaluated adhesive systems

ADHESIVE SYSTEM	STORAGE PERIOD		
	IM	6M	12M
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	34.88 ± 8.71Aa	33.43 ± 5.47Aa	32.50 ± 5.94Aa
Clearfil™ Protect Bond	37.23 ± 6.71Aa	39.44 ± 3.25Aa	28.20 ± 8.09Ba
Clearfil™ SE Bond	34.69 ± 5.95Aa	32.08 ± 10.97Aa	31.27 ± 9.30Aa
<i>Similar means are indicated with the same upper case letters (for each adhesive system) in rows or lower case letters (for each storage period) in columns</i>			

Table 3 - Fracture mode and premature debonded specimens from the evaluated adhesive systems (*)

ADHESIVE SYSTEM	STORAGE PERIOD											
	IM				6M				12M			
	A/M	C	Debonded	Total	A/M	C	Debonded	Total	A/M	C	Debonded	Total
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	36(80)	0(0)	9(20)	45	37(92,5)	2(5)	1(2,5)	40	34(94,5)	0(0)	2(5,5)	36
Clearfil™ Protect Bond	35(79,6)	0(0)	9(20,4)	44	35(83,3)	1(2,4)	6(14,3)	42	34(91,9)	1(2,5)	3(8,1)	37
Clearfil™ SE Bond	35(71,4)	0(0)	14(28,6)	49	35(81,4)	0(0)	8(18,6)	43	35(83,3)	0(0)	7(16,7)	42

(*) Results are shown as number, percentage of specimens and total of sticks

Legend: A/M–adhesive/mixed fracture mode; C–cohesive fracture mode; Debonded–premature debonded specimens

3.2. *In situ* analysis of degree of conversion (DC)

Figure 1 shows representative spectra of the evaluated adhesive systems in uncured and cured conditions. Mean and standard deviation values of *in situ* DC (%) of the experimental groups are reported in Table 4. The adhesives Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond, and Clearfil™ SE Bond presented similar DC means ($p > 0.05$).

Table 4 - Mean and standard deviation values of *in situ* analysis of degree of conversion (%) for adhesive systems

Adhesive Systems		
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	Clearfil™ Protect Bond	Clearfil™ SE Bond
89 ± 6 a	85 ± 11 a	88 ± 3 a
<i>Groups identified with the same lowercase letters are not significantly different (Tukey's test, $p > 0.05$)</i>		

3.3. Micro-Raman spectroscopy of QAMP

Raman spectra of the QAMP and raw materials [Eudragit™ E100 and *n*-octyl bromide] are presented in Figure 2. Eudragit™ E100 showed a C–N stretching band at 602 cm^{-1} . An assignment at 818 cm^{-1} corresponded to C–C stretching vibration [33]. A Raman band at 1450 cm^{-1} was attributed mainly to $-\text{CH}_2-$ scissoring modes. A typical band at 1728 cm^{-1} was assigned to C=O ester stretching. Dimethylamino groups led to bands at 2772 and 2821 cm^{-1} . A strong band due to C–H stretching was observed at 2944 cm^{-1} . The Raman spectrum of this polymer also displayed bands at 1192, 1123, and 967 cm^{-1} which were associated with C–H and C–C wagging vibration [34]. Concerning *n*-octyl bromide, its Raman spectrum showed a typical band corresponding to C–Br stretching between 560 and 650 cm^{-1} . In addition, vibrations of $-\text{CH}_2-$ and $-\text{CH}_3$ groups were assigned at 1440 cm^{-1} . Strong bands due to C–H stretching were observed between 2850 and 3000 cm^{-1} .

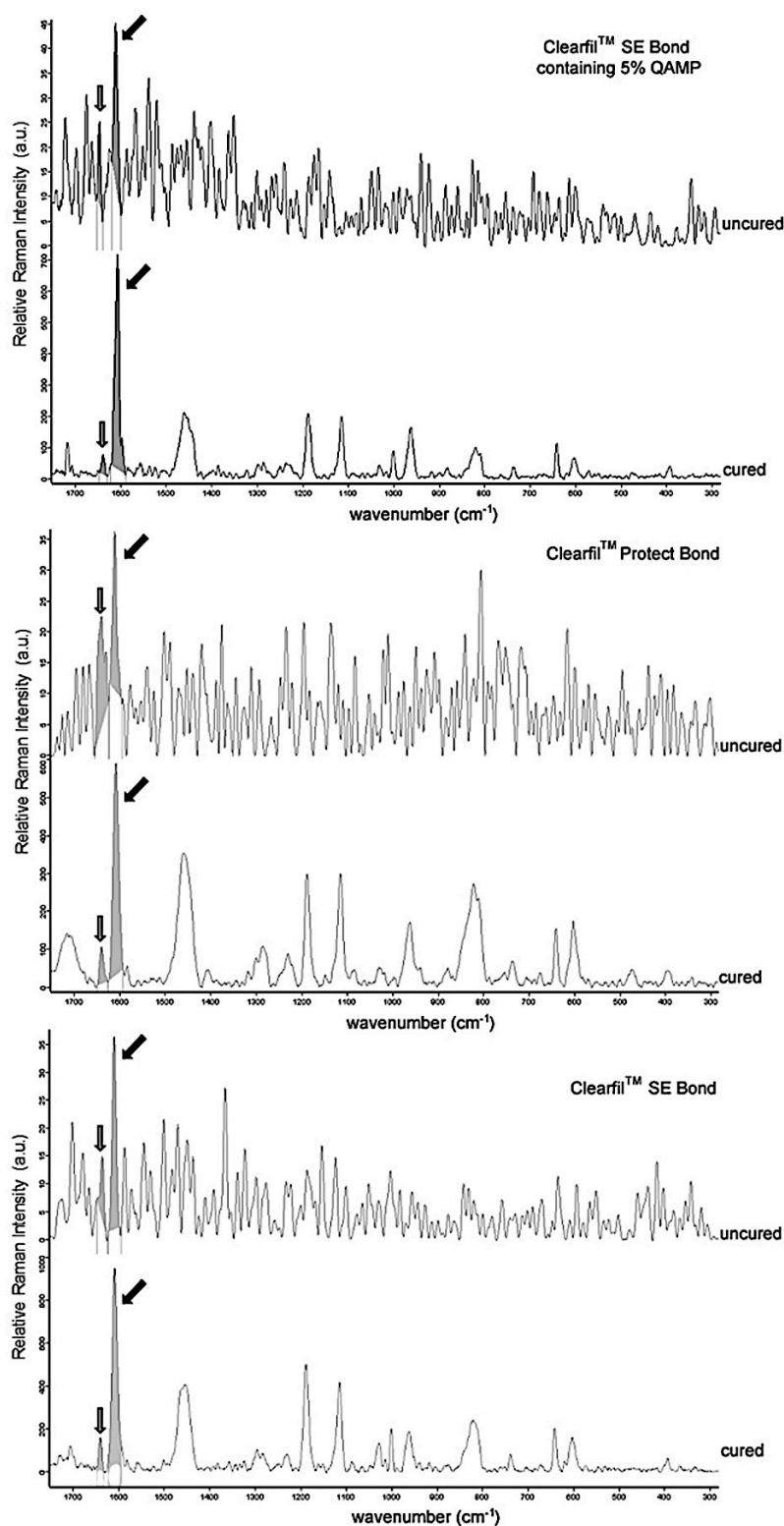


Figure 1. Micro-Raman spectra of uncured and cured adhesive systems Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond, Clearfil™ SE Bond. The reference band is shown at 1609 cm^{-1} and the reactive band related to C=C group is indicated at 1639 cm^{-1} (arrows). This band decreases during polymerization and was used for calculating the degree of conversion

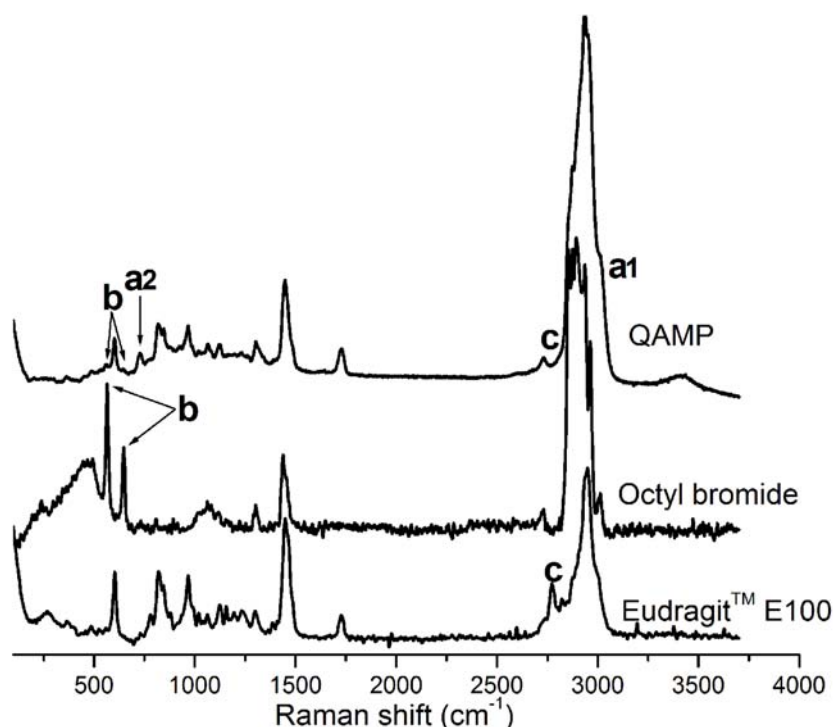


Figure 2. Raman spectra of QAMP and raw materials [Eudragit™ E100 and *n*-octyl bromide]

Considering the spectrum of QAMP, a Raman bands appeared at 3030 cm^{-1} (a1) as a broadening of C–H alkyl stretching band. A novel band attributed to the symmetric stretching vibration of octyl dimethyl ammonium substituent was verified at 726 cm^{-1} (a2). These Raman bands were particularly related to the formation of the quaternary ammonium methacrylate polymer since these assignments were not previously observed in Eudragit™ E100 and *n*-octyl bromide. Similar Raman shifts were reported by Pigorsch *et al.*[35] in a study evaluating the spectroscopic characterization of cationic quaternary ammonium starches. As expected, the C–Br stretching vibration presented in *n*-octyl bromide between 560 and 650 cm^{-1} (b) disappeared in QAMP. Moreover Raman bands associated with dimethylamino groups of Eudragit™ E100, previously observed at 2772 and 2821 cm^{-1} (c), also disappeared. These Raman bands support an experimental basis for affirming that the quaternary ammonium methacrylate polymer was successfully synthesized. These data also reinforce the spectroscopic characterization previously performed by FTIR and described in our previous study [25].

3.4. *In vitro* analysis of degree of conversion (DC)

In vitro DC (%) of Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond, and Clearfil™ SE Bond is indicated in Table 5. Considering ATR-FTIR data, the investigated self-etching adhesive systems demonstrated similar DC values ($p > 0.05$).

Table 5 - Mean and standard deviation values of *in vitro* analysis of degree of conversion (%) for adhesive systems

Adhesive Systems		
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	Clearfil™ Protect Bond	Clearfil™ SE Bond
39.7 ± 2.9 a	39.8 ± 4.9 a	40.0 ± 3.0 a
Same lowercase letters indicate ($p > 0.05$) in columns		

4. Discussion

Bond tests have been extensively used for investigating the performance of adhesive systems in order to improve strategies for increasing the durability of resin–dentin bonds [36]. The rationale is that a stronger adhesion between tooth and biomaterial may provide a better response to the resulting stress of resin polymerization and oral function. Several factors may affect the adhesive performance including heterogeneity of the dentin structure, changes on dentin surface after performing bur cutting and chemical treatments, inappropriate bond strategy, insufficient co-polymerization between adhesive and composite resin, etc [36,37]. Therefore, it is imperative that new adhesives should be carefully evaluated regarding their bond properties before further clinical studies. In that sense, the current paper reported that QAMP, a new antimicrobial additive for self-etching adhesive systems, did not affect both microtensile bond strength and degree of conversion of a widely-used commercial adhesive. Thus the null-hypothesis was accepted.

