DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS ODONTOLÓGICOS A BASE DE BISGMA/TEGDMA COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE MMT CARREGADAS COM METRONIDAZOL

DUCLERC FERNANDES PARRA (RESPONSÁVEL)

LETÍCIA CRISTINA CIDREIRA BOARO (CO-AUTORA)

LUIZA MELLO DE PAIVA CAMPOS (CO-AUTORA)

SÃO PAULO
2016

Pesquisador Principal: Duclerc Fernandes Parra

Linha de Pesquisa do Plano Diretor do IPEN: atividade 7.7.740.6P – CQMA/IPEN

Título: DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS ODONTOLÓGICOS Á BASE DE BISGMA/TEGDMA COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE MMT CARREGADAS COM METRONIDAZOL

Ano de início da Pesquisa: 2016; **Ano previsto para o término**: 2018.

Inovação tecnológica: As resinas compostas à base de Bis-GMA e TEGDMA são amplamente utilizadas para restaurações dentárias diretas. No entanto, a contração de polimerização ainda permanece como uma grande desvantagem, e como consequência, poderá haver formação de fendas, permitindo a formação cáries secundárias. Para minimizar essa desvantagem, uma possível solução seria a confecção de uma resina composta com atividade antimicrobiana, ou seja, uma resina que promova uma liberação de fármaco controlada. O desenvolvimento de novos materiais poliméricos com atividade antimicrobiana, se comprovada a eficácia do sistema de liberação de fármaco proposto, tornará possível explorar uma nova área no que tange à nanotecnologia aplicada à biomateriais, especificamente na área odontológica / dentística restauradora.

Apoios de Agência de Fomento: FAPESP (Auxílio Pesquisa, processo número: 2016/01319-9); FAPESP (Bolsa de Pós-Doutorado, processo número 2013/07229-3).

RESUMO EXECUTIVO

O objetivo do presente estudo será desenvolver nanocompósitos com finalidade odontológica utilizando MMT (montmorilonita) carregada de Metronidazol em uma matriz orgânica à base de BisGMA/TEGDMA. Para alcançar esse objetivo, o projeto será dividido em seis diferentes etapas, cada uma delas com um objetivo específico. *Etapa 01* – comparar a secagem em estufa com a liofilização do complexo MMT/METRONIDAZOL após a incorporação do fármaco em relação a sua estrutura lamelar através de DRX, MEV e MET. *Etapa 02* - determinar qual a maior porcentagem em peso de Metronidazol possível de ser incorporada na MMT. Para isso serão incorporadas diferentes concentrações de Metronidazol em incrementos de 1% em peso na MMT até que ocorra a esfoliação, e estas misturas serão avaliadas através de DRX, MEV e MET. *Etapa 03* - Serão confeccionados seis compósitos a base de BisGMA/TEGDMA, e a carga utilizada será montmorollonita (MMT) nas concentrações 2,5; 5 e 10% em peso, sendo que metade destes compósitos terá Metronidazol incorporada na MMT e a outra não. A liberação de Metronidazol será avaliada através de fluorescência em luz ultra-violeta visível (320 nm) em três soluções com pH neutro (solução fisiológica), ácido e alcalino através de espectroscopia de UV (n=5 para cada solução). A atividade antimicrobiana será avaliada pela formação de halo de inibição em ágar com três bactérias diferentes (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus mutans* UA 159, e *Porphyromonas gingivalis* W83). *Etapa 04* – verificar a influência da presença da Metronidazol nas propriedades dos compósitos. Os compósitos utilizados terão a mesma composição da etapa 03. Serão confeccionados 20 espécimes (10x2x1) para cada compósito. Metade será armazenada a 37ºC por 24 horas e outra metade armazenada por 4 meses em solução de etanol à 75% à 37ºC. O módulo de elasticidade dos compósitos e a resistência à flexão serão obtidos através do teste de flexão em três pontos. A sorção será avaliada em espécimes cilíndricos (Ø=15 mm e h=1 mm) de acordo com as normas ISO 4049 (n=5). O grau de conversão será analisado utilizando-se FT-IR (n=5). A contração volumétrica pós-gel será mensurada por extensometria (n=5). *Etapa 05* - o objetivo desta etapa será determinar qual a menor concentração de Metronidazol presente em um compósito que será capaz de resultar em atividade antimicrobiana. Serão confeccionados dez compósitos a base de BisGMA/TEGDMA, e a carga utilizada será montmorollonita (MMT) com Metronidazol incorporada em concentrações desde 0,05% até 10% em peso. A liberação de Metronidazol será avaliada através de fluorescência em luz ultra-violeta visível (320 nm) em solução com pH neutro (solução fisiológica) através de espectroscopia de UV (n=5 para cada solução). A atividade antimicrobiana será avaliada pela formação de halo de inibição em ágar com três bactérias diferentes (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus mutans* UA 159, e *Porphyromonas gingivalis* W83). Para cada grupo serão realizadas 5 repetições. *Etapa 06* - o objetivo de verificar se a liberação de Metronidazol se mantém em compósitos mais rígidos (cargas híbridas de sílica/vidro de bário). Nesta etapa os compósitos terão diferentes composições, e a liberação de Metronidazol será avaliada através de fluorescência em ultra violeta. Espera-se ao final desse projeto ter a composição adequada de um compósito com finalidade odontológica com atividade antimicrobiana significativa, e propriedades mecânicas compatíveis com o seu uso clínico.