In general, the experimental groups of adhesive system demonstrated suitable μ TBS values. However Clearfil™ Protect Bond showed a statistically significant decrease of μ TBS after 12M in water storage. The literature reported

that a long-lasting adhesive effect may be decayed by the release of agents from cured adhesive system resulting in a low durability of restoration [15]. In a previous study, our research group demonstrated that Clearfil™ Protect Bond provided a rapid release of 47.2% of MDPB while Clearfil™ SE Bond containing QAMP showed a mean release of 5.1% of quaternary ammonium compounds after 30 days [25]. In addition, Clearfil™ Protect Bond is a fluoride-containing adhesive which may also be released. Therefore the major release of chemical compounds from Clearfil™ Protect Bond as MDPB and fluoride may be involved in the significant reduction of microtensile bond strength verified after the storage time interval of 12M.

Concerning the fracture mode, adhesive/mixed failures were mainly observed for the investigated adhesive systems and a low percentage of cohesive failure in dentin occurred only for Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP after 6M and Clearfil™ Protect Bond after 6M and 12M. According to the literature, this behavior is required for commercial adhesive systems when submitted to μ TBS measurements due to it represents that the strength was applied to the resin-dentin interface and not to one of these substrates alone. In addition, these results indicate that the method variables for performing μ TBS as cross-head speed were suitable chosen.

Considering the micro-Raman spectroscopy analysis carried out for adhesive systems, the aromatic band (1609 cm^{-1}) is typically used as an internal standard and no change is noticeable after polymerization [32]. On the other hand, changes in intensity of the aliphatic band (1639 cm^{-1}) are due to a decrease in the number of remaining C=C double bonds during the polymerization process [32]. In particular, this usual behavior was observed for Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP in which no change in the *in situ* DC was verified. Additionally, Clearfil™ Protect Bond and Clearfil™ SE Bond showed DC values as previously reported [38,39]. As a consequence, the addition of QAMP to the commercial adhesive showed no influence on DC, resulting in a suitable curing.

The *in vitro* approach carried out by ATR-FTIR also confirmed that QAMP did not significantly changed DC value of Clearfil™ SE Bond after its

incorporation at 5% concentration. However, these results were remarkable lower than that obtained by the *in situ* procedure which may be strongly related to the particular *in vitro* conditions. Clearfil™ SE Bond results in an acid solution (pH near 2) and shows high water content *in vitro* which may impair the polymerization reaction of the adhesive system [40]. On the other hand, the self-etching acidic primer may be buffered by the mineral content of dentin and enamel when applied to tooth surface [41] which allows higher monomer conversion.

Innovative restorative materials with particular biological functions are not clinically useful if their original properties are effectively changed [17]. In this study, QAMP showed suitable response into a commercial adhesive system containing MDP, HEMA, and Bis-GMA as monomers in terms of μ TBS and DC. Tests to assess DC over time after incorporating QAMP into self-etching adhesive systems should be performed in a future work.

The clinical performance of new adhesive systems containing different chemical components must be investigated using the survival rates of restorations placed in non-carious cervical lesions [36,42,43]. Furthermore, discoloration and marginal integrity have to be evaluated since failure of restoration margin is a common reason for the replacement and repair of composite restorative [42]. Therefore clinical studies should be led in order to confirm these *in vitro* results after incorporating QAMP into adhesives.

5. Conclusion

A self-etching adhesive system containing 5% QAMP showed effective resin–dentin bond strength immediately, after 6 and 12 months of storage in distilled water and suitable degree of conversion by *in situ* and *in vitro* methods.

REFERENCES

1. Feuerstein O, Matalon S, Slutzky H and Weiss EI. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. J Am Dent Assoc, 2007; 138:349-354.
2. Walter R, Duarte WR, Pereira PNR, Heymann HO, Swift Jr EJ and

- Arnold RR. In vitro inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. *Oper Dent*, 2007; 32:388-393.
3. Imazato S, Imai T, Russell RR, Torii M and Ebisu S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion-promoting monomer. *J Biomed Mater Res*, 1998; 39:511-515.
 4. Bapna MS, Murphy R and Mukherjee S. Inhibition of bacterial colonization by antimicrobial agents incorporated into dental resins. *J Oral Rehabil*, 1988; 15:405-411.
 5. Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endo T, Komatsu M and Okuda R. Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems-influence on tensile bond strength and antibacterial effect. *Dent Mater J*, 2000; 19:65-74.
 6. Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S and Russell RR. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *Am J Dent*, 2002; 15:356-360.
 7. Kazuno T, Fukushima T, Hayakawa T, Inoue Y, Ogura R, Kaminishi H and Miyazaki K. Antibacterial activities and bonding of MMSA/TBB resin containing amphiphilic lipids. *Dent Mater J*, 2005; 24:244-250.
 8. Fang M, Chen JH, Xu XL, Yang PH and Hildebrand HF. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int J Antimicrob Agents*, 2006; 27:513-517.
 9. Fang M, Chai F, Chen JH, Neut C, Jia M, Liu Y, Zhao SJ and Hildebrand HF. Antibacterial functionalization of an experimental self-etching primer by inorganic agents: microbiological and biocompatibility evaluations. *Biomol Eng*, 2007; 24:483-488.
 10. Meiers JC and Shook LW. Effect of disinfectants on the bond strength of composite to dentin. *Am J Dent*, 1996; 9:11-14.
 11. Gürgen S, Bolay S and Kiremitçi A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *J Oral Rehabil*, 1999; 26:836-840.

12. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S and Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater*, 2003; 19:313-319.
13. Imazato S, Kaneko T, Takahashi Y, Noiri Y and Ebisu S. In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. *Oper Dent*, 2004; 29:369-375.
14. Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y and Ebisu S. An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dent Mater*, 2007; 23:170-176.
15. Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J*, 2009; 28:11-19.
16. Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L, Fang M and Chen JH. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. *J Dent Res*, 2009; 88:372-376.
17. Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F and Wang YJ. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009; 90:813-817.
18. Thomé T, Mayer MP, Imazato S, Geraldo-Martins VR and Marques MM. In vitro analysis of inhibitory effects of the antibacterial monomer MDPB-containing restorations on the progression of secondary root caries. *J Dent*, 2009; 37:705-711.
19. Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S and Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater*, 2006; 22:527-532.
20. Imazato S, Kawakami M, Torii M and Tsuchitani Y. Antibacterial activity of composites containing chemically bound non-releasing antibacterial component. *J Dent Res*, 1992; 72:721.
21. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF and Russell RRB. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res*, 1994; 73:1437-1443.

22. Imazato S, Russell RRB and McCabet JF. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. *J Dent*, 1995; 23:177-181.
23. Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RRB, Kaneko T and Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials*, 1999; 20:899-903.
24. Lu G, Wu D and Fu R. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React Funct Polym*, 2007; 67:355-366.
25. Pupo YM, Farago PV, Nadal JM, Esmerino LA, Maluf DF, Zawadzki SF, Michél MD, Santos FA, Gomes OMM, Gomes JC. An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2013; 24:1443-1458.
26. Poitevin A, De Munck J, Van Landuyt K, Coutinho E, Peumans M, Lambrechts P and Van Meerbeek B. Critical analysis of the influence of different parameters on microtensile bond strength of adhesives to dentin. *J Adhes Dent*, 2008;10:7-16.
27. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M and Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*, 2005; 84:118-132.
28. Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, Fernandes CA and Tay F. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent*, 1999; 1:299-309.
29. Miyazaki M, Onose H and Moore BK. Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy. *Dent Mater*, 2002; 18:576-80.
30. Navarra CO, Cadenaro M, Armstrong SR, Jessop J, Antonioli F, Sergio V, Di Lenarda RD and Breschi L. Degree of conversion of Filtek Silorane Adhesive System and Clearfil SE Bond within the hybrid and adhesive layer: An *in situ* Raman analysis. *Dent Mater*, 2009; 25:1178-1185.
31. Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T and Tagami J. The influence of

- storage on dentin bond durability of resin cement. *Dent Mater*, 2000; 16:1-6.
32. Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD and Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *J Dent*, 2012; 40:1090-1102.
 33. Veij M, Vandenabeele P, Beer T, Remonc JP and Moensa L. Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients. *J Raman Spectroscopy*, 2009; 40:297-307.
 34. Rizi K, Green RJ, Khutoryanskaya O, Donaldson M and Williams AC. Mechanisms of burst release from pH-responsive polymeric microparticles. *J Pharm Pharmacol*, 2011; 63:1141-1155.
 35. Pigorsch E. Spectroscopic Characterization of Cationic Quaternary Ammonium Starches. *Starch-Stärke*, 2009; 61:129-138.
 36. Carvalho RM, Manso AP, Geraldeli S, Tay FR and Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater*, 2012; 28:72-86.
 37. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P and Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*, 2007; 28:3757-3785.
 38. Marchesi G, Navarra CO, Cadenaro M, Carrilho MR, Codan B, Sergio V, Di Lenarda R and Breschi L. The effect of ageing on the elastic modulus and degree of conversion of two multistep adhesive systems. *Eur J Oral Sci*, 2010; 118:304-310.
 39. Muñoz MA, Luque I, Hass V, Reis A, Loguercio AD and Bombarda NH. Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*, 2013; 41:404-411.
 40. Arrais CA, Pontes FM, Santos LP, Leite ER and Giannini M. Degree of conversion of adhesive systems light-cured by LED and halogen light. *Braz Dent J*, 2007; 18:54-59.
 41. Tay FR and Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent*

- Mater, 2001; 17:296-308.
42. Chee B, Rickman LJ and Satterthwaite JD. Adhesives for the restoration of non-carious cervical lesions: a systematic review. J Dent, 2012; 40:443-452.
43. Miyazaki M, Tsubota K, Takamizawa T, Kurokawa H, Rikuta A and Ando S. Factors affecting the in vitro performance of dentin-bonding systems. Jpn Dent Sci Rev, 2012; 48:53-60.

4.4. Capítulo 4: Avaliação frente à indução química dinâmica (ciclagem de pH) e de cárie microbiológica, das propriedades mecânicas da interface de união resina-dentina utilizando o sistema adesivo autocondicionante com incorporação de QAMP

Apresentação

A utilização de sistemas adesivos com antimicrobianos específicos, em conjunto com protocolos estabelecidos aos pacientes para atenuar a atividade da doença cárie e a recorrência de processos cariosos na interface dente-restauração, são essenciais para proporcionar longevidade aos procedimentos restauradores. As características do polímero, tais como a sua hidrofiliabilidade ou o seu peso molecular, tem uma grande influência sobre o potencial antimicrobiano de materiais resinosos [Muñoz-Bonilla, Fernández-García⁶⁵ 2012]. Assim, a utilização de materiais poliméricos com propriedades antimicrobianas possui um interesse crescente.

Com o intuito de avaliar a efetividade antimicrobiana de materiais odontológicos, desenvolveu-se em Cariologia modelos laboratoriais com o objetivo de induzir a formação de lesões de cárie artificiais no substrato dentinário [Marquezan *et al.*⁴¹ 2009]. Devido as limitações apresentadas por estes métodos, tem sido investigadas padronizações para reproduzir as características clínicas das lesões cariosas em dentina, tais como coloração, consistência e presença de distintas camadas [Clarkson, Wefel, Miller⁶⁶ 1984]. Desta forma, os métodos de indução têm apresentado importância em pesquisas *in vitro* pela baixa variabilidade dos resultados e alto nível de controle no experimento.

Diante da continuidade da validação da efetividade antimicrobiana do polímero metacrílico quaternário de amônio em estudo, objetivou-se neste capítulo demonstrar os efeitos inibitórios *in vitro* na formação de lesões de cárie artificiais, a partir de interfaces adesivas estabelecidas pelo sistema adesivo autocondicionante contendo QAMP, por meio da avaliação das propriedades mecânicas, dureza e módulo de elasticidade, da camada híbrida e da dentina circunjacente.

4.4.1. Artigo do capítulo 4:

Laboratory Research

A self-etching adhesive system containing a novel antimicrobial polymer [QAMP] improves the mechanical properties of resin-dentin interface after a cariogenic challenge

Running title: **Novel antimicrobial polymer: effect on adhesive interface**

YM Pupo,¹ PV Farago,² MD Michél,³ JM Nadal,⁴ LA Esmerino,⁵ CM Lepienski,⁶
JC Gomes⁷

¹ DDS, MS, PhD Student, *Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Parana, Brazil*

² MS, PhD, *Laboratory of Pharmaceutical Products, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Parana, Brazil*

³ PhD, *Department of Materials Engineering, State University of Ponta Grossa, Parana, Brazil*

⁴ MS, PhD Student, *Laboratory of Pharmaceutical Products, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, Parana, Brazil*

⁵ PhD, *Laboratory of Clinical Microbiology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Parana, Brazil*

⁶ PhD, *Department of Physical, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil*

⁷ DDS, MS, PhD, *Postgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Parana, Brazil*

* Correspondence should be addressed to Paulo Vitor Farago, *Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., 84030-900, Ponta Grossa, Parana, Brazil, Telefax: +55 42 32203102, E-mail: pvfarago@gmail.com*

Abstract

Objective: To assess the *in vitro* effect of a novel quaternary ammonium methacrylate polymer [QAMP] incorporated into a self-etching adhesive system on inhibiting recurrent caries by evaluating the mechanical properties of adhesive interface. **Methods:** Twenty-four (8 teeth per group) human third molars were flattened until the dentin was exposed and were randomly distributed into three experimental groups of self-etching adhesive systems: Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond, and Clearfil™ SE Bond. The eight teeth of each group were randomly divided according to the method for producing artificial caries lesions during 14 days: pH-cycling or microbiological assay. After the artificial caries induction, all samples were longitudinally sectioned and polished in order to obtain Hardness [*H*] and Young's modulus [*E*] values by nanoindentation test in the dentin and hybrid layer. Data were analyzed by one-way ANOVA and Games Howell's *post hoc* test ($\alpha = 0.05$). **Results:** Clearfil™ SE Bond containing QAMP showed *H* and *E* values statistically higher than Clearfil™ Protect Bond and Clearfil™ SE Bond for dentin in the pH-cycling method and than Clearfil™ SE Bond considering the microbiological method. Regarding the hybrid layer, Clearfil™ SE Bond containing QAMP demonstrated *H* and *E* values statistically higher than Clearfil™ SE Bond in both pH-cycling and microbiological experiments. In general, Clearfil™ SE Bond containing QAMP provided better mechanical properties for the resin-dentin interface than other commercial self-etching adhesives after cariogenic challenges. **Clinical significance:** The self-etching adhesive system containing the novel QAMP is promising to provide *in vivo* inhibition of caries lesions.

Keywords: Antibacterial dental adhesive; Cariogenic challenge; Hardness; Quaternary ammonium polymer; Young's modulus.

1. Introduction

Restorative materials showing an antibacterial effect have played an important role in dental materials science because the cariogenic bacteria are well-recognized as a remarkable factor that can reduce their longevity.¹ However freely-dispersed antimicrobial agents that are added into the resin matrix are released within a few days when exposed to a wet environment. This behavior drastically decreases their concentration into the restorative materials and impairs a long-lasting antimicrobial effect.²

In that sense, previous studies were devoted to investigate several antimicrobials monomers which are indented for keeping a strong antibacterial activity after curing.^{3,4,5} In particular, serial papers were performed using 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) and demonstrated a potent antibacterial activity after its incorporation into the primer of a self-etching adhesive system.^{1,2,6-9} In spite of the well-known MDPB potential in reducing residual bacteria of caries-infected dentin, it can also inhibit endogenous matrix metalloproteinases that are particularly involved in the degradation of resin-bonded restorations.¹⁰ However uncured quaternary ammonium monomers are released from the adhesive systems which can reduce the antimicrobial effect in few days and can produce cytotoxicity on cells of pulp-dentin complex.^{11,12}

In order to prevent recurrent caries lesions and to provide a long- lasting antimicrobial activity, a novel quaternary ammonium methacrylate polymer [poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate)] QAMP was obtained by exhaustive alkylation and was successfully incorporated into a commercial self-etching adhesive system.¹³ Due to its high molecular weight, QAMP also showed a slower release of the quaternary ammonium compounds from the adhesive system as compared to MDPB that demonstrated a more rapid release from the Clearfil™ Protect Bond.¹³ However the potential of QAMP for inhibiting recurrent caries after its incorporation into adhesive systems remains unknown.

Several laboratory models have been used for inducing caries lesions in dentin, e.g. acidified gel, pH-cycling, and microbiological assays.¹⁴ In addition, the mechanical performance of the resin-dentin interface after a cariogenic challenge have been investigated using different *in vitro* methods as hardness and morphological analysis. Recently, nanoindentation arises as a valuable method for evaluating the local mechanical properties of dental materials based on the load-displacement data of indentations on a submicron scale.¹⁵ This technique differs from other conventional methods due to no image of the indentation area is needed for determining the chosen mechanical properties and both high resolution of force and accurate indent positioning are achieved.^{16,17}

Therefore the aim of this study was to investigate the *in vitro* effect of a novel quaternary ammonium methacrylate polymer [QAMP] incorporated into a commercial self-etching adhesive system on inhibiting recurrent caries produced by two induction models of artificial caries lesions. This manuscript reports this effect by evaluating the mechanical properties of hardness and Young's modulus provided by nanoindentation of the resin-dentin interface after the cariogenic challenge.

2. Materials and Methods

2.1. Teeth selection, preparation and restorative procedures

A total of twenty-four extracted caries-free human third molars was used. These teeth were collected after obtaining the patients' informed consent under Protocol Number #17839/10 that was approved by the Ethics Committee on Research Involving Human Subjects from the State University of Ponta Grossa. The teeth were disinfected using 0.5% chloramine, stored in distilled water, and used within six months after extraction. A flat, superficial dentin surface was exposed after wet grinding the occlusal enamel on #180-grit silicon-carbide (SiC) paper (Figure 1A). The exposed dentin surfaces were further polished on wet #600-grit SiC paper for 60 s to create a standardized smear layer.

Three self-etching adhesive systems were investigated: Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP, Clearfil™ Protect Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japan) and Clearfil™ SE Bond (Kuraray Medical, Kurashiki, Japan) as negative control. Detailed composition and application mode of these commercial adhesive systems are presented in Table 1. The teeth were divided in 6 experimental groups (4 teeth per group) considering the adhesive system and the method for caries induction: pH-cycling or microbiological assay.

The self-etching adhesive systems were applied onto the dentin in accordance with their manufacturer' instructions. After light curing of each adhesive, three 1 mm-increments of composite resin Filtek™ Z350 XT (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) (Figura 1B) were bonded to each dentin surface. Each increment was light cured with LED (LED Radii-cal, SDI, São Paulo, Brazil) for 30 s at 600 mW/cm². All bond procedures were carried out by a single operator at room temperature and constant relative humidity.

Each tooth was coated with one layer of epoxy resin (Araldite Brascola, São Bernardo do Campo, Brazil) and another layer of nail varnish (Colorama, São Paulo, Brazil), excepting the region that corresponded to the adhesive interface (Figure 1C). Each experimental group was further artificially demineralized by pH-cycling or microbiological method (Figure 1D e 1E).

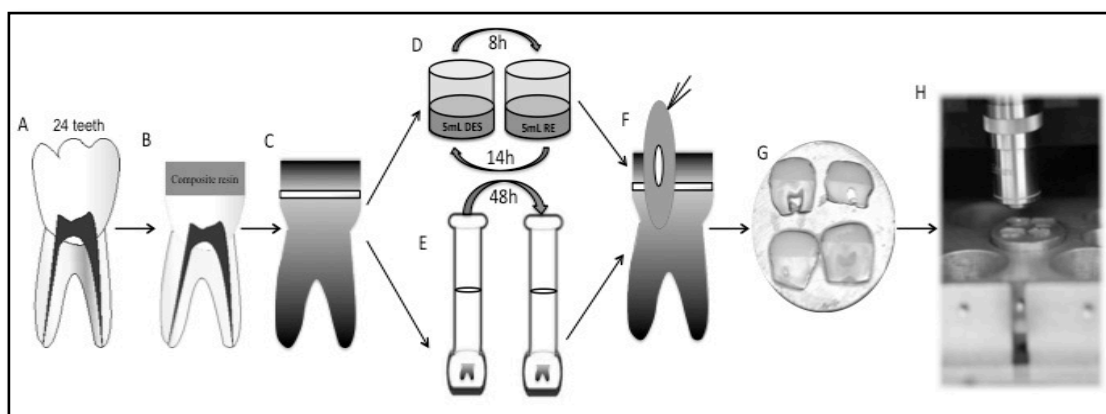


Figure 1. Experimental setup. (A): Dentin exposure after removing the occlusal enamel. (B): Restored tooth with increments of composite resin. (C): Epoxy and varnish coatings of the specimen, excepting the region of adhesive interface. (D): pH-cycling assay. (E): Microbiological caries induction. (F): Longitudinal section for obtaining 1.0 mm resin-bonded dentin slice. (G): Mounted slices using paraffin. (H): Experiments performed in a Nano Indenter XP

Table 1 - Adhesive Systems: Composition, Application Mode and Batch #

Adhesive Systems	Composition	Application Mode	Batch #
Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP	Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, water, QAMP . Bond: MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica.	- Application of two coats of the primer under pressure (20 s); - Gentle air stream (10 s at 20 cm) after application of each coat; - Application of one coat of the adhesive (15 s); - Gentle air stream to make the bond film uniform (3 s at 20 cm); - Light cured (10 s at 600 mW/cm²).	Primer: 00954A Bond: 01415A
Clearfil™ Protect Bond	Primer: MDPB, MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, water. Bond: MDP, HEMA, Bis-GMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica, surface-treated sodium fluoride.		Primer: 00081B Bond: 00134B
Clearfil™ SE Bond	Primer: MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, water. Bond: MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophobic dimethacrylate, di-camphorquinone, <i>N,N</i> -diethanol- <i>p</i> -toluidine, silanated colloidal silica.		Primer: 00954A Bond: 01415A

Abbreviations: MDP (10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate); HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate); Bis-GMA (bisphenol-glycidyl methacrylate); MDPB (12-methacryloyloxydodecyl pyridinium bromide); **QAMP** [poly(dimethylaminoethyl methacrylate-co-octyldimethylammonium ethyl methacrylate bromide-co-methyl methacrylate-co-butyl methacrylate)]

2.2. pH-cycling procedure

The artificial dentine carious lesions were induced by a pH-cycling procedure as described by Featherstone *et al.*¹⁸. Previously, the demineralizing solution was prepared using 2.2 mmol/L CaCl_2 , 2.2 mmol/L NaH_2PO_4 , and 75 mmol/L acetic acid adjusted to a pH of 4.3 and contained 0.02% NaN_3 as preservative. The remineralizing solution was obtained using 1.5 mmol/L CaCl_2 , 0.9 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 mmol/L tris buffer and 0.15 mol/L KCl adjusted to a pH of 7.0 and also contained 0.02% NaN_3 . Each specimen was 24 h cycled in 10 mL of both solutions. This procedure was carried out during 8 h in the demineralizing solution and 16 h in the remineralizing solution for 14 days at room temperature without stirring.