1. Introdução e Fundamentação Teórica

Materiais poliméricos vêm sendo utilizados na odontologia por quase 60 anos (Bowen, 1956), no entanto mesmo com o desenvolvimento tecnológico destes materiais, a contração de polimerização permanece como a grande desvantagem. Essa contração volumétrica, associada ao aumento do módulo de elasticidade, pode gerar tensões na interface dente/restauração levando ao insucesso das restaurações de compósitos (Ferracane and Mitchem, 2003). Estudos clínicos indicam que alguns dos problemas mais frequentes encontrados com restaurações em compósito estão associadas à falta da integridade marginal, como sensibilidade pós-operatória, descoloração marginal e, possivelmente, cárie secundária (Hilton, Bruntahler, Manhart).

Os compósitos encontrados comercialmente são constituídos por uma matriz orgânica de monômeros de metacrilato de metila reforçada com partículas de sílica ou outros vidros de metais pesados. Para esses materiais, a matriz orgânica apresenta-se como uma rede polimérica altamente cruzada resultado da combinação do BisGMA (dimetacrilato de glicidila bisfenol_A) com outros monômeros bifuncionais: dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), dimetacrilato de uretano (UDMA) e/ou o dimetacrilato de glicidila bisfenol A etoxilado (BisEMA). A formação desta rede polimérica, ou polimerização, se dá através de reações de radicais livres, mais comumente ativados pela exposição à luz visível (Floyd and Dickens, 2006).

As tentativas de se ter um material polimérico com propriedades bioativas na odontologia não obtiveram sucesso até o momento. Quando se tentou obter um material polimérico com atividade antimicrobiana através da adição de nanopartículas de prata o material obtido apresentou maior solubilidade (Durner et al., 2011), além da cor obtida ser pouco estética. Já quando se tentou obter um material polimérico com propriedades remineralizantes, não houve interação química entre o fosfato de cálcio e a matriz resinosa, o que resultou numa diminuição significativa das propriedades mecânicas (Rodrigues 2014), além disso o aumento do fosfato de cálcio resultou numa diminuição do grau de conversão dos compósitos (Aljabo et al., 2015).

O conceito de nanocompósitos surgiu como resultado do avanço da tecnologia da engenharia de materiais. Em particular a aplicação de nanocompósitos poliméricos reforçados com argila mineral (montmorillonita – MMT) tem se destacado nas indústrias automobilísticas, de embalagens, de biomateriais e aeroespacial (Gu et al., 2004; Touati et al., 2007; Zhou et al., 2005) devido as suas propriedades mecânicas superiores (Fournaris et al., 2001). A adição desse tipo de partículas de reforço às matrizes poliméricas à base de dimetacrilatos convencionais tem o intuito de reduzir a contração volumétrica em compósitos de uso odontológico (Campos et al., 2013; Discacciati and Orefice, 2007; Solhi et al., 2012).

A MMT, principalmente a sódica, é utilizada no desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos. Possui uma estrutura lamelar cristalina que consiste em camadas lamelares intercaladas de uma estrutura central octaédrica de alumina entre duas lâminas de estrutura tetraédrica de sílica e sucessivamente. As lamelas se organizam por empilhamento e estão interligadas por forças de van der Waals. Entre as lamelas, existem espaços regulares chamados espaçamento basal “d”, ou espaço interlamelar (Alexandre and Dubois, 2000). A MMT apresenta capacidade de absorção de moléculas orgânicas, aumentando o seu volume inicial, uma vez que suas lamelas se distanciam ou se dispersam ao longo da matriz. Essa absorção é observada quando a argila é incorporada numa matriz polimérica a base de dimetacrilatos (Kelly et al., 1994), e essa expansão poderia minimizar a contração de polimerização dos compósitos formados.

Em um estudo prévio que comparou materiais poliméricos com MMT e vidro de bário como carga, utilizando uma mesma matriz polimérica (BisGMA/TEGDMA) foi observado que o grau de conversão foi estatisticamente semelhante para os dois tipos de carga, mostrando que a adição de MMT não altera a cinética de polimerização dos dimetacrilatos. Além disso, para a MMT a menor concentração de carga (20% em volume) resultou num aumento estatisticamente significante do módulo de elasticidade e da resistência à flexão quando comparada com a mesma concentração de vidro de bário (Campos et al., 2016).