2.3. Microbiological caries induction

Each tooth was placed into sterilized test tubes containing the artificial caries solution (25 mL). This solution was previously prepared and contained: (a) 3.7 g brain heart infusion culture supplemented with 0.5 g yeast extract, 2.0 g sucrose, 1.0 g glucose, and distilled water to make 100 mL and (b) a 100 mL volume of a primary culture of *Streptococcus mutans* ATCC25175, adjusted to a pH of 4.0.¹⁴ The test tubes were incubated at 37°C under microaerophilic conditions (BBL GasPak system, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA). Each specimen was transferred to another test tube containing a freshly prepared artificial caries solution every 48 h. After 14 days, each tooth was washed using deionized water for further analysis.

2.4. Nanoindentation test

In order to investigate the mechanical properties of resin-dentin interface after these cariogenic challenges, the teeth were longitudinally sectioned in a mesio-to-distal direction across the bonded interface using a diamond saw in an Isomet 1000 machine (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) at 300 rpm in order to obtain 1.0 mm resin-bonded dentin slices (Figure 1F). Two bonded slices from the center region of each tooth were chosen for evaluating hardness (GPa) [H] and Young's modulus (GPa) [E] by the nanoindentation test.

The bonded slices were mounted on metal stubs using paraffin (Figure 1G) and manually polished via waterproof SiC papers of decreasing abrasiveness (#600, #1000, #1200, #1500, #2000, and #4000 grits). Each specimen was then polished using soft discs and diamond paste (1 and 0.25 μm) in an automatic polishing device (Aropol S, Arotec, Cotia, Brazil) at 300 rpm.

The specimens were submitted to the nanoindentation using a Nano Indenter XP (MTS Systems Corp., Oak Ridge, TN, USA). A Berkovich triangular pyramidal diamond indenter was used for all experiments (Figure 1H). The surface approach rate of the nanoindenter was set at 10 nm/s and the loading and unloading indentation times were set at 10 s each. The load was kept constant during 4 s at maximum load. Tests were carried out at room temperature ($24 \pm 0.2^\circ\text{C}$). Twelve indentations were performed for each bonded slice (6 indentations in the hybrid layer and 6 indentations in the dentin). In the hybrid layer, the distance among indentations was of 30 μm using a load of 1 gf (10 mN) while the indentations in dentin were performed in 100, 200, 300, 400, 500, 600 μm far from the hybrid layer at a load of 5 gf (50 mN) (Figure 2).

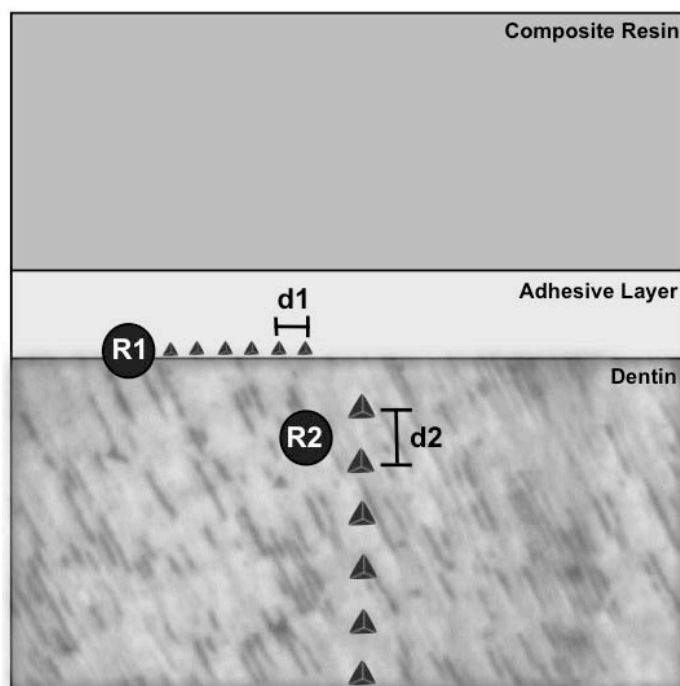


Figure 2. Scheme of the indentation procedure showing the investigated regions: hybrid layer (R1): 6 indentations (distance d1: 30 μm ; load: 1 gf) and dentin (R2): 6 indentations (distance d2: 100 μm far from hybrid layer and load: 5 gf)

Statistical analysis

Considering that the obtained values were normally distributed (Levene's test), the hardness and Young's modulus values were submitted to the one-way ANOVA and Games Howell's *post-hoc* test ($\alpha=0.05$). The SPSS Statistics software, version 20.0 (SPSS Statistics, IBM Corporation, Somers, NY, USA) was used for performing all statistical analyses.

3. Results

The overall *H* and *E* values for the experimental groups in dentin are depicted in Figures 3 and 4, respectively. For the pH-cycling method, Clearfil™ SE Bond containing QAMP showed *H* and *E* values in dentin statistically higher than Clearfil™ Protect Bond (*H*: $p=0.009$; *E*: $p=0.030$) and Clearfil™ SE Bond (*H*: $p=0.029$; *E*: $p=0.001$). Regarding the microbiological assay, Clearfil™ SE Bond containing QAMP demonstrated *H* and *E* values in dentin statistically higher than Clearfil™ SE Bond (*H*: $p=0.001$; *E*: $p=0.014$). No statistically significant difference was observed between Clearfil™ SE Bond containing QAMP and Clearfil™ Protect Bond for both *H* ($p>0.05$) and *E* ($p>0.05$) in dentin after microbiological caries induction.

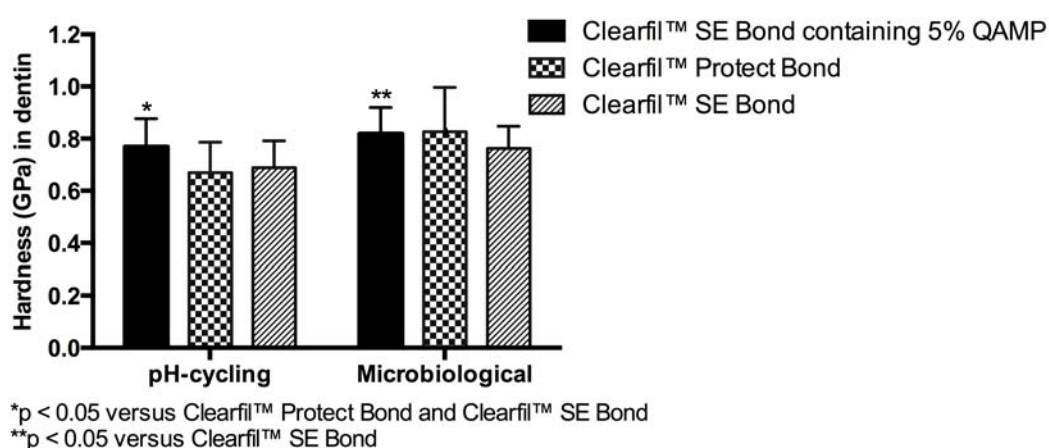


Figure 3. Mean and standard deviation values of hardness (GPa) in dentin after artificial caries induction performed by pH-cycling and microbiological methods

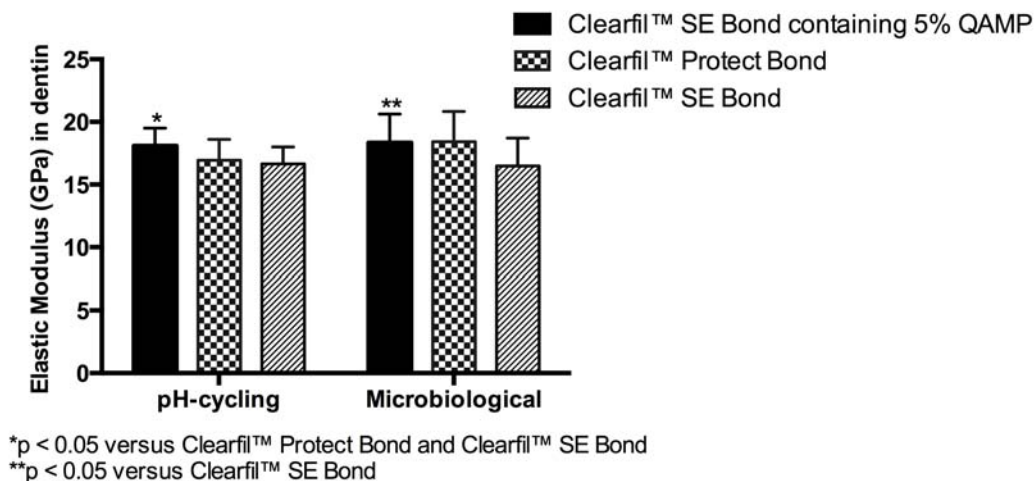


Figure 4. Mean and standard deviation values of Young's modulus (GPa) in dentin after artificial caries induction carried out by pH-cycling and microbiological methods

The overall H and E values for the experimental groups in the hybrid layer are presented in Figures 5 and 6, respectively. Considering the pH-cycling procedure, Clearfil™ SE Bond containing QAMP provided H and E values in the hybrid layer statistically higher than Clearfil™ SE Bond (H : $p=0.001$; E : $p=0.021$). After the microbiological caries induction, Clearfil™ SE Bond containing QAMP demonstrated H and E values in the hybrid layer statistically higher than Clearfil™ SE Bond (H : $p=0.0001$; E : $p=0.0001$). No statistically significant difference was verified between Clearfil™ SE Bond containing QAMP and Clearfil™ Protect Bond for H ($p>0.05$) and E ($p>0.05$) in the hybrid layer after both cariogenic challenges.

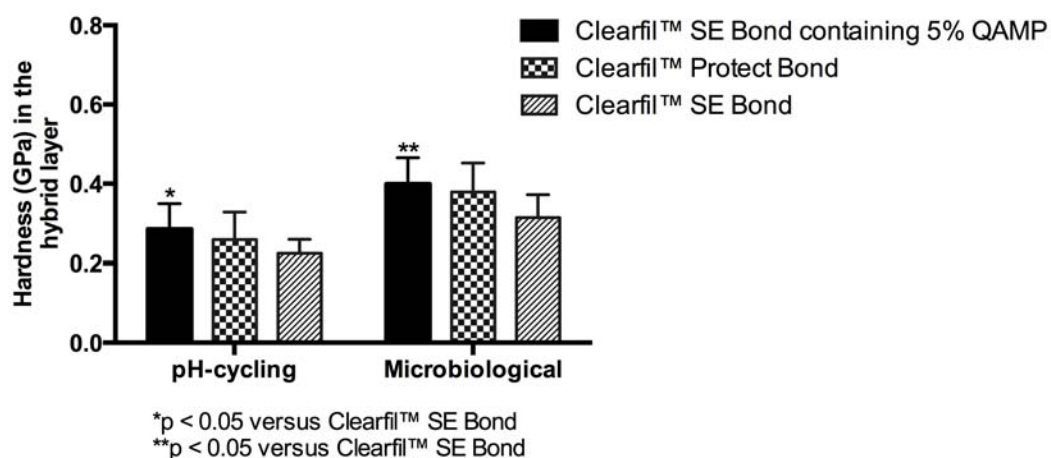


Figure 5. Mean and standard deviation values of hardness (GPa) in the hybrid layer after artificial caries induction performed by pH-cycling and microbiological methods

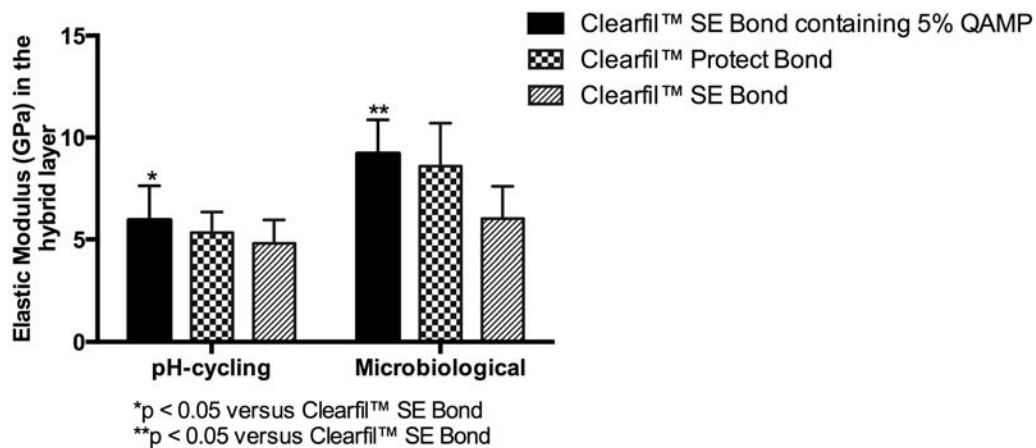


Figure 6. Mean and standard deviation values of Young's modulus (GPa) in the hybrid layer after artificial caries induction carried out by pH-cycling and microbiological methods

In addition, the accuracy of the nanoindentation procedure preformed in both dentin and hybrid layer are summarized in Figure 7.

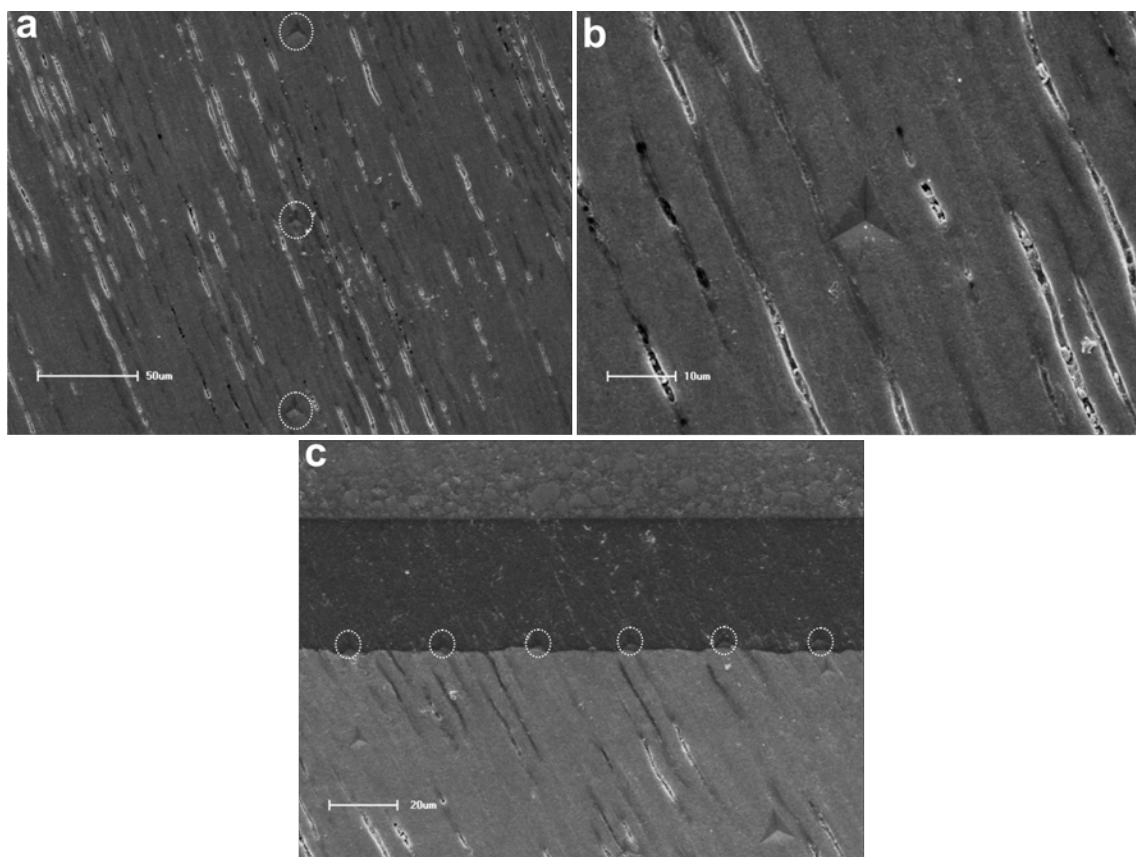


Figure 7. SEM images of nanoindentations in dentin and hybrid layer. (a) Indentations performed in dentin at $\times 350$ magnification. (b) An indentation in dentin at $\times 1200$ magnification. (c) Indentations in hybrid layer at $\times 600$ magnification

4. Discussion

The ability of a material to inhibit recurrent caries formation is an important clinical therapeutic property. Minimally invasive techniques require removing the infected-dentin, leaving behind the affected-dentin in the cavity.⁵ Therefore, is highly beneficial develop antimicrobial adhesive systems to greatly reduce the residual bacteria in the affected-dentin and reduce its harmful effects.^{5,19-21} Moreover, the formation of an acid-base resistant zone is important in the prevention of secondary caries around a restoration.²¹ Thus, an evaluation by caries induction methods of the antimicrobial activity of self-etching adhesive system containing QAMP was investigated. In this context, it is relevant understand the performance of materials in situations with pH-variations in the oral environment, since they should be able to provide the best clinical performance in situations of cariogenic challenge for maintenance of the patient's oral health.²²

Considering the methods used in this study to simulate these conditions, the pH-cycling model has some limitations, *e.g.* the standardization of the demineralization and remineralization periods, produced shallower caries lesions than naturally lesions.¹⁴ The microbiological method provides similar morphological pattern of collagen degradation to natural lesions, such as color and the presence of two distinct layers.^{14,23} Furthermore, this method is more analogous to the *in vivo* situation than chemical-based methods.²⁴ Thereby, QAMP incorporated into the commercial adhesive can promote the presence of an acid-base resistant zone below the hybrid layer demonstrated by better mechanical properties than Clearfil™ SE Bond without QAMP.

The susceptibility of contemporary dentin adhesives to water/oral fluid sorption and polymer swelling has been associated by severe loss of ultrastructural integrity of the hybrid layer.²⁵ The intrinsic collagenolytic and gelatinolytic activity of the dentin matrix can be expressed and attack the collagen, causing it to solubilize.^{26,27} This weakens the hybrid layer and shifts more functional stress to the remaining fibrils, causing them to defibrillate and enlarging the porosities within the hybrid layer.^{26,27} At the same time, water can cause softening of the polymer network.^{27,28} either inside the hybrid layer or at

the adhesive interface, deteriorating the properties of this interface in a likely different manner, which still deserves further evaluation.²⁸ For this purpose, it is necessary to correlate hardness with permeability of the hybrid layer in the absence of oxygen inhibition layers by curing the adhesives under a nitrogen atmosphere.²⁹ This eliminates the possibility of oxygen-inhibition layers affecting direct and indirect assessment of the extent of polymerization of the adhesives.²⁹ The incorporation of the QAMP in the commercial self-etching adhesive system can provide better infiltration, providing enhanced hardness and Young's modulus of the hybrid layer in both induction methods than Clearfil™ SE Bond, as demonstrated in the current investigation.

Regarding the fluoride present in Clearfil™ Protect Bond, studies indicate that can provide an acid-resistant zone in dentin,^{30,31} related to higher and more stable hardness values. This probably because fluoride prevents dentin degradation by reducing the solubility of calcium phosphate present in the hybrid layer, stabilizing the dentin bond strength.³² Other studies verified that the presence of fluoride alone and fluoride/MDPB in the adhesive system not provided positive effect on the hardness of dentin around restorations submitted to cariogenic challenges.^{33,34} In other study, was concluded that MDPB and fluoride-containing adhesive system were capable of reducing alkali-soluble polysaccharide synthesis, but it was not capable of inhibiting artificial secondary lesions.³⁵ Thus, was found in this study that the interface established by Clearfil™ SE Bond containing QAMP provided no difference than Clearfil™ Protect Bond in the hybrid layer in both induction methods. However, Clearfil™ SE Bond containing QAMP demonstrated *H* and *E* values statistically higher than Clearfil™ SE Bond in pH-cycling and microbiological assays in the hybrid layer. This encourages future studies demonstrating the interaction of QAMP with calcium phosphate present in the hybrid layer, as well as fluorides.

Based on the current findings, it may be hypothesized that the capacity to protect the adhesive interface against cariogenic challenges may be associated with the quality of the bond to dentin obtained with the self-etching adhesives. Thus, the experimental results revealed that the mechanical properties were influenced positively by the incorporation of QAMP in the self-

etching adhesive system. Further investigations should also be aimed in assessing the clinical performance of the self-etching adhesive system with the quaternary ammonium methacrylate polymer [QAMP] in reducing dental biofilm on the resin-dentin interface and performed to characterize the acid-base resistant zone in the adhesive materials.

5. Conclusion

In summary, Clearfil™ SE Bond containing QAMP provided similar or better mechanical properties for the resin-dentin interface as compared to other commercial self-etching adhesives after cariogenic challenges.

Conflict of Interest

The authors of this article certify that they have no proprietary, financial, or other personal interest of any nature or kind in any product, service, and/or company that is presented in this article.

References

1. Imazato S, Chen J, Ma S, Izutani N & Li F (2012) Antibacterial resin monomers based on quaternary ammonium and their benefits in restorative dentistry *Japanese Dental Science Review* **48(2)** 115-125.
2. Thomé T, Mayer MP, Imazato S, Geraldo-Martins VR & Marquer MM (2009) In vitro analysis of inhibitory effects of the antibacterial monomer MDPB-containing restorations on the progression of secondary root caries *Journal of Dentistry* **37(9)** 705-711.
3. Caillier L, de Givenchy ET, Levy R, Vandenberghe Y, Geribaldi S & Guittard F (2009) Synthesis and antimicrobial properties of polymerizable quaternary ammoniums *European Journal of Medicinal Chemistry* **44(8)** 3201-3208.
4. Antonucci JM, Zeiger DN, Tang K, Lin-Gibson S, Fowler BO & Lin NJ (2012) Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications *Dental Materials* **28(2)** 219-228.

5. Cheng L, Zhang K, Weir MD, Liu H, Zhou X & Xu HH (2013) Effects of antibacterial primers with quaternary ammonium and nano-silver on *Streptococcus mutans* impregnated in human dentin blocks *Dental Materials* **29(4)** 462-472.
6. Imazato S, Kawakami M, Torii M & Tsuchitani Y (1992) Antibacterial activity of composites containing chemically bound non-releasing antibacterial component *Journal of Dental Research* **72** 721.
7. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF & Russell RRB (1994) Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite *Journal of Dental Research* **73(8)** 1437-1443.
8. Imazato S, Russell RRB & McCabe JF (1995) Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin *Journal of Dentistry* **23(3)** 177-181.
9. Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RRB, Kaneko T & Ebisu S (1999) Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB *Biomaterials* **20(9)** 899-903.
10. Pashley DH, Tay FR & Imazato S (2011) How to increase the durability of resin-dentin bonds *Compendium of Continuing Education in Dentistry* **32(7)** 60-64, 66.
11. Feuerstein O, Matalon S, Slutzky H & Weiss EI (2007) Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems *The Journal of the American Dental Association* **138(3)** 349-354.
12. Lu G, Wu D & Fu R (2007) Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate *Reactive and Functional Polymers* **67 (4)** 355–366.
13. Pupo YM, Farago PV, Nadal JM, Esmerino LA, Maluf DF, Zawadzki SF, Michél MD, Santos FA, Gomes OMM & Gomes JC (2013) An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **24(12)** 1443-58.
14. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC & Mendes FM (2009) Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study *Archives of Oral*

Biology **54(12)** 1111-1117.