A capacidade da MMT em absorver moléculas orgânicas é responsável pela diminuição da contração volumétrica em matrizes orgânicas

a base de BisGMA/TEGDMA, assim como pela ligação da MMT à dimetacrilatos (Campos et al., 2013; Discacciati and Orefice, 2007; Solhi et al., 2012). Esse mesmo princípio de absorção de moléculas orgânicas pela MMT é explorado na indústria farmacêutica onde a MMT é utilizada como veículo de liberação controlada fármaco (He et al., 2006; Wang et al., 2008; Wu et al., 2013). Um estudo recente mostrou que a montomorilonita com Clorexidina incorporada resultou na liberação deste fármaco em uma cinética lenta (Wu et al., 2013). No entanto, Wu e colaboradores não utilizaram o complexo MMT/Clorexidina em uma matriz polimérica. Apesar de o autor utilizar o termo "nanocompósito", este termo se refere ao complexo CHX/MMT ou CHX+Cu/MMT. Sendo assim, não existem dados na literatura sobre a liberação de Clorexidina e sua atividade antimicrobiana quando o complexo CHX/MMT é associado a uma matriz polimérica convencional da odontologia (BisGMA/TEGDMA). Deve-se destacar que a capacidade de absorver moléculas orgânicas apresentada pela MMT possibilita que moléculas de fármaco sejam incorporadas, no entanto, após a incorporação da Metronidazol, não se conhece como e se ocorrerá a intercalação da dimetacrilatos, pois as lamelas já estarão parcialmente ocupadas por moléculas de Metronidazol. Dessa forma, é necessário que as propriedades mecânicas sejam verificadas como forma de avaliar se houve intercalação entre a carga e a matriz.

Largamente utilizado na periodontia para desinfecção de bactérias anaeróbias, o Metronidazol de uso tópico é utilizado com a finalidade de desorganizar o biofilme bacteriano e como terapia complementar da terapia convencional (raspagem periapical) (Carneiro *et al*., 2005; Griffiths, 2000). Na endodontia, segundo Siqueira Júnior e Useda (1997), o uso de Metronidazol, como medicação intra-canal, atuou de forma eficaz contra bactérias anaeróbias gram-positivas e gram-negativas (*Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium, Clostridium, Bacteróides e Eubacterium*), existentes no interior do canal radicular. Além disso, constatou-se que o uso de Metronidazol apresentou resultados antimicrobianos mais efetivos que medicações intra-canais como o hidróxido de cálcio associado com água destilada e a clorexidina. Ainda segundo Stanko *et al*., (2016) o mecanismo

de ação do Metronidazol se dá por difusão passiva, que atua na inibição da síntese do DNA das bactérias.

Ainda não há estudos sobre a liberação de Metronidazol, sua atividade antimicrobiana e propriedades mecânicas quando a MMT carregada com Metronidazol é associada a uma matriz polimérica convencional da odontologia (BisGMA/TEGDMA).

2. Resultados esperados

Espera-se com esse projeto que se estabeleça uma nova linha de pesquisa no IPEN - CNEN. Este projeto visa alcançar um conhecimento mais profundo no que se refere aos nanocompósitos à base de MMT para uso odontológico e da sua capacidade de liberação de fármacos. O presente estudo visa ainda desenvolver um material resinoso com atividade antimicrobiana. O projeto será dividido em seis diferentes etapas, cada uma delas com um objetivo específico. Abaixo um breve enunciado e descrição do objetivo em cada uma das etapas propostas, as metodologias que serão utilizadas serão todas descritas no item 3.1, pois podem se repetir em cada etapa.

ETAPA 1-) Secagem do complexo MMT / METRONIDAZOL

Apesar de termos a referencia de Wu em 2013 que descreveu o método de incorporação de fármaco na MMT, a secagem que ele propôs resultará em um material sólido, que deverá ser triturado para que possamos utilizá-lo disperso em uma matriz polimérica. Esse processo pode interferir na estrutura lamelar da MMT, resultando em um material com mais resistência para a intercalação da matriz polimérica. A liofilização á vácuo pode nos ajudar de duas formas, primeiro por ser mais rápida, e segundo por obtemos um pó. Sendo assim, o objetivo dessa primeira fase será testar o método proposto por Wu (2013) para secagem e compará-lo com a liofilização á vácuo através de difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