15. Moosavi H, Hariri I, Sadr A, Thitthaweerat S & Tagami J (2013) Effects of curing mode and moisture on nanoindentation mechanical properties and bonding of a self-adhesive resin cement to pulp chamber floor *Dental Materials* **29(6)** 708-717.

16. El-Safty S, Akhtar R, Silikas N & Watts DC (2012) Nanomechanical properties of dental resin-composites *Dental Materials* **28(12)** 1292-1300.

17. Sadr A, Shimada Y & Tagami J (2007) Effects of solvent drying time on micro-shear bond strength and mechanical properties of two self-etching adhesive systems *Dental Materials* **23(9)** 1114–1119.

18. Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M & Brugler S (1986) Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. In: Leach SA. Factors relating to demineralization and remineralisation of the teeth *IRL Press, Oxford* 23-34.

19. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RRB & McCabe JF (1997) Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer *Journal of Dental Research* **76(3)** 768-772.

20. Lobo MM, Gonçalves RB, Pimenta LA, Bedran-Russo AK & Pereira PN (2005) *In vitro* evaluation of caries inhibition promoted by self-etching adhesive systems containing antibacterial agents *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterial* **75(1)** 122-127.

21. Inoue G, Tsuchiya S, Nikaido T, Foxton RM & Tagami J (2006) Morphological and mechanical characterization of the acid-base resistant zone at the adhesive-dentin Interface of intact and caries-affected dentin *Operative Dentistry* **31(4)** 466-472.

22. Ellakuria J, Triana R, Minguez N, Soler I, Ibaseta G, Maza J & García-Godoy F (2003) Effect of one-year water storage on the surface microhardness of resin-modified versus conventional glass-ionomer cements *Dental Materials* **19(4)** 286-290.

23. Clarkson BH, Wefel JS & Miller I (1984) A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria *in vitro* *Journal of Dental Research* **63(10)** 1186-1189.

24. Gilmour AS & Edmunds DH (1998) The polarized light microscopic appearance of caries-like lesions adjacent to restored cavities in the crowns and roots of extracted human teeth *Journal of Oral Rehabilitation* **25(12)** 929-939.
25. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L & Pashley D (2007) In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine *Journal of Dental Research* **86(6)** 529-33.
26. Sano H (2006) Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds *Journal of Dental Research* **85(1)** 11-14.
27. Ferracane JL (2006) Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks *Dental Materials* **22(3)** 211-222.
28. Higashi C, Michel MD, Reis A, Loguercio AD, Gomes OM & Gomes JC (2009) Impact of adhesive application and moisture on the mechanical properties of the adhesive interface determined by the nano-indentation technique *Operative Dentistry* **34(1)** 51-57.
29. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, Biasotto M, Contardo L & Breschi L (2005) Degree of conversion and permeability of dental adhesives *European Journal of Oral Sciences* **113(6)** 525-530.
30. Shinohara MS, De Goes MF, Schneider LF, Ferracane JL, Pereira PN, Di Hipólito V & Nikaido T (2009) Fluoride-containing adhesive: durability on dentin bonding *Dental Materials* **25(11)** 1383-1391.
31. Kirsten GA, Takahashi MK, Rached RN, Giannini M & Souza EM (2010) Microhardness of dentin underneath fluoride-releasing adhesive systems subjected to cariogenic challenge and fluoride therapy *Journal of Dentistry* **38(6)** 460-468.
32. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S & Tay FR (2003) Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB *Dental Materials* **19(4)** 313-319.
33. Pedrosa VO, Flório FM, Turssi CP, Amaral FL, Basting RT & França FM (2012) Influence of pH cycling on the microtensile bond strength of self-etching adhesives containing MDPB and fluoride to dentin and microhardness of enamel and dentin adjacent to restorations *The Journal of Adhesive Dentistry*

14(6) 525-534.

34. da Silva BM, França FM, Flório FM & Basting RT (2010) In situ anticariogenic effect of adhesive systems containing fluoride and MDPB *American Journal of Dentistry* **23(2)** 75-80.

35. Lobo MM, Gonçalves RB, Ambrosano GM & Pimenta LA (2005) Chemical or microbiological models of secondary caries development around different dental restorative materials *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **74(2)** 725-731.

5 DISCUSSÃO GERAL

A microinfiltração bacteriana é uma das principais causas da inflamação pulpar, necrose e eventual necessidade de tratamento endodôntico após a realização de uma restauração, tornando-se crítica a interação com a dentina preparada. Atualmente, a maioria dos sistemas adesivos requerem ácido fosfórico para condicionar as superfícies dentinárias, removendo a camada de esfregaço como um procedimento padrão em Odontologia Adesiva [Sampath *et al.*⁶⁷ 2011]. Como a adesão é criada por meio da impregnação no substrato dentinário por misturas de monômeros resinosos, a estabilidade da interface adesiva baseia-se na criação de uma camada híbrida compacta e homogênea [Hedge *et al.*⁶⁸ 2012]. Na estratégia de condicionar e enxaguar, os monômeros impregnam o substrato poroso condicionado e ligações estáveis podem ser alcançadas se este substrato for totalmente infiltrado [Hedge *et al.*⁶⁸ 2012]. Levando isso em consideração, os adesivos autocondicionantes foram introduzidos como uma tentativa de simplificar o procedimento de aplicação clínica e reduzir a sensibilidade técnica e risco de contaminação da superfície preparada [Başeren *et al.*⁶⁹ 2005].

Em sistemas adesivos autocondicionantes, o *pH* do primer é suficientemente baixo para desmineralizar a camada de esfregaço e a superfície de dentina subjacente, de modo a condicionar e preencher a cavidade simultaneamente e na mesma profundidade, teoricamente assegurando a completa penetração do adesivo na área desmineralizada [Van Meerbeek *et al.*⁷⁰ 2011]. No contexto do presente estudo, a fim de prevenir a recorrência de lesões de cárie, sistemas adesivos autocondicionantes podem também possuir atividade antibacteriana normalmente fornecida por monômeros antimicrobianos que podem eliminar a colonização de bactérias residuais na superfície da dentina [Başeren *et al.*⁶⁹ 2005].

Considerando as desvantagens relatadas dos monômeros quaternários de amônio em sistemas adesivos, notadamente pela perda do efeito antimicrobiano após alguns dias e a citotoxicidade sobre as células do complexo dentina-polpa [Demirci *et al.*⁷¹ 2008; El-Kholany *et al.*⁷² 2012], o presente estudo descreveu no Capítulo 1 o desenvolvimento de um novo

polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP], [poli(metacrilato de dimetilaminoetila-co-metacrilato de brometo de etil-octildimetilamônio-co-metacrilato de metila-co-metacrilato de butila)], com propriedades adequadas para propósitos odontológicos, usando o processo de modificação química do polímero pré-formado por alquilação. QAMP conferiu efeito antimicrobiano quando incorporado em sistema adesivo, apresentado neste capítulo. Com isso, observou-se no Capítulo 4 que o polímero metacrílico quaternário de amônio protege a interface dente-restauração dos desafios cariogênicos estabelecidos por microrganismos patogênicos, podendo prevenir a formação de cáries recorrentes. Neste Capítulo, verificou-se que a interface estabelecida pelo sistema contendo QAMP proporcionou melhor difusão dos monômeros na dentina, devido ao aumento da estabilidade da formação da matrix polimérica. Este fato melhora as propriedades mecânicas da camada híbrida, representada por valores mais elevados de dureza e módulo de elasticidade para o sistema adesivo autocondicionante contendo QAMP. De forma complementar no Capítulo 3, o sistema adesivo com incorporação de QAMP demonstrou proporcionar maior longevidade aos procedimentos restauradores, o que é extremamente necessário.

Sistemas adesivos autocondicionantes, contendo flúor e MDPB, têm sido descritos como sendo fáceis de utilizar e apresentarem menor sensibilidade na técnica [Van Meerbeek *et al.*⁷³ 2003]. As principais vantagens do método de autocondicionamento é que a infiltração resinosa ocorre simultaneamente com o processo de condicionamento, permitindo que a resina penetre completamente no interior da matriz de colágeno desmineralizada e minimize a possibilidade de degradação da camada híbrida [Vargas *et al.*⁷⁴ 1997]. No entanto, Erhardt *et al.*⁷⁵ (2008) mostraram que, dependendo do sistema de autocondicionamento, existe uma deterioração da resistência de união porque a vedação ineficiente das fibras de colágeno da dentina pode induzir a nanoinfiltração por exposição a água, após 6 meses de armazenamento. Assim avaliações da estabilidade de adesão de adesivos autocondicionantes precisa ser constantemente verificada e que outros fatores tais como a variação do pH podem também contribuir para a degradação físico-química da interface resina-

dentina [Pedrosa *et al.*⁷⁶ 2012].

Salientando o mecanismo estabelecido no presente estudo apresentado no Capítulo 1, para aumentar o efeito antimicrobiano é particularmente necessária a presença de pelo menos uma cadeia longa de alquila para fornecer um segmento hidrofóbico para a estrutura de amônio quaternário [Abel *et al.*⁴⁴ 2002]. Com isso, esses compostos são capazes de eliminar microrganismos, por interação com a membrana da célula [Dizman *et al.*⁴³ 2004]. Assim, embora monômeros quaternários de amônio com propriedades antimicrobianas para sistemas adesivos já estejam disponíveis comercialmente, o diferencial do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP], devido a sua elevada massa molecular, é apresentar maior retenção na matriz polimérica dos sistemas adesivos, o que evita a sua rápida liberação (Capítulo 1) e proporciona uma menor irritação de tecidos da cavidade oral (Capítulo 2). Como novidade adicional, o polímero metacrílico quaternário de amônio é não-volátil, quimicamente estável e não permeável através da mucosa oral, características que são desvantagens dos monômeros relacionados. O processo de obtenção ocorre de forma simples, rápida e apresenta baixo custo, por utilizar um polímero metacrílico amplamente disponível e, por meio de uma alquilação de um passo, obtendo a sua quaternização com uma cadeia alquila longa.

Com base nos resultados observados no Capítulo 2, Clearfil® SE Bond contendo QAMP apresentou uma resposta inicial inflamatória leve, quando implantados no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Resultados semelhantes ou melhores da permeabilidade vascular, utilizando os métodos azul de Evans e fluxometria laser-Doppler foram observados em comparação com os sistemas adesivos comerciais avaliados. Estes dados sugeriram que sistemas adesivos autocondicionantes contendo QAMP são seguros para utilização clínica. No entanto, novos estudos devem ser realizados para avaliar os efeitos sobre células inflamatórias por períodos mais longos.

QAMP difere dos materiais antimicrobianos para sistemas adesivos já disponíveis comercialmente, por se tratar de um polímero metacrílico quaternário de amônio e não, de um monômero com essas características.

Apresenta como vantagens a não lixiviação do sistema adesivo e uma menor irritação. Demonstra ainda, cumprir com o seu propósito, assegurando um efeito antimicrobiano desejável, além de favorecer uma maior longevidade à restauração dental verificada na avaliação da resistência de união. Estudos adicionais devem dirigir-se para a avaliação do desempenho clínico em longo prazo de sistemas adesivos com incorporação do polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP] em estudo.

Ressalta-se que a premissa de excelência na Odontologia está em tratar o paciente de suas condições bucais desfavoráveis, e não somente curar as sequelas da doença cárie. Nesse sentido, cada vez mais deve-se dar ênfase à assegurada cinética de liberação de ingredientes ativos com potencial antimicrobiano e com propriedades bioativas, em uma quantidade eficaz, durante um período de tempo prolongado e clinicamente relevante.