ETAPA 2-) Quantidade de METRONIDAZOL possível de ser incorporada na MMT

Quando a MMT absorve moléculas orgânicas o seu espaço interlamelar é alterado, até um limite onde ocorre a esfoliação, e esta partícula perde a sua estrutura lamelar. Precisamos saber qual a concentração máxima que podemos incorporar de Metronidazol sem que ocorra a esfoliação. Além disso, conforme será descrito de forma mais detalhada na etapa 5, queremos determinar qual a menor quantidade do complexo MMT / METRONIDAZOL produz atividade antimicrobiana. Dessa forma, o objetivo dessa etapa será determinar qual a maior porcentagem em peso de Metronidazol possível de ser incorporada na MMT sem que ocorra esfoliação. Para isso serão incorporadas (de acordo com o método determinado na fase anterior) diferentes concentrações de Metronidazol em incrementos de 1% em peso na MMT até que ocorra a esfoliação, e estas misturas serão avaliadas através de difração de raios X e microscopia eletrônica de transmissão.

ETAPA 3-) Liberação de METRONIDAZOL

Após definido a porcentagem de Metronidazol possível de ser incorporada na MMT é necessário saber se existe a liberação do fármaco a partir de um compósito polimerizado, e se essa liberação é suficiente para termos atividade antimicrobiana. Além disso, sabemos que na cavidade oral as alterações de pH são constantes, e precisamos saber se a liberação de Metronidazol é a mesma em meio neutro, ácido e alcalino. Para avaliarmos essa etapa 3 concentrações diferentes do complexo MMT/METRONIDAZOL serão confeccionados (2,5%, 5% e 10% em peso), e serão avaliadas a liberação de Metronidazol em três soluções com pH neutro (solução fisiológica), ácido e alcalino através de espectroscopia de UV. E a atividade antimicrobiana será avaliada pela formação de halo de inibição em ágar com três bactérias diferentes, e comparadas com a atividade antimicrobiana de compósitos confeccionados com as mesmas concentrações apenas de MMT para servirem como controle. Sendo assim, o objetivo dessa fase será avaliar a liberação de Metronidazol e atividade antimicrobiana de compósitos com MMT/METRONIDAZOL adicionado. A liberação de Metronidazol será avaliada ao longo de um ano através de fluorescência em luz ultra-violeta

visível. A atividade antimicrobiana será avaliada através do teste de difusão em ágar.

ETAPA 4-) Propriedades do compósito

É necessário verificar se a presença de Metronidazol no compósito interfere nas propriedades dos compósitos. Não pretendemos avaliar todas as propriedades físicas/mecânicas/químicas presentes na literatura, mas selecionaremos as que são mais usadas na odontologia como parâmetros de comparação entre compósitos. Os mesmos três compósitos descritos na etapa anterior serão utilizados para esta etapa, e serão comparados com compósitos com a mesma quantidade de MMT, no entanto sem adição de Metronidazol, apenas com a matriz resinosa, e com um compósito comercial a ser definido. Sendo assim o objetivo desta etapa será verificar a influência da presença da Metronidazol nas propriedades dos compósitos. Os compósitos utilizados terão a mesma composição da etapa 03. As propriedades que serão avaliadas serão grau de conversão, resistência à flexão e módulo de elasticidade (imediatos e após 4 meses de armazenamento), contração pós-gel, sorção e solubilidade.

ETAPA 5-) Determinação da mínima concentração com atividade antimicrobiana

Antes de explorar essa etapa alguns aspectos devem ser ressaltados. A MMT só funciona como reforça quando ocorre a intercalação ou a esfoliação das suas lamelas, grandes quantidades de MMT resultam em aglomerações, e estas atuam como “defeitos” na matriz diminuindo suas propriedades mecânicas (Campos et al., 2016). A atividade bacteriana desejada para um material resinoso é local, ou seja, não queremos que este material interfira na microbiota oral. Para isso é necessário que as concentrações de Metronidazol sejam mínimas (por este motivo também, o objetivo da etapa dois é saber qual o máximo de Metronidazol que podemos incorporar na MMT). Levando em consideração estes pontos, o objetivo desta etapa será determinar qual a menor concentração de Metronidazol presente em um compósito é capaz de resultar em atividade antimicrobiana. Este objetivo será avaliado utilizando-se formulações que variam a quantidade de

MMT/METRONIDAZOL desde 0,05% até 10% e sua atividade antimicrobiana através do teste de difusão em ágar, e a liberação através de fluorescência em ultra violeta.

ETAPA 6-) Confecção de compósitos híbridos

Levando em conta que deveremos usar a menor concentração de MMT/METRONIDAZOL o compósito resultante poderá apresentar baixas propriedades mecânicas, se o uso considerado for um compósito restaurador. Após determinada a mínima concentração necessária de MMT/METRONIDAZOL serão adicionadas sílica e vidro de bário ao compósito com o objetivo de verificar se as propriedades de liberação avaliadas continuam iguais em um compósito ainda mais rígido. Nesta etapa serão adicionadas sílica coloidal ou vidro de bário (ambos silanizados) em diferentes concentrações, e a liberação de Metronidazol será avaliada através de fluorescência em ultra violeta. Nesta etapa os compósitos terão a seguinte composição: MMT/METRONIDAZOL – a porcentagem em peso mínima determinada para ter inibição de crescimento bacteriano (de acordo com a etapa 5); vidro de bário: 0, 30 ou 50% em peso; sílica coloidal: 0, 30 ou 50% em peso.

2.1. Metodologias propostas

2.1.1. Preparação dos compósitos

Serão confeccionados compósitos experimentais com matrizes resinosas à base de Bis-GMA (ESSTECH Technology Essington, PA) e TEGDMA (ESSTECH) em proporções iguais em peso. Os compósitos terão como carga montmorilonita organofilizada (Cloisite 30B) com ou sem incorporação de Metronidazol, vidro de bário e sílica coloidal (na ETAPA 6). O sistema fotoiniciador utilizado será composto por amina terciária na concentração de 1% em peso, e canforoquinona também 0,8% em peso. Os compósitos serão manipulados em sala com iluminação amarela para evitar a polimerização durante o processo de confecção. Primeiramente será manipulado a matriz orgânica com o auxílio de uma balança analítica (Ohaus-Adventure, Xangai, China), para a incorporação da carga será utilizado um misturador automático à vácuo (SpeedMixer DAC 150 FVZ, Hauschild) por

um período de 3 minutos numa velocidade de 3500 rpm. Os compósitos serão armazenados em frascos escuros hermeticamente fechados, e mantidos sob refrigeração até o momento do uso.

2.1.2. Incorporação de Metronidazol na MMT

Metade da montmorilonita que será utilizada terá a incorporação de Metronidazol. A MMT será colocada em solução aquosa de Metronidazol monohidratado, numa proporção em peso que será definida na ETAPA 2, a mistura será realizada com agitação de constante por 3 horas à uma temperatura de 80°C. O método de secagem será determinado na ETAPA 1.

2.1.3. Interação carga matriz - Difração de Raios X

Com o objetivo de analisar o estado de dispersão da carga argilomineral em relação a matriz polimérica utiliza-se a difração de raios X, que permite determinar a distância entre as lamelas da MMT, ou seja, a interação carga/matriz. Assim, para os compósitos com carga a base de montmorilonita os espécimes utilizados para avaliação do grau de conversão serão levados à um difratômetro de raios X (X'Pert PRO, detector X'Celerator, Panalytical, pertencente ao departamento de Minas e Petróleo – POLI – USP). Primeiramente será determinado o pico de referência utilizando-se apenas o pó puro de montmorilonita. A partir disto, nos compósitos a interação carga/matriz será determinada de acordo com a presença, ausência ou deslocamento desse pico.

2.1.4. Interação carga matriz – Análises por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitirá observar a morfologia dos compósitos experimentais adicionados com carga inorgânica argilomineral. As análises serão realizadas no microscópio Quanta 600 FEG, marca FEI, equipado com espectrômetro de raios X por dispersão de energia (EDS) Quantax 400 (tecnologia SDD – Silicon Drift Detector) e software Sprit, marca Bruker. As amostras serão aderidas em fita dupla face de carbono, recobertas com platina e fixadas em suporte próprio para MEV. As análises serão realizadas no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do

Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo, da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

Por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão será possível observar, através de imagens, a interação da matriz polimérica em relação à nanopartícula argilomineral MMT, possibilitando assim complementar os dados obtidos por meio da metodologia Difração de Raio-X. Os espécimes utilizados nessa metodologia serão inicialmente ultra microtomizados (cortados) em filmes na espessura de 60 nm por meio de uma faca diamantada, no equipamento Leica Ultracut UCT Ultramicrotome, do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo. Após o corte, os espécimes serão inseridos em um grid de 200 mesh, próprio para essa metodologia. A microscopia será realizada por meio do equipamento JEOL Electron Microscope – JEM 1010 do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo.

2.1.5. Ensaio de Liberação

Serão confeccionados espécimes utilizando uma matriz de silicone com 5,0mm de diâmetro e 1,0mm de espessura, entre duas laminas de vidro. A fotopolimerização será feita utilizando uma dose de aproximadamente 18J/cm^2. Os espécimes (n=5) serão previamente pesados, introduzidos em frascos contendo 5 ml de solução tampão salino (pH 7, 50 mM) e então submetidos a incubação em shaker sob temperatura de 37ºC e agitação mecânica de 80 rpm. Alíquotas de 200 µl serão coletados nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas e, a cada 24 horas durante 5 dias (de 0 a 96 horas), e posteriormente semanalmente até atingir 01 ano (para a ETAPA 3).

Quantificação da Metronidazol

A quantificação da Metronidazol será realizada por análises de UV no comprimento de onda de 320 nm (Young et al., 2008; Zeng et al., 2009) em leitora de microplaca i3x Spectramax (Molecucar Devices, USA).

Intumescimento/Perda de massa

De modo a permitir uma compreensão a cerca do possível mecanismo de liberação, serão realizados, além da quantificação da Metronidazol, ensaios com o objetivo de avaliar a nanoestrutura do material desenvolvido.

Visando determinar o índice de intumescimento do material, após a última coleta do experimento de liberação, os espécimes serão pesados e o intumescimento será calculado de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ intumescimento} = (m_{inicial} - m_{final}) / m_{inicial} * 100 \qquad \text{(equação 1)}$$

Visando avaliar a integridade do material, decorrido o ensaio de liberação, os espécimes serão armazenados em estufa até obtenção da massa constante (cerca de 48 horas) sob temperatura de 50ºC. Os espécimes serão então submetidos à pesagem e a possível perda de massa será calculada de acordo com a equação 2.

$$\%\text{perda de massa} = M_{inicial} - m_{final} *100 \qquad \text{(equação 2)}$$

2.1.6. Avaliação da atividade antimicrobiana

Microrganismos e condições de cultivo

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, os seguintes microrganismos serão avaliados: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus mutans* UA 159, e *Porphyromonas gingivalis* W83. Esses microrganismos serão rotineiramente mantidos em BHI glicerol à 20%, à -70 ^{o}C. Os microrganismos serão cultivados em meio BHI caldo e/ou BHI ágar, sob condições de aerobiose (*S. aureus*) ou anaerobiose (*S. mutans*), à 37 ^{o}C. Para a espécie P. gingivalis, os meios de cultura serão acrescidos de hemina (5 µg/mL) e menadiona (1 µg/mL) para o meios caldo e ágar, e 5% de sangue de carneiro para o meio de cultura ágar.

Teste de sensibilidade bacteriana pela técnica de difusão em ágar

A técnica de difusão em ágar será realizada segundo as recomendações do CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição, M2-A8). Uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 0,1 (absorbância, OD_{625}= 0.1) será preparada com cada um dos microrganismos com auxílio de um espectrofotômetro. As placas de petri contendo o meio BHI ágar serão inoculadas com essa suspensão bacteriana utilizando uma espátula estéril, esfregando–a em toda a superfície estéril do ágar.

Serão confeccionados espécimes utilizando uma matriz de silicone com 7,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura, entre duas laminas de vidro. A fotopolimerização será feita utilizando uma dose de aproximadamente 18J/cm^2.

Para cada grupo serão confeccionadas 5 espécimes que serão posicionados na superfície da placa de ágar semeada. As placas contendo o microrganismo *S. aureus* serão incubadas em condições de aerobiose enquanto que as placas contendo *S. mutans* serão incubadas em jarras de anaerobiose. Todas as placas serão mantidas a 37 ^{o}C, por 18 horas. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição total serão mensurados com uso de um paquímetro digital, em mm. O halo de inibição será considerado a área sem crescimento detectável a olho nu.

2.1.7. Grau de conversão

O grau de conversão será determinado em um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) pertencente ao Departamento de Biomateriais, da Faculdade de Odontologia da USP (Vertex 70, Bruker Optik GmbH, Alemanha). Para cada compósito serão confeccionados 5 repetições. Os espécimes serão confeccionados utilizando uma matriz de silicone com 7,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura, entre duas laminas de vidro. Após a inserção do compósito, o conjunto será posicionado no FTIR para que o feixe de laser passe no centro do espécime. A fotopolimerização seguirá o mesmo padrão dos testes anteriormente descritos, utilizando uma dose de aproximadamente 18J/cm^2. Serão colhidos espectros do compósito não polimerizado, imediatamente após a polimerização, e 24 horas após a polimerização. Cada espectro é composto por duas varreduras com resolução de 4 cm^{-1}. Utilizando o software Opus v.6 (Bruker Optics), a área abaixo do pico 6165 cm^{-1}, correspondente à ligação vinílica, será calculada (Boaro et al., 2013; Tantbirojn et al., 2011). O grau de conversão será calculado considerando-se a área do espectro do material polimerizado e não polimerizado.

2.1.8. Módulo de elasticidade e resistência à flexão

Para cada compósito, vinte corpos-de-prova serão confeccionados com auxílio de uma matriz de aço bi-partida nas dimensões 10x2x1 mm. A fotoativação será realizada utilizando uma dose de 18J/cm^2. Metade dos espécimes (n=10) serão armazenados a seco a 37ºC por 24 h após a fotoativação. A outra metade será armazenada em água destilada trocada semanalmente por quatro meses, também a 37ºC. O teste de dobramento em três pontos será realizado em máquina universal de ensaios (EMIC recentemente adquirida com o projeto FAPESP: 2013/157712), com distância entre os apoios de oito milímetros. De acordo com o gráfico de carga em função do deslocamento obtido para cada corpo-de-prova, valores compreendidos na porção linear serão utilizados para o cálculo do módulo de elasticidade em flexão, segundo a fórmula:

$$E = \frac{C \times L^3}{4 \times b \times h^3 \times d} x 10^{-3}$$

Onde: *f* é o módulo de elasticidade em flexão (GPa), *C* é a carga registrada durante a deformação elástica (N), L é a distância entre os apoios (mm), *b* é a largura do corpo de prova (mm), *h* é a altura do corpo de prova (mm) e *d* é a deflexão correspondente a *C*.

Para o cálculo da resistência a flexão a seguinte fórmula será utilizada:

$$\sigma = \frac{3 \times F \times L}{2 \times b \times h^2}$$

onde: σ é a resistência à flexão (MPa),F é a carga máxima registrada (N) antes do espécime fraturar, L é a distância entre os apoios (mm), *b* é a largura do corpo de prova (mm), *h* é a altura do corpo de prova (mm).

2.1.9. Contração volumétrica pós-gel

A contração volumétrica pós-gel será mensurada utilizando o método “strain gage” biaxial (Boaro et al., 2010; Sakaguchi et al., 1997). Um extensômetro (PA-06-060BG-350LEN Excel, São Paulo, Brasil) uni-direcional conectado a um adaptador de extensômetros para maquinas de ensaios universais (INSTRON) que permite a transmissão de sinais da deformação da

resina inserida sobre o extensômetro. Este conjunto estará conectado a um micro-computador que, por meio de software específico (BlueHill), receberá os sinais da placa de aquisição de dados. O compósito será pesado, e aproximadamente 0,1g serão colocados sobre o extensômetro, e em seguida o compósito será fotoativado com a mesma dose descrita anteriormente 18J/cm^2, e a contração será monitorada por 5 minutos a partir da fotoativação. A deformação decorrente da contração do material será mensurada em duas direções perpendiculares. Para cada compósito testado serão feitos cinco corpos-de-prova.

2.1.10. Sorção e Solubilidade

Espécimes cilíndricos com 15 mm de diâmetro e um milímetro de altura serão confeccionados utilizando-se uma matriz de aço (n=5). A fotoativação será realizada com uma dose de aproximadamente 18J/cm^2, após a remoção do espécime da matriz a superfície oposta também receberá a mesma dose para garantir a máxima polimerização do espécime. Em seguida os espécimes serão submetidos a uma dessecação em um dissecador a vácuo à 37ºC por 28 dias. Os espécimes serão pesados em uma balança de analítica (Ohaus-Adventure, AR214N, Xangai, China) para a obtenção de m_1. O diâmetro e a altura de cada espécime serão mensurados para o cálculo do volume.

Em seguida os espécimes serão imersos em água destilada a 37ºC, trocada semanalmente para evitar alteração do pH, por 28 dias. Os espécimes serão levemente secos com papel absorvente, e novamente pesados para obtenção de m2. Os espécimes serão então dessecados como descrito anteriormente por 90 dias, e pesados para obtenção de m3. A sorção e a solubilidade serão calculadas para cada espécime de acordo com as seguintes fórmulas:

$$SR = \frac{m_2 - m_1}{V} \qquad SL = \frac{m_1 - m_3}{V}$$

onde: SR é a sorção, SL é a solubilidade, m_1 é a massa obtida após a secagem incial do espécime (µg), m_2 a massa após o período de imersão em

água (µg), m_3 a massa final após a dessecação do espécime (µg), e V é o volume de cada espécime (mm^3).

2.1.11. Análise estatística

Os dados serão analisados utilizando-se ANOVA/Tukey (α=5%) de acordo com as condições de normalidade e homocedasticidade. Para as variáveis que foram avaliadas antes e após o armazenamento o teste "t" de Student será utilizado.

3. Referências Bibliográficas

Alexandre M, Dubois P (2000). Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science & Engineering R-Reports* 28(1-2)*:*1-63.

Aljabo A, Xia W, Liaqat S, Khan MA, Knowles JC, Ashley P *et al.* (2015). Conversion, shrinkage, water sorption, flexural strength and modulus of re-mineralizing dental composites. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 31(11)*:*1279-1289.

Boaro LC, Goncalves F, Guimaraes TC, Ferracane JL, Versluis A, Braga RR (2010). Polymerization stress, shrinkage and elastic modulus of current low-shrinkage restorative composites. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 26(12)*:*1144-1150.

Boaro LC, Goncalves F, Guimaraes TC, Ferracane JL, Pfeifer CS, Braga RR (2013). Sorption, solubility, shrinkage and mechanical properties of "low-shrinkage" commercial resin composites. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 29(4)*:*398-404.

Bowen RL (1956). Use of epoxy resins in restorative materials. *J Dent Res* 35(3)*:*360-369.

Campos L, Parra D, Vasconcelos M, Monteiro J (2013). DH and ESPI laser interferometry applied to the restoration shrinkage assessment. *Radiation Physics and Chemistry*.

Campos L, Boaro L, Braga R, Parra D (2016). Chlorhexidine Loaded MMT as Dental Composite Filler: Release Evaluation. *Materia (UFRS).*

Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S *et al.* (2012). Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 28(5)*:*573-583.

Discacciati JAC, Orefice RL (2007). Structural analysis on photopolymerized dental resins containing nanocomponents. *Journal of Materials Science* 42(11)*:*3883-3893.

Durner J, Stojanovic M, Urcan E, Hickel R, Reichl FX (2011). Influence of silver nano-particles on monomer elution from light-cured composites. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 27(7)*:*631-636.

Ferracane JL, Mitchem JC (2003). Relationship between composite contraction stress and leakage in Class V cavities. *Am J Dent* 16(4)*:*239-243.

Floyd CJ, Dickens SH (2006). Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 22(12)*:*1143-1149.

Fournaris KG, Boukos N, Petridis D (2001). Aqueous polymerization of protonated 4-vinylpyridine in montmorillonite. *Applied Clay Science* 19(1-6)*:*77-88.

Gu SY, Ren J, Wang QF (2004). Rheology of poly(propylene)/clay nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science* 91(4)*:*2427-2434.

He HP, Yang D, Yuan P, Shen W, Frost RL (2006). A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and Chlorhexidini Acetas. *Journal of Colloid and Interface Science* 297(1)*:*235-243.

Kelly P, Akelah A, Qutubuddin S, Moet A (1994). Reduction of Residual-Stress in Montmorillonite Epoxy Compounds. *Journal of Materials Science* 29(9)*:*2274-2280.

Sakaguchi RL, Versluis A, Douglas WH (1997). Analysis of strain gage method for measurement of post-gel shrinkage in resin composites. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 13(4)*:*233-239.

Solhi L, Atai M, Nodehi A, Imani M (2012). A novel dentin bonding system containing poly(methacrylic acid) grafted nanoclay: Synthesis, characterization and properties. *Dental Materials* 28(10)*:*1041-1050.

Spencer P, Ye Q, Misra A, Goncalves SE, Laurence JS (2014). Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *Journal of dental research* 93(12)*:*1243-1249.

Tantbirojn D, Pfeifer CS, Braga RR, Versluis A (2011). Do low-shrink composites reduce polymerization shrinkage effects? *J Dent Res* 90(5)*:*596-601.

Touati N, Kaci M, Ahouari H, Bruzaud S, Grohens Y (2007). The effect of gamma-irradiation on the structure and properties of Poly(propylene)/clay nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering* 292(12)*:*1271-1279.

Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A (2012). Chlorhexidine (METRONIDAZOL) in dentistry: state of the art. *Minerva stomatologica* 61(9)*:*399-419.

Wang XY, Du YM, Luo JW (2008). Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. *Nanotechnology* 19(6).

Wu Y, Zhou NL, Li WH, Gu H, Fan YT, Yuan J (2013). Long-term and controlled release of chlorhexidine-copper(II) from organically modified. montmorillonite (OMMT) nanocomposites. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 33(2)*:*752-757.

Young AM, Ng PY, Gbureck U, Nazhat SN, Barralet JE, Hofmann MP (2008). Characterization of chlorhexidine-releasing, fast-setting, brushite bone cements. *Acta biomaterialia* 4(4)*:*1081-1088.

Zeng P, Zhang G, Rao A, Bowles W, Wiedmann TS (2009). Concentration dependent aggregation properties of chlorhexidine salts. *International journal of pharmaceutics* 367(1-2)*:*73-78.

Zhang JF, Wu R, Fan Y, Liao S, Wang Y, Wen ZT *et al.* (2014). Antibacterial dental composites with chlorhexidine and mesoporous silica. *Journal of dental research* 93(12)*:*1283-1289.

Zhou YX, Rangari V, Mahfuz H, Jeelani S, Mallick PK (2005). Experimental study on thermal and mechanical behavior of polypropylene, talc/polypropylene and polypropylene/clay nanocomposites. *Materials Science and Engineering a-Structural Materials Properties Microstructure and Processing* 402(1-2)*:*109-117.