6 CONCLUSÃO

O polímero metacrílico quaternário de amônio [QAMP], sintetizado neste estudo pelo processo de modificação química de um polímero pré-formado por alquilação e incorporado em sistema adesivo autocondicionante, demonstrou:

- Oferecer um sistema viável para incorporação em sistemas adesivos, atenuando a ação de microrganismos na interface dente-restauração;
- Características biológicas satisfatórias e de previsibilidade para posteriores avaliações clínicas;
- Baixa liberação do composto quaternário de amônio, o que determina um prolongado efeito antimicrobiano;
- Resistência de união mantida durante o período de avaliação, favorecendo um adequado selamento em procedimentos restauradores e reabilitadores;
- Ausência de influência negativa no grau de conversão dos monômeros em polímeros após adição de QAMP;
- Resultados satisfatórios na avaliação das propriedades mecânicas, sustentando a efetividade antimicrobiana deste produto.

Dados contemplam o desenvolvimento de polímeros quaternários de amônio para fornecer benefícios adicionais para os sistemas adesivos dentais amplamente utilizados em Odontologia.

REFERÊNCIAS

1. Goracci G, Mori G, Bazzucchi M. Marginal seal and biocompatibility of a fourth-generation bonding agent. *Dent Mater.* 1995 Nov;11(6):343-7.
2. Perdigão J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Braem M, Yildiz E, Yücel T, Vanherle G. The interaction of adhesive systems with human dentin. *Am J Dent.* 1996 Aug;9(4):167-73.
3. Cal E, Türkün LS, Türkün M, Toman M, Toksavul S. Effect of an antibacterial adhesive on the bond strength of three different luting resin composites. *J Dent.* 2006 Jul;34(6):372-80.
4. Bauer JG, Henson JL. Microleakage: a measure of the performance of direct filling materials. *Oper Dent.* 1984 Winter;9(1):2-9.
5. Imazato S, Imai T, Ebisu S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. *Am J Dent.* 1998 Jun;11(3):106-8.
6. Bapna MS, Murphy R, Mukherjee S. Inhibition of bacterial colonization by antimicrobial agents incorporated into dental resins. *J Oral Rehabil.* 1988 Sep;15(5):405-11.
7. Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endo T, Komatsu M, Okuda R. Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems-influence on tensile bond strength and antibacterial effect. *Dent Mater J.* 2000 Mar;19(1):65-74.
8. Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *Am J Dent.* 2002;15(6):356-60.
9. Kazuno T, Fukushima T, Hayakawa T, Inoue Y, Ogura R, Kaminishi H, Miyazaki K. Antibacterial activities and bonding of MMSA/TBB resin containing amphiphilic lipids. *Dent Mater J.* 2005 Jun;24(2):244-50.
10. Fang M, Chen JH, Xu XL, Yang PH, Hildebrand HF. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 Jun;27(6):513-7.
11. Fang M, Chai F, Chen JH, Neut C, Jia M, Liu Y, Zhao SJ, Hildebrand HF. Antibacterial functionalization of an experimental self-etching primer by

- inorganic agents: microbiological and biocompatibility evaluations. *Biomol Eng.* 2007 Nov;24(5):483-8.
12. Meiers JC, Shook LW. Effect of disinfectants on the bond strength of composite to dentin. *Am J Dent.* 1996 Feb;9(1):11-4.
 13. Grgan S, Bolay S, Kiremiti A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *J Oral Rehabil.* 1999 Oct;26(10):836-40.
 14. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater.* 2003 Jun;19(4):313-9.
 15. Imazato S, Kaneko T, Takahashi Y, Noiri Y, Ebisu S. In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. *Oper Dent.* 2004 Jul-Aug;29(4):369-75.
 16. Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S. An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dent Mater.* 2007 Feb;23(2):170-6.
 17. Imazato S, Kawakami M, Torii M, Tsuchitani Y. Antibacterial activity of composites containing chemically bound non-releasing antibacterial component. *J Dent Res.* 1992;72:721.
 18. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RRB. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res.* 1994 Aug;73:1437-43.
 19. Imazato S, Russell RRB, McCabe JF. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. *J Dent.* 1995 Jun;23:177-81.
 20. Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RRB, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials.* 1999 May;20:899-903.
 21. Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater.* 2006 Jun;22:527-32.
 22. Xiao YH, Chen JH, Fang M, Xing XD, Wang H, Wang YJ, Li F. Antibacterial effects of three experimental quaternary ammonium salt

- (QAS) monomers on bacteria associated with oral infections. *J Oral Sci.* 2008 Sep;50(3):323-7.
23. Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F, Wang YJ. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90(2):813-7.
 24. Feuerstein O, Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J Am Dent Assoc.* 2007;138(3):349-58.
 25. Lu G, Wu D, Fu R. Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate. *React Funct Pol.* 2007 Apr;67:355–66.
 26. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent.* 2000;28(1):61-7.
 27. Menschutkin N. Über die affinitätskoeffizienten der alkylhaloide und der amine. *Z Phys Chem.* 1890;6:41–57.
 28. Barney R, Stark T, Deleat D. Synthesis and Surfactant Studies of Dialkyl Dimethyl Quaternary Ammonium Bromide Formulations. *Am J Undergrad Res.* 2005;5:1-5.
 29. Mendes JBE, Riekens MK, Oliveira VM, Michel MD, Stulzer HK, Khalil NM, Zawadzki SF, Mainardes RM, Farago PV. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:542937.
 30. Pazhanisamy P, Ariff M, Anwaruddin Q. Synthesis and Characterization of Quaternary Ammonium Ionomers. *J Appl Polym Sci.* 2005;98:1100-1105.
 31. Bucci R, Balestrieri F, Magrì AD, Magrì AL, Marini F. UV–vis spectrophotometric method for the quantitation of all the components of Italian general denaturant and its application to check the conformity of alcohol samples. *Talanta.* 2006 Jan;68:781–90.

32. Farago PV, Raffin RP, Pohlmann AR, Guterres SS, Zawadzki SF. Physicochemical Characterization of a Hydrophilic Model Drug-Loaded PHBV Microparticles Obtained by the Double Emulsion/Solvent Evaporation Technique. *J Braz Chem Soc.* 2008;19:1298-1305.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-First informational supplement. CLSI document M100-S21 (ISBN 1-56238-742-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA; 2011.
34. Karamoddini MK, Fazli-Bazzaz BS, Emamipour F, Ghannad MS, Jahanshahi AR, Saed N, Sahebkar A. Antibacterial efficacy of lytic bacteriophages against antibiotic-resistant *Klebsiella* species. *ScientificWorldJournal.* 2011 Jul;11:1332–1340.
35. Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Rehabil.* 2001 Apr;28:314-9.
36. Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA. Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. *Oper Dent.* 2010 Jul-Aug;35:448-53.
37. Oliveira DT, Souza-Silva E, Tonussi CR. Gingival Vein Puncture: A New Simple Technique for Drug Administration or Blood Sampling in Rats and Mice. *Scand J Lab Anim Sci.* 2009;36(2):109-13.
38. Kitasako Y, Burrow MF, Nikaido T, Tagami J. The influence of storage on dentin bond durability of resin cement. *Dent Mater.* 2000;16:1-6.
39. Hass V, Luque-Martinez I, Sabino NB, Loguercio AD, Reis A. Prolonged exposure times of one-step self-etch adhesives on adhesive properties and durability of dentine bonds. *J Dent.* 2012 Dec;40(12):1090-102.
40. Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. In: Leach SA. Factors relating to demineralization and remineralisation of the teeth. Oxford: IRL Press. 1986;23-34.

41. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, Mendes FM. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 2009;54(12):1111-7.
42. Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res.* 1992 Jun;7(6):1564-83.
43. Dizman B, Elasri MO, Mathias LJ. Synthesis and Antimicrobial Activities of New Water- Soluble Bis-Quaternary Ammonium Methacrylate Polymers. *J Appl Polym Sci.* 2004 Oct;94:635–42.
44. Abel T, Cohen JI, Engel R, Filshtinskaya M, Melkonian A, Melkonian K. Preparation and investigation of antibacterial carbohydrate-based surfaces. *Carbohydr Res.* 2002 Nov;337:2495-9.
45. Imazato S. Review: antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater.* 2003;19:449–57.
46. Imazato S. Bioactive restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J.* 2009;28:11–9.
47. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials.* 2006;27: 3995–4002.
48. Li F, Chen J, Chai Z, Zhang L, Xiao Y, Fang M, *et al.* Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. *J Dent.* 2009;37:289–96.
49. Xie D, Weng Y, Guo X, Zhao J, Gregory RL, Zheng C. Preparation and evaluation of a novel glass-ionomer cement with antibacterial functions. *Dent Mater.* 2011;27:487–96.
50. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, *et al.* The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res.*

- 2011;90:535–40.
51. Namba N, Yoshida Y, Nagaoka N, Takashima S, Matsuura-Yoshimoto K, Maeda H, *et al.* Antibacterial effect of bactericide immobilized in resin matrix. *Dent Mater.* 2009;25:424–30.
 52. Nurdin N, Helary G, Sauvet G. Biocidal polymers active by contact. II. Biological evaluation of polyurethane coatings with pendant quaternary ammonium salts. *J Appl Polym Sci.* 1993 Oct;50:663–70.
 53. Costa CAS, Hebling J. Avaliação *in vitro* de sistemas adesivos de dentina aplicados sobre células odontoblastóides. *Rev Odontol UNESP.* 2006; 35(1): 97-106.
 54. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE. Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin-bonding agents *in vitro*. *J Endod.* 1992;18:589-96.
 55. Nagem-Filho H, Monteiro CR, Nagem HD, Lage-Marques JL. Effect of dental adhesives on the exudative phase of the inflammatory process in subcutaneous tissue of rats. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(2):109-12.
 56. Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods.* 2011;195(2):206-10.
 57. Nicolau M, Sirois MG, Bui M, Plante GE, Sirois P, Regoli D. Plasma extravasation induced by neurokinins in conscious rats: receptor characterization with agonists and antagonists. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993;71:217–21.
 58. Zhang JX, Wolf MB. Effects of cold on microvascular fluid movement in the cat limb. *J Appl Physiol.* 1991;71:703–8.
 59. Santos RL, Pithon MM, Fernandes ABN, Cabral MG, Ruellas ACO. Biocompatibility of orthodontic adhesives in rat subcutaneous tissue. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(5):503-8.
 60. Grga D, Dželetović B, Živković S, Kršljak E. Blood Flow Measurement by Laser Doppler Method in Orofacial Region. *Serb Dent J.* 2010;57(3):141-8.

61. Navarra CO, Breschi L, Turco G, Diolosà M, Fontanive L, Manzoli L, Di Lenarda R, Cadenaro M. Degree of conversion of two-step etch-and-rinse adhesives: In situ micro-Raman analysis. J Dent. 2012 Sep;40(9):711-7.
62. Matee MI, Mikx FH, Soet JS, Maselle SY, Graaff J, van Palenstein Helderman WH. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. Oral Microbiol Immunol. 1993; 8(5):322-4.
63. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, *et al.* Degree of conversion and permeability of dental adhesives. Eur J Oral Sci. 2005 Dec;113(6):525-30.
64. Nunes TG, Garcia FC, Osorio R, Carvalho RM, Toledano M. Polymerization efficacy of simplified adhesive systems studied by NMR and MRI techniques. Dent Mater. 2006 Oct;22(10):963-72.
65. Muñoz-Bonilla A, Fernández-García M. Polymeric materials with antimicrobial activity. Prog Polym Sci. 2012;37:281–339.
66. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria in vitro. J Dent Res. 1984;63:1186–9.
67. Sampath PB, Hegde MN, Hegde P. Assessment of antibacterial properties of newer dentin bonding agents: An in vitro study. Contemp Clin Dent. 2011 Jul;2:165-9.
68. Hedge MN, Hedge P, Chandra CR. Assessment of antibacterial activity of self-etching dental adhesive systems: An *in vitro* study. J Conserv Dent. 2012 Apr-Jun; 15(2): 151-5.
69. Başeren M, Yazici AR, Ozalp M, Dayangaç B. Antibacterial activity of different generation dentin-bonding systems. Quintessence Int. 2005 May;36:339-4.
70. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. Dent Mater. 2011;27(1):17-28.

71. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater.* 2008;24(3):362-71.
72. El-Kholany NR, Abielhassan MH, Elembaby AE, Maria OM. Apoptotic effect of different self-etch dental adhesives on odontoblasts in cell cultures. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):775-83.
73. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003;28(3):215-35.
74. Vargas MA, Cobb DS, Armstrong SR. Resin-dentin shear bond strength and interfacial ultrastructure with and without a hybrid layer. *Oper Dent.* 1997;22(4):159-66.
75. Erhardt MC, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater.* 2008 Jun;24(6):786-98.
76. Pedrosa VO, Flório FM, Turssi CP, Amaral FL, Basting RT, França FM. Influence of pH cycling on the microtensile bond strength of self-etching adhesives containing MDPB and fluoride to dentin and microhardness of enamel and dentin adjacent to restorations. *J Adhes Dent.* 2012;14(6):525-34.

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa. COEP – UEPG



PARECER Nº 35/2011

Protocolo: 17839/10

No dia 06 de abril de 2011, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado **"Avaliação da resistência de união e propriedades mecânicas da interface de união resina dentina utilizando sistemas adesivos antimicrobianos"** de responsabilidade do pesquisador João Carlos Gomes.

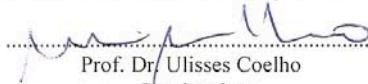
Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório parcial: 31 de outubro de 2012.

Data para entrega do relatório Final: 30 de abril de 2014.

Ponta Grossa, 06 de abril de 2011.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador

ANEXO B - Aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animal. CEUA – UEPG



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 16/2011

Protocolo UEPG – 09617/2011

Título – “Avaliação da permeabilidade vascular de sistemas adesivos com potencial antimicrobiano em subcutâneo de ratos”.

Interessado – Dr. João Carlos Gomes

Data de Entrada – 03/06/2011

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
15/08/2013

Considerações

Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de trinta e seis ratos (*Rattus norvegicus*).

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.

Professor Dr. Giovanni Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

ANEXO C - Depósito de Pedido de Patente



Espaço reservado para protocolo

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA**

1.2 CNPJ/CPF: **80257355000108**

1.3 Endereço completo: **AV GAL CARLOS CAVALCANTI, 4748 - PONTA GROSSA - PR**

1.4 CEP: **84030900**

1.5 Telefone: **(42) 32203263**

1.6 Fax: **(42) 32203263**

1.7 E-mail: **agipi@uepg.br**

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):

Processo de obtenção e uso de polímero metacrilato quaternário de amônio com propriedades antimicrobianas para a incorporação em materiais odontológicos

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° : Data de Depósito: / /

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s)

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: **JOÃO CARLOS GOMES**

6.2 Qualificação: **DOCENTE DE ENSINO SUPERIOR**

6.3 CPF: **33867771987**

6.4 Endereço completo: **AV GAL CARLOS CAVALCANTI, 4748 - PONTA GROSSA - PR**

6.5 CEP: **84030900**

6.6 Telefone: **(42) 32203741**

6.7 Fax: **(42) 32203263**

6.8 E-mail: **gomesjoaocarlos@uol.com.br**

☒ continua em folha anexa

Anexo do item **6. Inventor (72):**

6.1 Nome: Paulo Vitor Farago

6.2 Qualificação: Docente de Ensino Superior

6.3 CPF: 02688357999

6.4 Endereço completo: Av. Gal. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa / PR

6.5 CEP: 84030900

6.6 Telefone: (42) 99716641

6.7 Fax: (42) 32203741

6.8 e-mail: pvfarago@gmail.com

6.1 Nome: Yasmine Mendes Pupo

6.2 Qualificação: Doutoranda em Odontologia

6.3 CPF: 04694480910

6.4 Endereço completo: Av. Gal. Carlos Cavalcanti, 4748 – Ponta Grossa / PR

6.5 CEP: 84030900

6.6 Telefone: (42) 99429777

6.7 Fax: (42) 32203741

6.8 e-mail: yasminemendes@hotmail.com

ANEXO D - Primeira página do artigo referente ao Capítulo 1

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2013
<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2013.766784>



RESEARCH ARTICLE

An innovative quaternary ammonium methacrylate polymer can provide improved antimicrobial properties for a dental adhesive system

Yasmine Mendes Pupo^a, Paulo Vitor Farago^{b*}, Jessica Mendes Nadal^b, Luis Antônio Esmerino^c, Daniela Florencio Maluf^d, Sônia Faria Zawadzki^d, Milton Domingos Michel^e, Fábio André dos Santos^a, Osnara Maria Mongruel Gomes^a and João Carlos Gomes^a

^aPostgraduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave, 84030-900 Ponta Grossa, Brazil; ^bLaboratory of Pharmaceutical Products, Department of Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave, 84030-900 Ponta Grossa, Brazil; ^cLaboratory of Clinical Microbiology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave, 84030-900 Ponta Grossa, Brazil; ^dDepartment of Chemistry, Federal University of Paraná, P.O. Box 19081, 81531-990 Curitiba, Brazil; ^eDepartment of Materials Engineering, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Ave, 84030-900, Ponta Grossa, Brazil

(Received 25 November 2012; accepted 12 January 2013)

A quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) with antimicrobial potential was synthesized. The resulting product (QAMP) was characterized by FTIR spectroscopy, NMR spectroscopy, visible spectrophotometry, XRPD and TGA. The *in vitro* susceptibility tests against *Streptococcus mutans* of QAMP were investigated prior and after incorporation into a commercial adhesive system (Clearfil™ SE Bond). The release of quaternary ammonium compounds from the experimental adhesive system (Clearfil™ SE Bond + 5% QAMP) was performed during 1, 7, 14, 21 and 30 days. Spectroscopic data confirmed that QAMP was successfully obtained. Thermogravimetric analysis indicated that QAMP was heat stable. Prior incorporation into the adhesive system, QAMP revealed an inhibition halo of 18.33 ± 0.6 mm. By agar disk diffusion test, Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP presented an inhibition halo (16.67 ± 1.5 mm) similar to Clearfil™ Protect Bond (positive control, 17.00 ± 1.7 , $p = 0.815$) and significantly higher than Clearfil™ SE Bond (negative control, 11.00 ± 1.0 , $p = 0.006$). The minimum inhibitory/bactericidal concentrations for Clearfil™ SE Bond containing 5% QAMP were $20 \mu\text{L mL}^{-1}$. The release of quaternary ammonium compounds from the experimental adhesive containing QAMP was very low (5.1%) when compared to Clearfil™ Protect Bond that released 47.2% of its quaternary ammonium monomer (MDPB) after 30 days. The QAMP can offer enhanced antimicrobial properties for self-etching adhesive systems.

Keywords: alkylation; antibacterial agents; quaternary ammonium compounds; spectrum analysis; *Streptococcus mutans*

1. Introduction

Quaternary ammonium salts are positively charged molecules with four alkyl, aryl or heterocyclic groups bonded to the nitrogen. These compounds are able to kill microorganisms such as bacteria and fungi by interacting with the cell membrane.[1] This effect can be particularly enhanced by at least one long alkyl chain to provide a hydrophobic segment for

*Corresponding author. Email: pvfarago@uepg.br

ANEXO E - Submissão do artigo referente ao Capítulo 2

European Journal of Oral Sciences



Effect on vascular permeability of a self-etching adhesive system containing an antimicrobial quaternary ammonium polymer QAMP into subcutaneous tissue of rats

Journal:	European Journal of Oral Sciences
Manuscript ID:	EOS-6626-OA-13
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-Jul-2013
Complete List of Authors:	Pupo, Yasmine; State University of Ponta Grossa, School of Dentistry Farago, Paulo Vitor; State University of Ponta Grossa, Laboratory of Pharmaceutical Products Kovalik, Ana; State University of Ponta Grossa, School of Dentistry Santos, Fábio; State University of Ponta Grossa, School of Dentistry Nadal, Jessica; State University of Ponta Grossa, Laboratory of Pharmaceutical Products Michel, Milton; State University of Ponta Grossa, Department of Materials Engineering Gomes, Osnara; State University of Ponta Grossa, School of Dentistry Gomes, João Carlos; State University of Ponta Grossa, School of Dentistry
Keywords (Please write 3 to 5 keywords according to Index Medicus):	Acute-phase reaction, Evans blue, Inflammation, Laser-Doppler flowmetry, Quaternary ammonium compounds
Research Area:	Animal experiment, Biomaterials, Dental materials, laboratory

SCHOLARONE™
Manuscripts

European Journal of Oral Sciences

ANEXO F - Submissão do artigo referente ao Capítulo 3



[Contact us](#) 

[Help](#) 



[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: yasminemendes@hotmail.com
Role: Author

Submissions Being Processed for Author YM Pupo, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links		Effect of an antimicrobial adhesive system containing QAMP on bond strength and degree of conversion	Jul 29, 2013	Jul 29, 2013	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

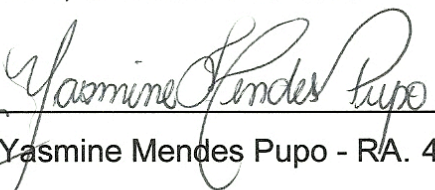
ANEXO G - Declaração de responsabilidade pelos direitos autorais**Universidade Estadual de Ponta Grossa***Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação*

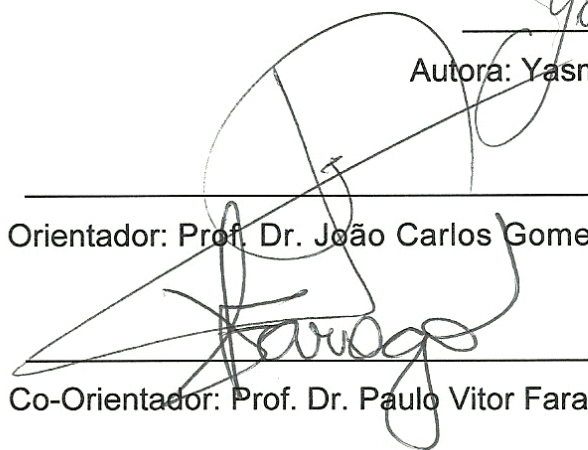
Av.: Gen. Carlos Cavalcanti, 4748 CEP: 84030-900

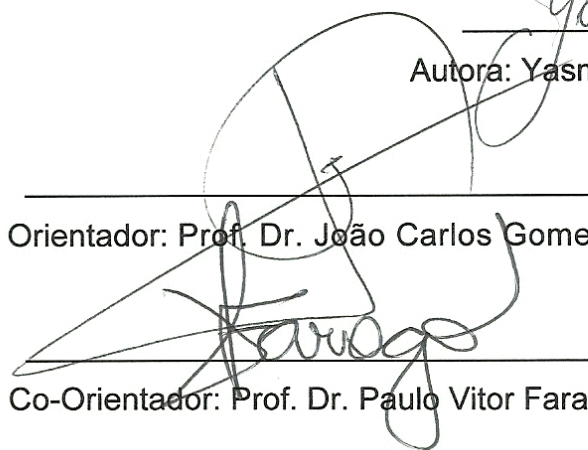
Campus Uvaranas Ponta Grossa Fone: 42.220.3262 e-mail: pesquisa@uegp.br**DECLARAÇÃO**

As cópias de artigos de minha autoria, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Gomes e co-orientação do Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas sujeitos a arbitragem, que constam na minha Tese de Doutorado intitulada **"Polímero antimicrobiano [QAMP] para incorporação em sistema adesivo odontológico: desenvolvimento, caracterização físico-química, avaliação da permeabilidade vascular e propriedades mecânicas"**, não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Ponta Grossa, 17 de maio de 2013



Autora: Yasmine Mendes Pupo - RA. 410109-05

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Gomes

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago