



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MARI MIURA SUGII

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E
ANTIMICROBIANAS DA RESINA PARA FIXAÇÃO DE BRÁQUETES COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIAS QUATERNÁRIAS**

**PHYSICAL, CHEMICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES
EVALUATION OF A RESIN BASED MATERIAL FOR BRACES
CEMENTATION CONTAINING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF
QUATERNARY AMMONIUM**

Piracicaba

2015

MARI MIURA SUGII

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E
ANTIMICROBIANAS DA RESINA PARA FIXAÇÃO DE BRÁQUETES COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIAS QUATERNÁRIAS**

**PHYSICAL, CHEMICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES
EVALUATION OF A RESIN BASED MATERIAL FOR BRACES
CEMENTATION CONTAINING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF
QUATERNARY AMMONIUM**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica, na Área de Dentística.

Dissertation presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Dental Clinic in Operative Dentistry Area.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno, e orientada pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar

Piracicaba

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/15518-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marlene Girello - CRB 8/6159

Su35a Sugii, Mari Miura, 1990-
Análise das propriedades físicas, químicas e antimicrobianas da resina para fixação de bráquetes com diferentes concentrações de amônias quaternárias / Mari Miura Sugii. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Flávio Henrique Baggio Aguiar.
Coorientador: Ubirajara Pereira Rodrigues Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Placa dentária. 3. *Streptococcus mutans*. 4. Cimentos dentários. 5. Propriedades físicas. 6. Compostos de amônio quaternário. I. Aguiar, Flávio Henrique Baggio, 1977-. II. Rodrigues Filho, Ubirajara Pereira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Physical, chemical and antimicrobial properties evaluation of a resin based material for braces cementation containing different concentrations of quaternary ammonium

Palavras-chave em inglês:

Anti-infective Agents
Dental plaque
Streptococcus mutans
Dental cements
Physical properties
Quaternary ammonium compounds

Área de concentração: Dentística

Titulação: Mestra em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Flávio Henrique Baggio Aguiar [Orientador]
Anderson Catelan
Flávia Lucisano Botelho do Amaral

Data de defesa: 11-12-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 11 de Dezembro de 2015, considerou a candidata Mari Miura Sugii aprovada.

PROF. DR. FLÁVIO HENRIQUE BAGGIO AGUIAR
PROF^a DR^a FLÁVIA LUCISANO BOTELHO AMARAL
PROF. DR. ANDERSON CATELAN

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais **Marcia e Julio** por acreditarem no meu trabalho. Agradeço em especial à minha mãe, pessoa que admiro pela força e vivacidade. Agradeço o amor incondicional dado a mim desde sempre, o apoio e incentivo a todos os meus projetos de vida. Agradeço por sempre me direcionar ao conhecimento e ao que é novo.

Agradeço ao meu namorado **Ricardo** por toda companhia, pelo ombro amigo, pelos cafés da manhã em dias de preguiça e pelas dicas do pacote Office. Sobretudo, agradeço a paciência, o maravilhoso convívio que tivemos e tudo o que foi agregado a minha vida com a sua presença. A maneira como você busca excelência em todos os seus trabalhos me inspira! Aproveito para agradecer também **Rosa e Alfredo** por todo cuidado e carinho, os quais não têm preço.

Agradeço ao **Pedro** por todo carinho e paciência.

Ao professor **Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar** pelo conhecimento partilhado, tempo e dedicação ao projeto. Serei para sempre grata pela oportunidade e pela confiança no meu trabalho.

Ao professor **Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho** que me recebeu tão bem em seu laboratório e dividiu seu vasto conhecimento em química. Obrigada pela colaboração, tempo e paciência.

Ao professor **Dr. Francisco Carlos Groppo** agradeço pela colaboração e disponibilidade.

À professora **Dra Karina Cogo Müller** por ter me ensinado e participado ativamente dos meus dias no laboratório de microbiologia. Agradeço muito a parceria.

Aos professores da Área de Dentística: **Luís Roberto Marcondes Martins, Giselle Maria Marchi Baron, Marcelo Giannini, Luís Alexandre Paulillo e Débora Alves Nunes Leite Lima** muito obrigada pelos seus ensinamentos.

Aos professores **Américo Correr, Giselle Marchi Baron e Karina Cogo** por terem aceito o convite para banca da qualificação e pelas preciosas considerações.

Aos amigos que fiz durante o mestrado: **Wal, Jéssica, Michele, Thayla, Cristiane, Suelen e Thatiana**. Com vocês eu me senti segura! Neste mestrado, o

companheirismo; conselhos e todo conhecimento que vocês dividiram comigo foram imprescindíveis. Poder contar com vocês também para momentos de descontração e risadas foi incrível!

Dinho, não tenho palavras para agradecer sua paciência e prontidão para me ajudar. Você é uma pessoa que eu admiro e tenho como exemplo.

Fernanda, companheira de casa, agradeço a sua companhia diária, os jantares e as nossas conversas até tarde. Morar com você foi uma das surpresas mais felizes desses anos.

Agradeço aos alunos do doutorado **Núbia, Lucinha, Livia e Maria** por tudo que foi compartilhado comigo.

Às meninas que me acolheram em São Carlos: **Mariana, Marília Sônego, Marília Vilela e Taína**. Fui adotada e acolhida por vocês. Agradeço e continuarei agradecendo infinitamente!

Aos alunos e funcionários que me acolheram no laboratório do Instituto de Química de São Carlos: **Elías, Jean, Mateus, Marília, Júlia, Fábio e Guto**. Agradeço em

especial ao **Fábio** pelo comprometimento e entusiasmo com que abraçou meu projeto. Agradeço os dias de trabalho no laboratório, a paciência e as consultorias por **Skype**.

Mônica, agradeço pela paciência e pela ajuda no dia-a-dia do departamento.

Ao **Marcos** e à **Eliane** por todo o suporte nos laboratórios e no uso dos equipamentos.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba** da **Universidade Estadual de Campinas**, pela oportunidade de desenvolver meu projeto de pesquisa como aluna desta instituição.

À **FAPESP**, agradeço pela concessão da bolsa (#2013/15518-5) para desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

A fixação de acessórios ortodônticos na cavidade bucal favorece maior acúmulo de biofilme dental. Para minimizar o risco do desenvolvimento de lesões cariosas, materiais utilizados para fixação destes acessórios acrescidos de grupamentos químicos funcionais com efeito antimicrobiano têm sido desenvolvidos. Desta forma, os objetivos deste estudo foram: 1) Sintetizar e caracterizar um organossilano modificado por amônias quaternárias (ORMOSIL-QAMS); 2) Avaliar as propriedades físico-químicas da resina Transbond XT Light Cure Adhesive (3M Unitek) acrescida de 10% e 15% em massa de ORMOSIL-QAMS e 3) Avaliar o efeito antimicrobiano do acréscimo de 10% e 15%, em massa, de ORMOSIL-QAMS à resina Transbond XT ou aplicando-o como material de recobrimento. O ORMOSIL-QAMS foi sintetizado por uma reação de hidrólise e condensação (sol-gel). Na primeira etapa, alcoxisilanos contendo amônias quaternárias foram obtidos. Em seguida, uma rede silicato englobando os alcoxisilanos foi criada, levando à formação do ORMOSIL-QAMS. O produto da síntese foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho e fluorescência de Raios-X. Os testes de grau de conversão (DC) (n=7); sorção de água (Wsp) (n=9); solubilidade (Wsl) (n=9); resistência coesiva (UTS) (n=10) e resistência ao cisalhamento (SBS) (n=10) foram realizados após 24 h da confecção dos espécimes para os grupos: T – Resina Transbond XT Light Cure Adhesive; T10% - Resina Transbond XT contendo 10%, em massa de ORMOSIL-QAMS; T15% - Resina Transbond XT contendo 15% em massa, de ORMOSIL-QAMS. Para avaliar o efeito antimicrobiano um grupo de estudo foi adicionado: TC – Resina Transbond XT recoberta por duas camadas de ORMOSIL-QAMS. A formação de biofilme de *Streptococcus mutans* UA159 foi realizada em corpos-de-prova de resina correspondente a cada grupo, utilizando meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) com 1% de sacarose por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Os dados de propriedades físico-químicas foram submetidos à análise ANOVA e Tukey pós-teste ($\alpha=0,05$). Os dados obtidos do ensaio de formação de biofilme foram submetidos à análise não paramétrica Kruskal-Wallis e pós-teste Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$). A espectroscopia por infravermelho confirmou a presença da rede silicato e dos grupos de amônia quaternária. A fluorescência de Raios-x detectou a presença dos elementos silício e iodo. O DC dos compósitos não diferiu ($p>0,05$). Quanto maior a quantidade de ORMOSIL-QAMS inserido na resina composta, menores

taxas de sorção de água e solubilidade foram observadas ($p < 0,05$). Em contrapartida, a resistência coesiva do material diminuiu para ambas concentrações de ORMOSIL-QAMS ($p < 0,05$) e a resistência ao cisalhamento diminuiu para a concentração de 15% ($p < 0,05$). Para o ensaio de formação de biofilme, não houve diferença entre o grupo controle e os grupos em que o ORMOSIL-QAMS foi adicionado ($p > 0,05$). Apenas a aplicação do ORMOSIL-QAMS como material de recobrimento apresentou atividade antimicrobiana. Concluiu-se que a adição de ORMOSIL-QAMS reduziu a resistência coesiva e ao cisalhamento da resina para fixação de bráquetes. No entanto, a utilização como material de resobrimento de superfície promoveu redução significativa da formação biofilme 24 h de *S. mutans*.

Palavras-chave: Agentes Antimicrobianos; Biofilme Dentário; *Streptococcus mutans*; Propriedades físicas; Adesivos Ortodônticos.

ABSTRACT

Despite the great need and applicability of orthodontic treatment, most of them include cementation of orthodontic brackets and other metal accessories on tooth surface. Recently, the chemical composition of dental materials has been explored to obtain some specific properties. With regard to composite resins for bonding fixed appliances in orthodontics, antibacterial property is desirable due to cleaning difficulties and biofilm accumulation. Thus the aim of this study was to develop an organosilane with quaternary ammonium group (ORMOSIL-QAMS) and assess chemical and physical properties of Transbond XT Light Cure Adhesive containing 10 wt% and 15 wt% ORMOSIL-QAMS. Furthermore, the study aimed to evaluate its antimicrobial effect incorporated (10 wt% and 15 wt%) to Transbond XT Light Cure Adhesive (3M Unitek) or used as a coating material. A reaction of hydrolysis and condensation (sol-gel) was employed to develop ORMOSIL-QAMS. On the first step, alkoxy silanes containing quaternary ammonium group were obtained. Then a silicate network wrapping the quaternary ammonium was created, leading to the formation of ORMOSIL-QAMS. Synthesis product was characterized by infrared spectroscopy and X-Ray fluorescence. Degree of conversion (DC) (n=7); water sorption (Wsp) (n=9); solubility (Wsl) (n=9); ultimate tensile strength (UTS) (n=10) and shear bond strength (SBS) (n=10) tests were done after 24 h of storage, for the following groups: T – composite resin Transbond XT; T10% - Transbond XT containing 10 wt% of ORMOSIL-QAMS; T15% - Transbond XT containing 15 wt% of ORMOSIL-QAMS. For antibacterial properties one group was added: TC – Transbond XT covered by two layers of ORMOSIL-QAMS. *Streptococcus mutans* UA159 were grown for 24 h in Brain-Heart-Infusion (BHI) supplemented with 1% sucrose at 37 °C and 5% CO₂. Physico-chemical properties data were subjected to ANOVA and Tukey's post hoc test ($\alpha=0.05$). The antibacterial test values were subjected to non-parametric Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls test ($\alpha = 0.05$). The DC did not differ between groups ($p>0.05$). Water sorption and solubility decreased as the percentage of ORMOSIL-QAMS inserted increased ($p<0.05$). Though, ultimate tensile strength values decreased for both ORMOSIL-QAMS concentrations ($p<0.05$). Shear bond strength diminished only for T 15% ($p<0.05$). For antimicrobial test there was no difference between control group and groups where the ORMOSIL-QAMS were added ($p>0.05$). Only the coating

application resulted in less *S. mutans* biofilm formation in 24 hours ($p < 0.05$). Based on this study it is possible to conclude that incorporating ORMOSIL-QAMS to Transbond XT adversely affected shear bond strength and ultimate tensile strength properties. Additionally, ORMOSIL-QAMS presented the expected antimicrobial activity when applied as coating on the sample surface, diminishing *S. mutans* biofilm formation considerably.

Keywords: Anti-Infective Agents; Dental Plaque; *Streptococcus mutans*; Physical properties; Dental Cements; Silanes; Quaternary Ammonium Compounds

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 ARTIGO: Physical, chemical and antimicrobial evaluation of a composite resin for braces cementation containing different concentrations of quaternary ammonium.....	17
3 CONCLUSÃO.....	36
4 REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE	40
ANEXO	55

1 INTRODUÇÃO

A demanda por tratamento ortodôntico tem aumentado nos últimos anos e em muitos casos tornou-se indispensável para restabelecer a saúde, função e estética do paciente. Porém, apesar da grande necessidade e aplicabilidade dos diferentes tipos de tratamento ortodôntico é necessário reconhecer seus aspectos negativos.

Grande parte das opções de tratamento incluem a cimentação de bráquetes e outros acessórios metálicos nas faces vestibular e/ou palatina dos dentes, além do uso de ligaduras e fios. Todos estes aparatos cimentados na cavidade bucal dificultam a higienização e favorecem grande acúmulo de biofilme, responsável por problemas como cárie dental (Gorelick et al. 1982; Lodaya et al. 2011) e doença periodontal (Lodaya et al. 2011). A cárie dental é uma doença causada por bactérias e que causa a desmineralização do tecido dental, formando inicialmente lesões de mancha branca (Lodaya et al. 2011), que se evoluírem levam à perda de estrutura dental e cavitação. Durante a movimentação ortodôntica, 25% dos pacientes desenvolvem lesões de mancha branca (Julien et al. 2013; Lovrov et al. 2007).

A devida prevenção da cárie dental exige esforços necessários por parte do paciente como: correta higienização do aparelho e do meio bucal, e uma dieta menos cariogênica (Bahoum et al. 2012). Cabe ao cirurgião dentista instruir o paciente em relação às técnicas de higiene oral, realizar aplicações tópicas de flúor e optar por materiais que auxiliam na prevenção da cárie dental (Julien et al. 2013; Lovrov et al. 2007).

Atualmente existem à disposição do ortodontista diversos materiais para fixação dos dispositivos ortodônticos, cada qual com suas particularidades. Dentre eles: cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Ali and Maroli 2012); sistemas resinosos convencionais - ácido + *primer* + resina (Dawood et al. 2012) e sistemas resinosos autocondicionantes - *primer* ácido + resina ou de passo único (Fleming et al. 2012).

Quanto ao cimento de ionômero modificado por resina, as propriedades que contribuem para sua escolha são a liberação de flúor (anticariogênico),

biocompatibilidade e adesão química à estrutura dental, dispensando o condicionamento ácido (Charles 1998). Entretanto, este sistema apresenta menor resistência de união se comparado às resinas compostas (Kirovski and Madzarova 2000).

As resinas compostas têm apresentado maior resistência de união entre os sistemas de cimentação de bráquetes (Bishara et al. 1998; Fajen et al. 1990; Miguel et al. 1995; Norevall et al. 1996) e dentre os sistemas resinosos, o sistema convencional apresentou maiores valores de resistência à tração se comparados aos auto-condicionantes (Sreedhara et al. 2015).

Recentemente, tem se explorado diferentes composições químicas dos materiais para obtenção de propriedades desejadas. Para os materiais resinosos utilizados na ortodontia, além das propriedades mecânicas, propriedades antibacterianas também são desejáveis, devido à dificuldade de higienização e grande acúmulo de biofilme. Desta forma, compostos antimicrobianos têm sido amplamente explorados pela indústria e pelo setor da saúde, no intuito de minimizar a contaminação e as infecções causadas por bactérias (Kenawy et al. 2007). Dentre eles, o cloreto de 3-(trimetóxisilil)propil(dimetil)octadecilamônio (SiQAC), um tri-alcoxissilano organofuncionalizado, devido à baixa citotoxicidade, também tem sido usado como agente modificador com efeito antimicrobiano em revestimentos de aparatos médicos (Gottenbos et al. 2002; Oosterhof et al. 2006). Neste composto, a atividade bactericida é atribuída à longa cadeia lipofílica ($-C_{18}-H_{37}$) que penetra na membrana bacteriana causando perda de água, autólise e morte celular (Morgan and Wilson 2000). A desvantagem deste tipo de revestimento é a perda da atividade antimicrobiana pelo desgaste da superfície. Pensou-se então na incorporação do SiQAC à composição da resina (Gong et al. 2012a).

Num estudo de 2012 (Gong et al. 2012a), uma nova classe de macromônmeros de metacrilato foi estudada: “quaternary ammonium methacryloxy silicates” (QAMS), contendo SiQAC. Neste estudo comprovou-se que os QAMS são macromônmeros antimicrobianos que quando

copolimerizados com bisfenol glicidil metacrilato (bis-GMA) formam uma rede interpenetrante híbrida inorgânica-orgânica cujas propriedades antimicrobianas são mantidas. Em outro estudo, também de 2012, (Gong et al. 2012b) aplicou-se os QAMS em resinas acrílicas de aparelhos ortodônticos removíveis e constatou-se atividade bactericida contra *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naselundii* e diminuição da adesão de *Candida albicans*. Além disso, as resinas acrescidas de QAMS tiveram sua resistência mecânica melhorada. Adicionalmente, há relatos na literatura de que tais propriedades se mantêm mesmo após envelhecimento em água para as resinas de bis-GMA contendo sais de amônia quaternária (Cheng et al. 2012; Lai et al. 2004).

Assim o objetivo do presente estudo foi desenvolver e caracterizar um novo organossilano contendo amônia quaternária (ORMOSIL-QAMS); avaliar seu efeito antimicrobiano contra formação de biofilme de *S. mutans* quando incorporado (10% e 15% em massa) ao cimento Transbond XT Light Cure Adhesive ou quando utilizado como material de recobrimento, assim como avaliar as propriedades físicas e químicas do cimento após incorporação de ORMOSIL-QAMS.

2 ARTIGO: PHYSICAL, CHEMICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES EVALUATION OF A RESIN BASED MATERIAL FOR BRACES CEMENTATION CONTAINING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF QUATERNARY AMMONIUM

Artigo submetido ao periódico Dental Materials (Anexo)

Mari Miura Sugii; Fábio Augusto de Souza Ferreira; Karina Cogo Müller; Débora Alves Nunes Leite Lima; Francisco Carlos Groppo; Hidetake Imasato; Ubirajara Pereira Rodrigues Filho; Flávio Henrique Baggio Aguiar

ABSTRACT

Cementation of orthodontic appliances causes biofilm accumulation, therefore materials containing functional groups with antimicrobial activity have been developed. **Objective:** 1) To develop an organosilane containing quaternary ammonium groups (ORMOSIL-QAMS) with antibacterial properties; 2) To evaluate physico-chemical properties of Transbond XT Light Cure Adhesive (3M Unitek) after incorporation of 10 wt% and 15 wt% of ORMOSIL-QAMS; 3) To evaluate the antimicrobial effect against *Streptococcus mutans* of ORMOSIL-QAMS used as a coating material or incorporated in the composite resin. **Methods:** The ORMOSIL-QAMS was developed by sol-gel reaction. Synthesis product was subjected to infrared spectroscopy and X-Ray fluorescence. Degree of conversion (DC); water sorption (WSp); solubility (WSI); ultimate tensile strength (UTS) and shear bond strength (SBS) tests were done after 24 h storage. For antimicrobial test, *S. mutans* UA159 were grown on composite resin samples for 24 h at 5% CO₂. Physico-chemical data were subjected to ANOVA and Tukey's tests ($\alpha=0.05$). Antibacterial data were subjected to non-parametric Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls test ($\alpha = 0.05$). **Results:** The DC did not differ between groups ($p>0.05$). WSp, WSI, UTS and SBS values decreased for both ORMOSIL-QAMS concentrations ($p<0.05$). Only the group where ORMOSIL-QAMS was applied as a coating material resulted in less *S mutans* biofilm formation in 24 h ($p<0.05$). **Conclusion:** Incorporating ORMOSIL-QAMS to a composite resin for bracket cementation adversely affected shear bond strength and ultimate tensile strength. ORMOSIL-QAMS presented greater antimicrobial activity only when applied

as a coating on the sample surface, diminishing *S. mutans* biofilm formation considerably.

1 INTRODUCTION

The goal of dental treatment is to provide complete and integrated therapy for patients' oral health; as a result, orthodontic appliances have become common in clinical practice. The orthodontic approach has been indispensable in restoring health, function and esthetics. Many of the orthodontic treatment options include brackets and other metallic devices bonded on the buccal and/or palatal surfaces of teeth, combined with elastic ligatures and arc wires. Nevertheless, these appliances hinder hygiene and lead to biofilm accumulation, which can lead to both dental caries and periodontal disease [1,2]. The prevention of dental caries requires patient commitment and effort to properly cleanse devices while conforming to a less cariogenic diet [3]. Therefore, it would be interesting to develop dental materials with bactericidal/bacteriostatic properties to aid in the prevention of dental caries.

Quaternary ammonium compounds (QAMS) have been widely used as disinfectants in different areas, such as food production and medical appliances, to prevent bacterial contamination [4]. Due to its low cytotoxicity, Dimethyloctadecyl[3-(trimethoxysilyl)propyl] ammonium chloride, a SiQAC, has been used in dental composites to promote an antimicrobial activity [5]. Previously, the incorporation of a new methacrylate macro monomer containing SiQAC in acrylic resin for orthodontic appliance (QAMS) exhibited bactericidal effect against *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naselundii*, and diminished *Candida albicans* adhesion [6].

Therefore, these materials provided a promising alternative for the development of resin based materials with antimicrobial properties. Thus, the present study aimed to test the following hypothesis: 1) ORMOSIL-QAMS incorporated in the composite resin in 10 %wt and 15 %wt or used as a coating material promotes antimicrobial activity against *S. mutans* biofilm; 2) ORMOSIL-QAMS does not modify Transbond XT Light Cure Adhesive physico-chemical properties (degree of conversion, water sorption, solubility, ultimate tensile strength and bond strength).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Synthesis of ORMOSIL-QAMS:

The synthesis of this material followed 2 steps: 1) Synthesis of QAMS and, 2) development of the ORMOSIL network using hydrolysis and condensation.

Step 1: A round-bottomed 50 mL flask was protected from light and put in a silicone oil bath. Then, 25 mL of N,N-Dimethylformamide (DMF, Sigma-Aldrich, 99.8%, CAS: 68-12-2) was added as a solvent; followed by the addition of 1158 μL (3-Iodopropyl)trimethoxysilane (IPTMS, Sigma-Aldrich, $\geq 95\%$, CAS: 14867) and 1753 μL N,N-Dimethyldodecylamine (DMDA, Sigma-Aldrich, 97%, CAS: 112-18-5). A condenser was attached to the flask and the solution was put under stirring and heated to 110 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h under reflux. All compounds were used as acquired, without previous treatment. A representation of the synthesis of QAMS is presented in Figure 1.

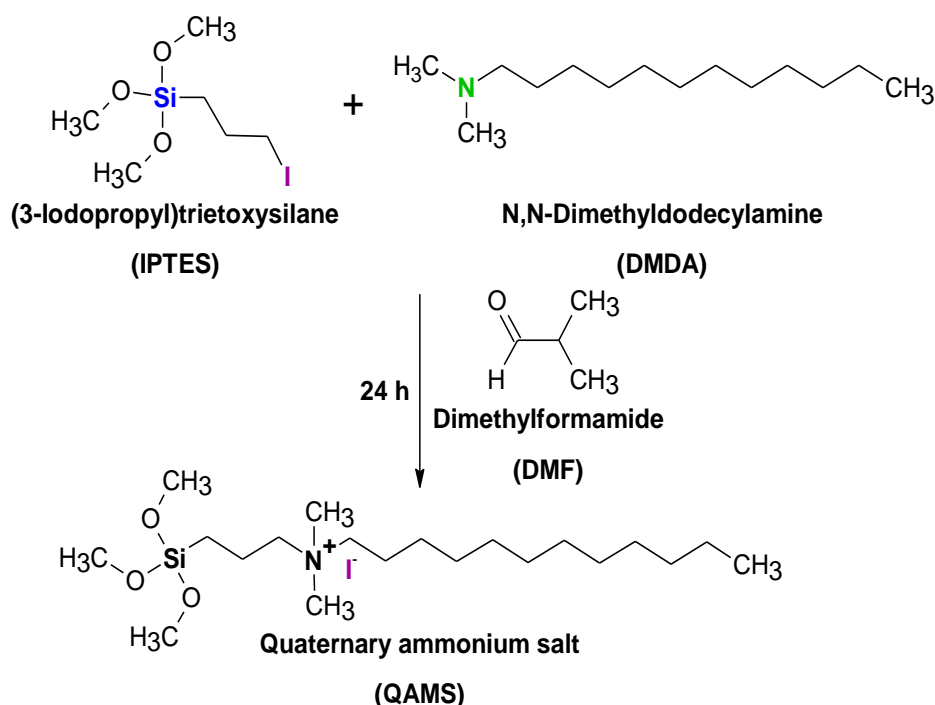


Figure 1. Schematic representation of synthesis QAMS.

Step 2: After 24 h, still under stirring, the heat was turned off, the temperature decreased to 25 $^{\circ}\text{C}$ and the condensation system removed. Then, 646 μL Tetraethyl orthosilicate (TEOS, Sigma-Aldrich, 98%, CAS: 78-10-4) was added. After 5 min, 714 μL 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate (TMSPM, Sigma-Aldrich, 98%, CAS: 2530-85-0) was added. Fifteen minutes later, 700 μL hydrochloric acid 0.3M was added to form the ORMOSIL network. The reaction proceeded for 1 hour and then the stirring was turned off. A schematic representation of the hydrolysis and condensation of the

components is presented in Figure 2. The solution containing the ORMOSIL-QAMS, which was yellow in color, was put in a Teflon® mold and taken to a pre-heated furnace at 80 °C for solvent evaporation. The solution remained in the furnace for 48 h.

After solvent evaporation, the product was depurated in ethanol for 24 h in Soxhlet extractor.

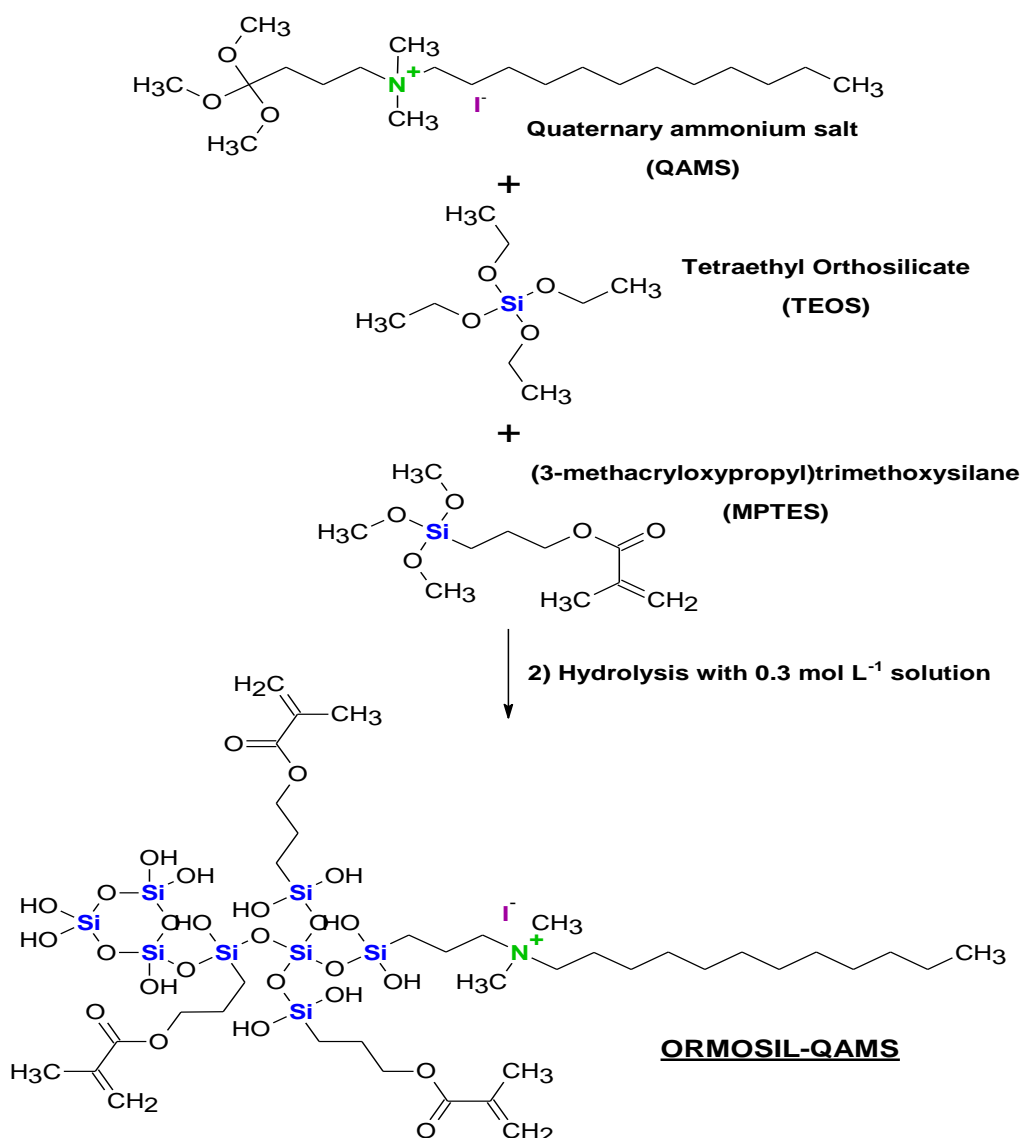


Figure 2. Schematic representation of TEOS, MP TES and QAMS hydrolysis, resulting in the formation of ORMOSIL-QAMS molecule.

2.2 Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fourier Transform Infrared in Transmission mode (T-FTIR) was performed using an IRA-affinity-1 spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) in the range of

4000-650 cm^{-1} with a spectral resolution of 4 cm^{-1} to confirm silicate network formation and the presence of the quaternary ammonium groups.

2.3 X-Ray Fluorescence (XRF)

The XRF measurements were performed in the Minipal 4.0 EDXRF spectrometer (Panalytical, Almelo, Netherlands) in a Helium atmosphere at 25°C, with an analysis time of 840 s. The spectra were analyzed using the Omniam software and were carried out to detect mainly Silicon (Si, $K\alpha=1.740$ keV) and Iodine (I, $L\alpha=3.938$ keV).

2.4 ORMOSIL-QAMS incorporation in the Transbond XT light cure

orthodontic adhesive :

Plain ORMOSIL-QAMS is a viscous gel; in order to promote its mixture into the composite resin, it was solubilized in 2 mL of ethanol.

The physical and chemical properties were tested for groups: T - Transbond XT composite resin; T10% - Transbond XT containing 10 wt% of ORMOSIL-QAMS and T15% - Transbond XT containing 15 wt% of ORMOSIL-QAMS.

Using the Speed Mixer™ Laboratory Mixer System (Synergy Devices Limited, High Wycombe, United Kingdom), 735.7 μl ORMOSIL QAMS was mixed with 11g Transbond XT composite resin (3M Unitek, Monrovia, CO, USA) to produce group T10%. To produce group T15%, 1103.6 μl ORMOSIL QAMS was mixed with 11 g Transbond XT.

2.5 Degree of Conversion (DC)

The degree of conversion of the resin was evaluated for the three groups ($n = 7$) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR Spectrometer, Perkin Elmer, Waltham, MA) equipped with an attenuated total reflectance crystal (ATR) (Universal ATR Sampling Accessory, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), operating with a resolution of 4 cm^{-1} in the range of 1665 cm^{-1} to 1580 cm^{-1} . The initial measurement was performed using non-polymerized resin. Subsequent measuring was performed with the experimental groups light cured using a Valo LED (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA), on standard mode, with an irradiance of 1000 mW/cm^2 for 20 s directly on ATR crystal. For each specimen 16 scans were obtained.

The degree of conversion was calculated based on the aliphatic carbon bond and aromatic carbon bond ratio, representing the non-polymerized and polymerized states, respectively.

2.6 Water Sorption (WSp) and Solubility (WSI)

Samples were prepared in a circular teflon matrix with a 5 mm diameter and 1 mm thickness. A polyester strip was placed under the teflon mold and resin inserted in a single increment. Another polyester strip and a glass slide were placed above the filled matrix and finger pressure was exerted for 10 s in order to remove excess material and to leave a flat surface. Then, the glass slide was removed and the composite was light cured for 20 s using a third generation Valo LED on Standard mode.

After 24 h, the specimens were stored in a desiccator containing silica gel, at 37 °C. Discs were weighed daily on an analytical balance (Tel Marke; Bell Quimis, São Paulo, SP, Brazil) with 0.1 mg accuracy. Weighting was repeated until a constant weight - m1- was obtained (weight loss no greater than 0.001 g/24 h). Sample thickness was measured at four different regions and the diameter was measured at two locations using a digital caliper (Mitutoyo, Suzano, SP, Brazil). The average diameter and thickness were used to calculate the volume ($v = \pi r^2 \times \text{thickness}$).

Then, samples were individually stored in 2 mL of distilled water at 37° C for seven days. After this period, samples were rinsed, carefully dried with absorbent paper and weighed to obtain m2. Subsequently, these specimens returned to the dryer and the complete mass drying cycle was repeated until a constant weight was achieved- m3.

Water sorption and solubility values were recorded in g/mm³ and calculated using the following equations: $W_{sp} = (m2 - m3)/v$ and $W_{sl} = (m1 - m3)/v$.

2.7 Ultimate Tensile Strength (UTS)

For each experimental group, 7 hourglass shape specimens (10 mm length x 1 mm wide x 1 mm thick) with 0,5 mm of constriction were made using a silicone matrix (Express XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). A polyester strip and a glass plate were placed on top of the matrix and finger pressure was applied for 10 s. The specimens were then light cured for 20 s using a Valo LED at Standard mode. Twenty four hours after specimen preparation, they were fixed to a metallic device using cyanoacrylate glue (Super Bonder, Loctite Henkel Corporation, Rocky Hill, CT, USA) and then taken

to the universal testing machine, Instron (model 4411, Corner, MA, USA) to test the cohesive strength at a 0.5 mm/min speed.

The cohesive strength was calculated using the formula: $RC = F/A$, where F is the tensile force (in Newtons - N) and A the area of cross section of the sample (mm^2). Values were expressed in Mega Pascal (MPa).

2.8 Shear Bond Strength (SBS)

Thirty bovine incisors (n=10) were extracted and stored in an aqueous solution of 0.1% buffered thymol (Dinâmica, Piracicaba, SP, Brasil). Remaining tissues were removed using Duflex periodontal curettes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and the teeth were polished using rubber cups (KG Sorensen Ind. Com Ltda, Barueri, SP, Brazil) and pumice paste. After cleaning, the teeth were stored in distilled water at 37 °C until use.

A doubled-faced diamond disc (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) was used to separate the crown from the root under constant irrigation in a low speed hand piece. Cuts were made with a diamond disc 4 "× 012 × 1/2 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) in mesio-distal and cervico-incisal directions in a metallographic cutting machine, Isomet 1000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to obtain 25 mm^2 blocks (5 mm x 5 mm) with an enamel surface. Each fragment was included in polystyrene resin and ground flatted using sandpaper (#600 and #1200) under constant irrigation in a polishing machine (AropolE Arotec, Cotia, SP, Brazil). Afterwards, the samples were cleaned in an ultrasonic bath (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) for 10 minutes to remove debris.

Incisor Edgewise Standard metallic brackets (Morelli, Sorocaba, SP, Brazil) were cemented on the specimens in accordance with the Transbond XT Light Cure manufacturer's instructions.

For the bonding procedures, each specimen was etched using 35% phosphoric acid (Ultra EtchTM – Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) for 30 s. Each surface was abundantly rinsed in running water and gently dried with air jets. The Transbond XT Primer was applied and light cured for 20 s. Subsequently, a small amount of composite was applied directly to the base of the bracket. The bracket was then positioned on the block surface and gently pressed to remove excess material.

Light activation was performed on mesial and distal sides of the bracket for 10 s with a Valo LED at Standard mode.

Specimens were stored in distilled water for 24 hours at 37°C before shear bond testing. The brackets were removed using a chisel connected to an Instron universal testing machine with a 5 kg load cell at a crosshead speed of 0.5 mm/min.

After bracket debonding, dental blocks were analyzed on a stereoscopic magnifying glass (MZ75, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland), using a 15 x magnification for fracture pattern determination. Fracture patterns were classified as follows: ACE – adhesive failure between the composite resin and the enamel; Mixed - adhesive failure between the composite resin and the enamel associated with cohesive failure of the composite resin; ACB – adhesive failure between the composite resin and the bracket.

2.9 *Streptococcus mutans* biofilm formation assay:

The antimicrobial property was tested using the same experimental groups of physical and chemical properties with the addition of one group: Group TC - Transbond XT composite resin with two layers of plain ORMOSIL-QAMS applied on the surface of the composite resin.

Specimens were prepared in a circular teflon matrix with a 5 mm diameter and 2 mm thickness. A polyester strip was placed under the teflon mold and resin inserted in a single increment. Another polyester strip and a glass slide were placed above the filled matrix and finger pressure was exerted for 10 s to remove excess material and leave a flat surface. Then, the glass slide was removed and the composite was light cured using a Valo LED, on Standard mode for 20 s. Samples of the TC group were covered with 2 layers of ORMOSIL-QAMS (with 5 minutes interval between each layer) applied with disposable applicators (Microbrush, Grafton, WI, USA). After 24 h, all samples were sterilized using γ radiation.

Biofilms of *S. mutans* UA 159 were formed on composite resin discs [6–9]. Bacteria were kept in a freezer at – 80 °C in Brain Heart Infusion (BHI, Difco Co., Detroit, MI, USA) containing 20% glycerol solution (v/v) until use.

The bacteria inoculum was prepared from an overnight culture using BHI broth supplemented with 1% sucrose and adjusted to an optical density of 0.7 (wavelength of

660 nm $\approx 1 \times 10^9$ CFU/mL). From this inoculum, 4×10^6 CFU/mL were transferred to each well of a 24 polystyrene culture plate that contained 3 mL of BHI and 1% sucrose. Samples were placed in a vertical position into each well and were incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂.

After this period, specimens were removed from the plates and washed five times in 3 mL sterile saline. Each specimen was transferred to a tube containing 5 mL of sterile saline and the biofilm was detached by 1 minute of vortex mixing and sonication (Vibra Cell 400w, Sonics & Materials Inc, Newtown, CT, USA) with 5% amplitude and 6 pulses (9.9 s each and 5 s interval). Then, dilutions were made and 10 μ L of each dilution were plated on brain heart infusion agar and incubated for 48 hours. After incubation, the number of colony-forming units per milliliter of suspension (CFU/mL) was determined. Only plates containing at least 20 colonies and a maximum of 300 colonies were considered for counting. The counting was made to the naked eye, without any special equipment.

2.10 Statistical Analysis

The CFU/mL was subjected to non-parametric Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls tests ($\alpha = 0.05$).

Degree of conversion, ultimate tensile strength and shear bond strength were subjected to one-way ANOVA and Tukey's post hoc test ($\alpha = 0.05$).

3 RESULTS

3.1 Infrared Spectroscopy (FTIR)

Peaks at 1000-1200 cm^{-1} region (Figure 3) are assigned to the siloxane bonds (Si-O-Si), around 880 cm^{-1} , due to the silanol groups (Si-OH), and in the region above 3000 cm^{-1} related to the O-H bonds also from silanol groups [10,11], indicating the formation of an ORMOSIL network. Regarding the aliphatic chain and quaternary ammonium groups, their characteristic bands were observed in the range of 3000-2800 cm^{-1} related to C-H, and at 1640 cm^{-1} and at 1470 cm^{-1} , assigned to the quaternary ammonium groups $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{C}_{12}\text{H}_{25})$ [10,12,13]. The last two bands are also attributed to -OH of the aliphatic chains (-CH₂-) [11].

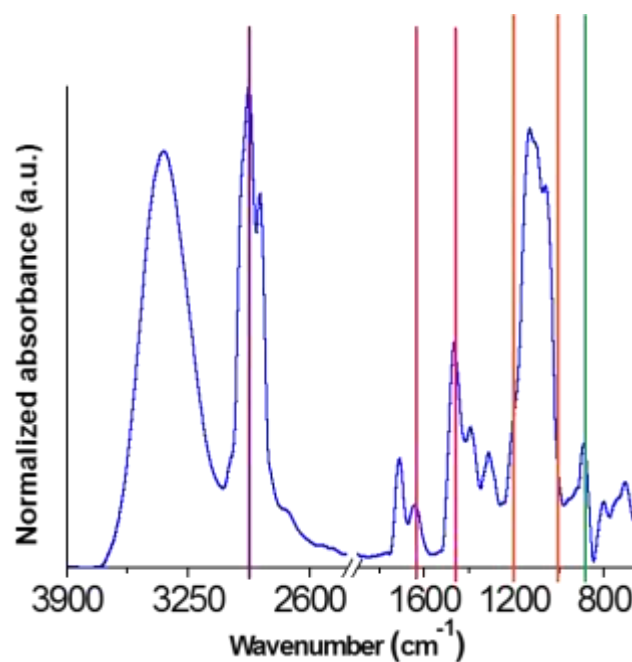


Figure 3. FTIR analysis of the synthesized materials.

3.2 X-Ray Fluorescence (XRF)

The identification of silicon and iodine in the analysis (Figure 4) revealed the successful synthesis of ORMOSIL-QAMS. The Si represents the ORMOSIL network developed and the iodine, in the form of iodide (I^-), is the counterion of the quaternary ammonium group, maintaining the electric neutrality of the system.

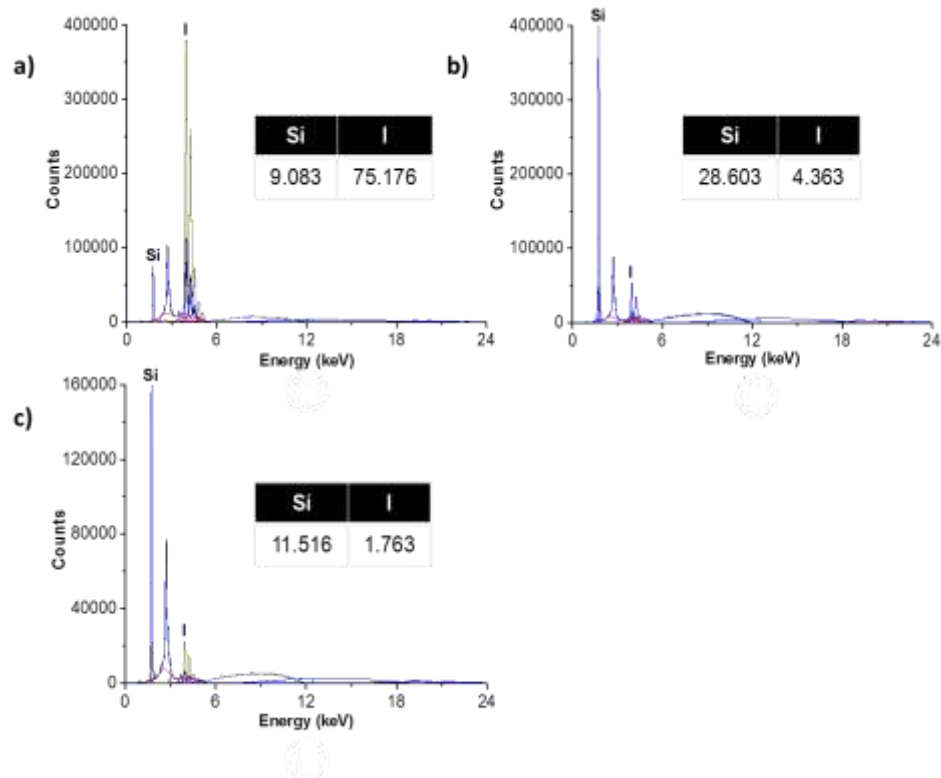


Figure 4. XRF analysis of the materials: a) ORMOSIL-QAMS before incorporation in resin, b) ORMOSIL-QAMS 15 wt% incorporated in resin, c) ORMOSIL-QAMS in polymerized resin.

3.3 Physical and chemical properties

Table 1 presents the means and standard deviations of the physical and chemical properties. It can be observed that the incorporation of ORMOSIL-QAMS does not affect the degree of conversion of the resin for any weight percentage tested ($p > 0.05$). However, its incorporation led to loss of mechanical stability of the composite resin. Greater amounts of ORMOSIL-QAMS in the resin led to lower ultimate tensile strength values. The SBS of the composite resin containing 10 wt% did not differ from the Transbond XT ($p > 0.05$), but decreased significantly when incorporating 15 wt% ($p < 0.05$). For water sorption and solubility, as the amount of ORMOSIL-QAMS incorporated increased, water sorption and solubility decreased ($p < 0.05$). Fracture pattern assessment showed that in T group 80% of the failures were classified as ACE and 20% were ACB. In group T10%, 60% were ACE failures; 30% were Mixed and 10% were ACB. In group T15%, 50% were ACE failures; 40% were Mixed and 10% were ACB.

Table 1. Means values and Standard Deviations of Ultimate Tensile Strength, Shear Bond Strength, Degree of Conversion, Water Sorption and Solubility.

Groups	UTS (Mpa)	SBS (MPa)	DC (%)	WSp (g/mm ³)	WSI (g/mm ³)
T	5.39 (1.53) a	6.08 (2.01) a	42.88 (1.02) a	0.0429 (0.0008) a	0.0427 (0.0007) a
T10%	3.80 (0.88) b	4.75 (2.23) a	43.50 (1.36) a	0.0397 (0.0008) b	0.0394 (0.0008) b
T15%	1.12 (0.45) c	2.12 (0.7) b	43.73 (1.71) a	0.038 (0.0004) c	0.0377 (0.0003) c

Different letters are statistically different (in columns) ($p < 0.05$). T - Transbond XT ; T10 % - Transbond XT containing 10 %wt of ORMOSIL-QAMS; T15 % - Transbond XT containing 15 %wt of ORMOSIL-QAMS; UTS - Cohesive resistance ; SBS - Shear Strength ; DC – Degree of Conversion; WSp – Water Sorption; WSI – Solubility.

3.4 *Streptococcus mutans* biofilm formation assay

Figure 5 shows the amount of biofilm formation on the composite resin discs. There were significant statistical differences ($p < 0.05$) between the T and TC groups. Group TC showed less biofilm formation when compared to T, T10% and T15% ($p < 0.05$).

No differences were found among the T, T10% and T15% groups.

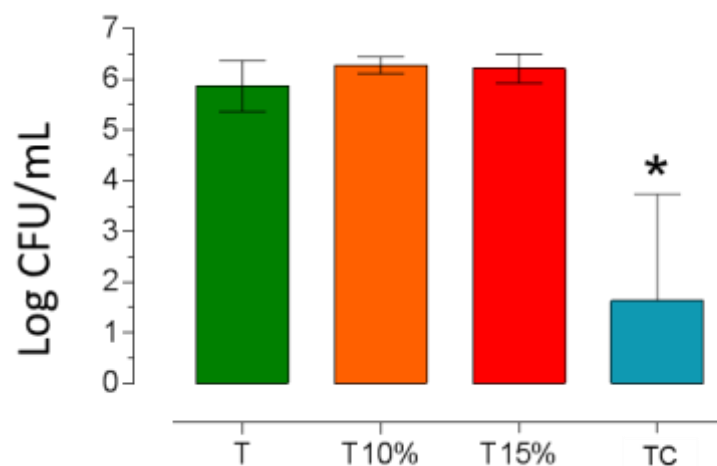


Figure 5. Means and Standard deviation of Log CFU/mL of groups T, T10%, T15% and TC. *Statistical difference in comparison to the other groups.

4 DISCUSSION

Since orthodontic treatment involves brackets, bands, archwires and metallic or elastomeric ligature ties; it leads to greater difficulty in cleaning, resulting in large amounts of biofilm accumulation [14]. To avoid bacterial colonization and proliferation, researchers have been working on the development of materials with antimicrobial properties for food [15] and biomedical applications [16]. Changes in the material composition aim to modify surfaces making them harder for bacteria to settle, to adhere and to colonize [15].

This study developed an organosilane modified by a quaternary ammonium group that was incorporated into a commercially available composite resin for bracket cementation in different mass concentrations (10% and 15%). Although UTS and SBS decreased with the incorporation of ORMOSIL-QAMS, preventing its use in the composite resin, an antimicrobial activity was found when ORMOSIL-QAMS was used as a coating on the surface of the composite resin.

Under the experimental circumstances, the addition of ORMOSIL-QAMS in any concentration adversely affected the UTS. The acrylate group is supposed to be the linking agent between ORMOSIL-QAMS and methacrylate from Transbond XT Light Cure composite resin. Since this acrylate group was observed in ORMOSIL-QAMS (confirmed by FTIR spectra), it could be inferred that ORMOSIL-QAMS molecules reacted together instead of reacting with the resinous material molecules. Therefore, the chemical link between the composite resin and the ORMOSIL-QAMS might not have occurred. Fracture pattern assessment showed that mixed failures increased as the amount of ORMOSIL-QAMS raised. This finding also corroborates for the assumption of lack of chemical link between ORMOSIL-QAMS and the composite resin.

As for SBS, the ORMOSIL QAMS concentration of 10 wt% did not differ from the Transbond XT group. When the concentration was elevated to 15 wt%, a considerable decline in bond strength, combined with an increase in cohesive failures was observed (Table 1). This can also be explained by the lack of chemical bonding between the ORMOSIL-QAMS and the Transbond XT composite resin.

In the polymeric composites, an external load is transferred all over the material, since inorganic fillers and organic matrix are chemically bonded, performing like a

unique body. Despite the apparent miscibility between the composite resin and the ORMOSIL-QAMS, these two compounds present poor interfacial adhesion because of inadequate chemical interaction. This interface between the ORMOSIL-QAMS and composite resin is a stress concentration zone. Therefore, greater shear stresses lead to greater forces at the ORMOSIL-QAMS/matrix interface [17,18] until cohesive failure occurs.

The DC did not vary when ORMOSIL-QAMS was added. Since there was no chemical interaction between ORMOSIL-QAMS molecules and the composite resin matrix, the composite resin monomers completed the polymerization process and in some points of the resin matrix the ORMOSIL-QAMS molecules were trapped, without interfering with the degree of conversion [19].

ORMOSIL-QAMS is a hydrophobic compound due to its 12 carbon alkyl chain. Consequently, water sorption decreased as the percentage of ORMOSIL-QAMS increased. Since the water intake diminished with the addition of ORMOSIL-QAMS, it is expected that the solubility of the composite would decrease in the same manner [16].

The quaternary ammonium antimicrobial effect has been attributed to ionic and lipophilic interactions between the molecule and the bacterial membrane. Quaternary ammonium groups carry a positive charge, which can react with the negative charge of a gram-positive cell membrane, causing its rupture [20]. Also, it has been reported that long alkyl chains could form pores and enable the long chain to penetrate into the cell, causing lysis and cell death [21]. In 2013, a previous study [22] associated the quaternary ammonium chain length to the bactericidal effect, showing a large decrease of CFU on samples containing quaternary ammonium with a 12 carbon chain length. The present study demonstrated that the pure composite resin groups and those containing ORMOSIL-QAMS showed similar results. This can be attributed to the lack of available ORMOSIL-QAMS on the surface of the photo cured composite resin. ORMOSIL-QAMS is a large molecule; therefore, molecule movement to the surface is difficult. That is why quaternary ammonium groups incorporated into the composite resin were not available on the surface and did not present an antimicrobial activity. When applied as a coating material, ORMOSIL-QAMS remained on the surface of the sample, increasing the availability of the quaternary ammonium groups to reach the

bacteria cells, causing apoptosis as previous described. Thus, indicating a future perspective of application of this product as a varnish or a surface sealant.

The development of dental materials with antimicrobial activity is important to support biofilm control during orthodontic treatment. However, to be clinical relevant, it is essential that this effect is maintained in the adverse conditions of the oral environment, displaying antibacterial activity over time. Therefore, even though ORMOSIL-QAMS demonstrated antimicrobial activity when applied on the surface of the composite resin, future studies are necessary to assess the endurance of the ORMOSIL-QAMS coating against tooth brushing and saliva.

5 CONCLUSION

The synthesis of ORMOSIL-QAMS hybrid material was successfully conducted.

ORMOSIL-QAMS was found to have antibacterial activity against *Streptococcus mutans* biofilm formation only as a surface coating material. Nevertheless, the incorporation of ORMOSIL-QAMS led to a deleterious effect in some of the composite resin mechanical properties.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support from FAPESP (#2013/15518-5) and the Inorganic Hybrid Materials Chemistry Group (GQMATHI-IQSC/USP) for all support provided.

REFERENCES

- [1] Gorelick L, Geiger A, Gwinnett A. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod* 1982;81:93–8.
- [2] Lodaya SD, Keluskar KM, Naik V. Evaluation of demineralization adjacent to orthodontic bracket and bond strength using fluoride-releasing and conventional bonding agents. *Indian J Dent Res* 2011;22:44–9. doi:10.4103/0970-9290.79974.
- [3] Bahoum A, Bahije L, Zaoui F. Les déminéralisations amélares en orthodontie. *Rev Mens Suisse Odontostomatol* 2012;122:937–42.
- [4] Nagamune H, Maeda T, Ohkura K, Yamamoto K, Nakajima M. Evaluation of the Cytotoxic Effects of Bis-quaternary Ammonium Antimicrobial Reagents on Human Cells. *Toxicol Vitr* 2000;14:139–47.
- [5] Gong S, Niu L-N, Kemp LK, Yiu CKY, Ryou H, Qi Y-P, et al. Quaternary ammonium silane-functionalized, methacrylate resin composition with antimicrobial activities and self-repair potential. *Acta Biomater* 2012;8:3270–82. doi:10.1016/j.actbio.2012.05.031.
- [6] Gong S, Epasinghe J, Rueggeberg FA, Niu L, Mettenberg D, Yiu CKY, et al. An ORMOSIL-containing orthodontic acrylic resin with concomitant improvements in antimicrobial and fracture toughness properties. *PLoS One* 2012;7:e42355. doi:10.1371/journal.pone.0042355.
- [7] Cogo K, Montan MF, Bergamaschi C de C, D Andrade E, Rosalen PL, Groppo FC. In vitro evaluation of the effect of nicotine, cotinine, and caffeine on oral microorganisms. *Can J Microbiol* 2008;54:501–8. doi:10.1139/w08-032.
- [8] Raja AF, Ali F, Khan I a, Shawl AS, Arora DS, Shah B a, et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*. *BMC Microbiol* 2011;11:54. doi:10.1186/1471-2180-11-54.
- [9] Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta M. Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. *Biofouling* 2013;29:1–20. doi:10.1080/08927014.2013.834050.Effect.

- [10] Gao B, Qi C, Liu Q. Immobilization of quaternary ammonium salts on grafting particle polystyrene/SiO₂ and preliminary study of application performance. *Appl Surf Sci* 2008;254:4159–65. doi:10.1016/j.apsusc.2007.12.053.
- [11] Shah KJ, Mishra MK, Shukla AD, Imae T, Shah DO. Controlling wettability and hydrophobicity of organoclays modified with quaternary ammonium surfactants. *J Colloid Interface Sci* 2013;407:493–9. doi:10.1016/j.jcis.2013.05.050.
- [12] Pigorsch E. Spectroscopic Characterisation of Cationic Quaternary Ammonium Starches. *Starch - Stärke* 2009;61:129–38. doi:10.1002/star.200800090.
- [13] Kong Z, Wei J, Li Y, Liu N, Zhang H, Zhang Y, et al. Rapid removal of Cr(VI) ions using quaternary ammonium fibers functioned by 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate and modified with 1-bromoalkanes. *Chem Eng J* 2014;254:365–73. doi:10.1016/j.cej.2014.05.128.
- [14] Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *Angle Orthod* 2007;77:1090–5. doi:10.2319/091706-375.1.
- [15] Kregiel D. Advances in biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: A review. *Food Control* 2014;40:32–40. doi:10.1016/j.foodcont.2013.11.014.
- [16] Gottenbos B, van der Mei HC, Klatter F, Nieuwenhuis P, Busscher HJ. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials* 2002;23:1417–23.
- [17] Khalil M, Saeed S, Ahmad Z. Mechanical and thermal properties of polyimide/silica hybrids with imide-modified silica network structures. *J Appl Polym Sci* 2008;107:1257–68. doi:10.1002/app.27149.
- [18] Son M, Ha Y, Choi M-C, Lee T, Han D, Han S, et al. Microstructure and properties of polyamideimide/silica hybrids compatibilized with 3-aminopropyltriethoxysilane. *Eur Polym J* 2008;44:2236–43. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.04.037.
- [19] He Y, Heine E, Keusgen N, Keul H, Möller M. Synthesis and characterization of amphiphilic monodisperse compounds and poly(ethylene imine)s: influence of

- their microstructures on the antimicrobial properties. *Biomacromolecules* 2012;13:612–23. doi:10.1021/bm300033a.
- [20] Muñoz-Bonilla A, Fernández-García M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog Polym Sci* 2012;37:281–339. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005.
- [21] Palermo EF, Lee D, Ramamoorthy A, Kuroda K. Role of cationic group structure in membrane binding and disruption by amphiphilic copolymers. *J Phys Chem B* 2011;115:366–75. doi:10.1021/jp1083357.
- [22] Li F, Weir MD, Xu HHK. Effects of quaternary ammonium chain length on antibacterial bonding agents. *J Dent Res* 2013;92:932–8. doi:10.1177/0022034513502053.

3 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A síntese do ORMOSIL-QAMS foi bem sucedida, o que foi comprovado pelos métodos de caracterização.
- O ORMOSIL-QAMS apresenta efeito antimicrobiano contra a formação de biofilme 24 horas de *Streptococcus mutans*, somente quando aplicado sobre a superfície da amostra, como material de recobrimento.
- Apesar de diminuir a sorção de água e a solubilidade e não alterar o grau de conversão da resina composta Transbond XT Light Cure Adhesive, a inserção de ORMOSIL-QAMS diminuiu a resistência de união e a resistência coesiva do compósito.

4 REFERÊNCIAS*

Ali H, Maroli S. Glass ionomer cement as an orthodontic bonding agent. *J. Contemp. Dent. Pract.* [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 4];13(5):650–4. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Glass+Ionomer+Cement+as+an+Orthodontic+Bonding+Agent#0>

Bishara SE, Olsen ME, Damon P, Jakobsen JR. Evaluation of a new light-cured orthodontic bonding adhesive. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* [Internet]. 1998 Jul [cited 2015 Jul 9];114(1):80–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889540698702422>

Charles C. Bonding orthodontic brackets with glass-ionomer cement. *Biomaterials* [Internet]. 1998 Mar [cited 2015 Jul 9];19(6):589–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961297001415>

Cheng L, Weir MD, Zhang K, Xu SM, Chen Q, Zhou X, et al. Antibacterial nanocomposite with calcium phosphate and quaternary ammonium. *J. Dent. Res.* [Internet]. 2012 May [cited 2015 Jul 8];91(5):460–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3327730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Dawood HF, Abdul Rahman N, Hassan R, Al-Juboori MJ. Shear bond strength comparison of two different adhesive systems. *Dent. Implantol. Update* [Internet]. 2012 Nov [cited 2015 Aug 28];23(11):83–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23156078>

Fajen VB, Duncanson MG, Nanda RS, Currier GF, Angolkar P V. An in vitro evaluation of bond strength of three glass ionomer cements. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* [Internet]. 1990 Apr [cited 2015 Jul 9];97(4):316–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2181867>

Fleming PS, Johal A, Pandis N. Self-etch primers and conventional acid-etch technique for orthodontic bonding: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Orthod.*

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Dentofacial Orthop. [Internet]. American Association of Orthodontists; 2012 Jul [cited 2015 Jul 8];142(1):83–94. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22748994>

Julien KC, Buschang PH, Campbell PM. Prevalence of white spot lesion formation during orthodontic treatment. *Angle Orthod.* [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Sep 4];83(4):641–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23289733>

Kenawy E-R, Worley SD, Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules* [Internet]. 2007 May [cited 2015 Jul 9];8(5):1359–84. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425365>

Kirovski I, Madzarova S. Tensile bond strength of a light-cured glass ionomer cement when used for bracket bonding under different conditions: an in vitro study. *Eur. J. Orthod.* [Internet]. 2000 Dec [cited 2015 Aug 27];22(6):719–23. Available from:

<http://ejo.oxfordjournals.org/content/eortho/22/6/719.full.pdf>

Lai JH, Johnson a E, Douglas RB. Organosilicon dental composite restoratives based on 1,3-bis[(p-acryloxymethyl) phenethyl] tetramethyldisiloxane. *Dent. Mater.* [Internet]. 2004 Jul [cited 2015 Jul 8];20(6):570–8. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134945>

Lovrov S, Hertrich K, Hirschfelder U. Enamel Demineralization during Fixed Orthodontic Treatment - Incidence and Correlation to Various Oral-hygiene Parameters. *J. Orofac. Orthop.* [Internet]. 2007 Sep [cited 2015 Jun 18];68(5):353–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882363>

Miguel JA, Almeida MA, Chevitaese O. Clinical comparison between a glass ionomer cement and a composite for direct bonding of orthodontic brackets. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* [Internet]. 1995 May [cited 2015 Jul 9];107(5):484–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7733057>

Morgan TD, Wilson M. Anti-adhesive and antibacterial properties of a proprietary denture cleanser. *J. Appl. Microbiol.* [Internet]. 2000 Oct [cited 2015 Jul 9];89(4):617–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054165>

Norevall LI, Marcusson A, Persson M. A clinical evaluation of a glass ionomer cement

as an orthodontic bonding adhesive compared with an acrylic resin. *Eur. J. Orthod.* [Internet]. 1996 Aug [cited 2015 Jul 9];18(4):373–84. Available from: <http://ejo.oxfordjournals.org/content/18/4/373.short>

Oosterhof JJH, Buijssen KJDA, Busscher HJ, van der Laan BFAM, van der Mei HC. Effects of quaternary ammonium silane coatings on mixed fungal and bacterial biofilms on tracheoesophageal shunt prostheses. *Appl. Environ. Microbiol.* [Internet]. 2006 May [cited 2015 Aug 27];72(5):3673–7. Available from: <http://aem.asm.org/content/72/5/3673.short>

Sreedhara S, Savakkanavar MB, Rajesh RNG, Ankireddy RKR, Sanjay N, Girish KS. Effect of Self-etch Primer-adhesive and Conventional Adhesive Systems on the Shear Bond Strength and Bond Failure of Orthodontic Brackets: A Comparative Study. *J. Contemp. Dent. Pract.* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Sep 15];16(2):130–4. Available from: <http://europepmc.org/abstract/med/25906804>

APÊNDICE

CAPÍTULO ÚNICO

Delineamento experimental:

Unidades experimentais:

- Discos de resina Transbond XT Light Cure Adhesive
- Corpos de prova de resina Transbond XT Light Cure Adhesive em formato de ampulheta
- Blocos de esmalte com bráquetes cimentados

Fatores em estudo:

- Adição de ORMOSIL QAMS:
 - 10% em massa
 - 15% em massa
 - Aplicação sobre a superfície do corpo de prova (para Ensaio de formação de Biofilme de *Streptococcus mutans*)

Variáveis de resposta:

- Grau de Conversão (%)
- Sorção de água e Solubilidade (g/mm^3)
- Resistência Coesiva (MPa)
- Resistência de União (MPa)
- Atividade Antimicrobiana (CFU/ml)

Divisão dos grupos:

- Grupo T: Resina composta Transbond XT Light Cure Adhesive;
- Grupo T10%: Resina composta Transbond XT Light Cure Adhesive + 10% em massa de ORMOSIL-QAMS;
- Grupo T15%: Resina composta Transbond XT Light Cure Adhesive + 15% em massa de ORMOSIL-QAMS;

- Grupo TC: Resina composta Transbond XT Light Cure Adhesive recoberto por duas camadas de ORMOSIL-QAMS puro (Somente para ensaio de Formação de Biofilme).

Metodologia Detalhada:

Síntese ORMOSIL QAMS:

Quadro 1 - Reagentes utilizados, pureza e número de registro do banco de dados do “Chemical Abstract Service” (CAS) correspondentes.

Reagente	Sigla	Pureza	CAS	Fabricante
N,N-Dimetildodecilamina	DMDA	97%	112-18-5	Sigma-Aldrich
(3-Iodopropil)Trimetoxissilano	IPTMS	≥95%	14867	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethylformamida	DMF	99,8%	68-12-2	Sigma-Aldrich
Tetraetilortossilicato	TEOS	98%	78-10-4	Sigma-Aldrich
3-(Trimetóxisilil)propil metacrilato	TMSPM	98%	2530-85-0	Sigma-Aldrich

A síntese do ORMOSIL-QAMS foi realizada em uma proporção molar de 6 mmol IPTMS : 6 mmol DMDA : 3 mmol TEOS : 3 mmol TMSPM. Em uma primeira etapa, o IPTMS e DMDA foram reagidos em balão de fundo redondo em solvente DMF, por 24 horas, protegidos da luz e sob refluxo constante (Figura 1A).

Após as 24 horas em refluxo, foram adicionados TEOS, TMSPM e HCl 0,3M para hidrólise dos reagentes e a reação prosseguiu por mais 1 hora.

Ao término da primeira etapa, o solvente foi evaporado em estufa a 80 °C. Em seguida, em uma nova etapa, o composto livre de DMF foi levado a um sistema Soxhlet com etanol, por 24 horas para que as impurezas e resquícios de solvente fossem eliminados. (Figura 1B). A síntese gerou 2,99 g de produto livre de solventes.

Figura 1 - (A) Sistema de Refluxo com fluxo de água constante; (B) Sistema Soxhlet.



Caracterização

As análises para caracterização do ORMOSIL-QAMS foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP).

Espectroscopia por infravermelho (FTIR)

A espectroscopia por infravermelho foi realizada no modo de absorbância em espectrofotômetro IRA-affinity-1 (Shimadzu, Tokyo, Japan) no intervalo de 4000-650 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} com objetivo de detectar a formação da rede silicato e dos grupamentos de amônia quaternária. Uma leitura de “branco” (referência do substrato) foi feita apenas com pastilhas de silício no porta-amostra. Para as leituras subsequentes, o ORMOSIL-QAMS diluído em etanol foi gotejado sobre uma pastilha de silício e após a evaporação do solvente a segunda pastilha é colocada sobre a fina camada de ORMOSIL-QAMS. O conjunto então foi levado ao porta-amostra e novas leituras foram realizadas.

Fluorescência de Raios-X

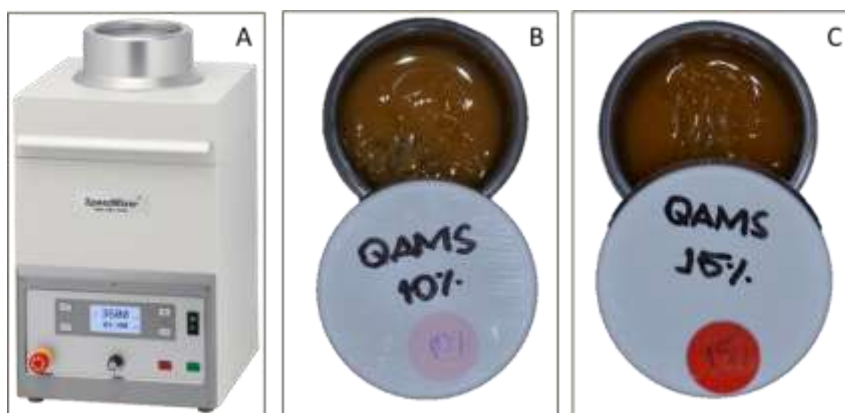
As medidas de fluorescência de Raios-X foram efetuadas em espectrômetro Minipal 4.0 EDXRF (Panalytical, Almelo, Netherlands) a 25 °C em atmosfera de hélio. O tempo de análise foi de 840 s. Os espectros obtidos foram analisados pelo *software*. Esta

metodologia visou identificar a presença dos elementos: Silício (Si, $K\alpha=1.740$ keV) e Iodo (I, $L\alpha=3.938$ keV).

Mistura Transbond XT Light Cure Adhesive + ORMOSIL QAMS :

Para facilitar a mistura com o cimento resinoso Transbond XT Light Cure Adhesive (3M Unitek, Monrovia, CO, USA) o ORMOSIL-QAMS foi inserido diluído em 2 mL de etanol. A mistura foi feita em misturador mecânico Speed Mixer (Synergy Devices Limited, High Wycombe, United Kingdom) (Figura 2A). Para adição de 10% em massa de ORMOSIL-QAMS (Figura 2B), foram utilizados 3 ciclos de 40 s a uma velocidade de 2000 rotações por minuto (rpm). Para adição de 15% em massa (Figura 2C), foram utilizados 5 ciclos de 40 s a uma velocidade de 2000 rpm. As temperaturas foram mensuradas com termômetro digital infravermelho (Scan Temp St-600, Incoterm, Porto Alegre, RS, Brasil) ao final de cada ciclo.

Figura 2 - (A) Speed Mixer utilizado para mistura da resina Transbond XT Light Cure Adhesive e ORMOSIL-QAMS; (B) Resina acrescida de 10% em massa de ORMOSIL-QAMS; (C) Resina acrescida de 15% em massa de ORMOSIL-QAMS.



Grau de Conversão:

O grau de conversão (GC) da resina foi avaliado ($n=7$) por meio da espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (Espectrômetro FTIR, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), equipado com cristal de reflectância total atenuada (ATR) (Universal ATR Sampling Accessory, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). A leitura inicial foi efetuada com a resina não fotoativada, sobre o cristal. Após esta leitura, a resina foi fotoativada por 20 s ainda sobre o cristal com um aparelho LED Valo (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) no modo Standard (irradiância de

1000 mW/cm²) e uma nova leitura foi feita para ser comparada à inicial. Os espectros foram obtidos com auxílio do programa Spectrum (Perkin Elmer) em computador ligado ao espectrômetro. O programa foi utilizado no modo de monitoramento da varredura, com resolução de 4 cm⁻¹ e os espectros sendo coletados no intervalo de 1665 cm⁻¹ a 1580 cm⁻¹ com 16 varreduras.

Para realização do cálculo foi utilizada a técnica de *baseline* (Rueggeberg et al. 1990), traçado pelo *software* Spectrum. A intensidade corrigida dos picos observados nos comprimentos de onda 1638 cm⁻¹ e 1608 cm⁻¹ foi utilizada na seguinte fórmula (Atai & Watts, 2006):

R = intensidade em 1638cm⁻¹/intensidade em 1608cm⁻¹, sendo o grau de conversão (%) calculado da seguinte forma:

$$GC (\%) = \left[100 - \frac{\left(\frac{1638\text{cm}^{-1}}{1608\text{cm}^{-1}} \text{ polimerizado} \right)}{\left(\frac{1638\text{cm}^{-1}}{1608\text{cm}^{-1}} \text{ não polimerizado} \right)} \right] \times 100$$

Sorção e Solubilidade

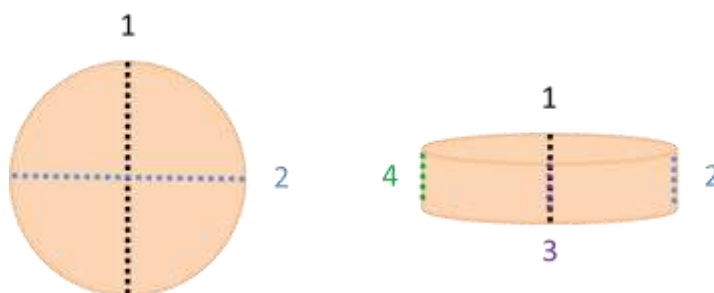
Os corpos-de-prova para o teste de sorção e solubilidade (n=9) foram confeccionados utilizando-se matrizes de teflon com 1 mm de espessura e 5 mm de diâmetro. Estas foram colocadas sobre uma tira de poliéster posicionada sobre uma placa de vidro (Figura 3A). Esta matriz foi preenchida com a resina correspondente a cada grupo em um único incremento (n=9) (Figura 3B) e uma segunda tira de poliéster foi posicionada sobre a matriz. Sobre a segunda tira de poliéster, foi colocada uma lâmina de vidro e pressão digital foi exercida por 10 s com a finalidade de remover o excesso de material e deixar a superfície do corpo-de-prova plana (Figura 3C). A lâmina de vidro foi removida mantendo-se em posição a tira de poliéster e a fotoativação (Figura 3D) foi realizada com o aparelho fotoativador Valo no modo Standard por 20 s.

Figura 3 - (A) Matriz de teflon sobre uma tira de poliéster; (B) Inserção do compósito em incremento único; (C) Matriz preenchida, tira de poliéster e lâmina de vidro sob pressão digital; (D) Fotopolimerização.



Após 24 h da confecção dos corpos-de-prova, os mesmos foram armazenados em *ependorfs* e alocados em dissecador contendo sílica gel, a 37 °C e mantidos em sala com temperatura e umidade controladas. Os discos foram pesados diariamente em balança analítica (Shimadzu AUW220D, Kyoto, Japão) de precisão de 0,01 mg, constituindo um ciclo de pesagem a cada 24 h. O ciclo completo foi repetido até a obtenção da massa constante - m1- quando a perda de massa para cada amostra não foi maior que 0,001 g por cada ciclo de 24 h. A espessura da amostra foi mensurada em quatro regiões distintas e o diâmetro em outras duas (Figura 4) usando um paquímetro digital (Mítutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil) e estes valores foram utilizados para o cálculo do volume (v).

Figura 4 - Diâmetro medido em duas regiões distintas e espessura medida em outras quatro.



Em seguida, as amostras foram armazenadas individualmente em 2 mL de água destilada a 37°C por sete dias. Passado este período as amostras foram lavadas em água corrente, cuidadosamente secas e pesadas novamente - m2. Após obtenção de m2 os espécimes retornaram para o primeiro dissecador e o completo ciclo de estabilização da massa foi repetido até uma terceira constante de massa - m3.

Os valores para sorção e solubilidade foram registrados em g/mm^3 e calculados usando as seguintes equações: $W_{sp}=(m_2 - m_3)/v$ e $W_{sl}=(m_1-m_3)/v$, respectivamente.

Resistência Coesiva

Para cada grupo experimental, foram confeccionados 7 corpos de prova em formato de ampulheta com auxílio de matriz de silicone de adição (Express XT , 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) com dimensões padronizadas: 10 mm de comprimento x 1 mm de largura x 1 mm de espessura e 0,5 mm de constrição (Figura 5A) preenchidas com a resina correspondente a cada grupo em um único incremento (Figura 5B e C). Uma fita de poliéster e lâmina de vidro foram posicionadas e pressionadas no topo da matriz preenchida (Figura 5D) previamente ao procedimento de fotoativação (Figura 5E). Após a fotoativação por 20 s com o aparelho fotopolimerizador Valo o corpo-de-prova foi removido da matriz e fez-se o acabamento das arestas com discos Soflex (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)

Após 24 h da confecção dos espécimes, estes foram colados ao dispositivo de tração com cola de cianoacrilato (Super Bonder, Loctite, Henkel Corp., Rocky Hill, CT, USA). Após a secagem da cola, os aparatos foram levados à máquina de ensaio universal Instron (modelo 4411, Canto, MA, EUA) (Figura 6) e forças foram aplicadas em direções opostas à velocidade de 0,5 mm/min até a fratura do corpo-de-prova.

O cálculo da resistência coesiva (RC) foi realizado através da fórmula: $RC = F/A$, onde F representa a força de tração (em Newton - N) e A, a área de secção transversal da amostra, medida em mm^2 com paquímetro digital, obtendo-se valores expressos em MPa.

Figura 5 - (A) Matriz em forma de ampulheta confeccionada com silicone de adição; (B e C) Inserção do compósito com uma espátula; (D) Matriz preenchida, tira de poliéster e lâmina de vidro sob pressão digital; (E) Fotopolimerização.



Figura 6 - Máquina de Ensaio Universal Instron modelo 4411.

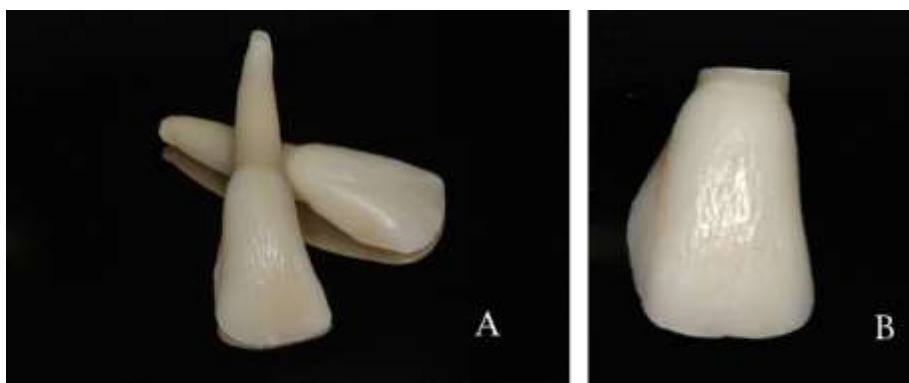


Resistência de União - Obtenção dos espécimes:

Incisivos bovinos (Figura 7A) foram extraídos e armazenados em solução aquosa de timol 0,1% (Dinâmica, Piracicaba, SP, Brasil). Em seguida, foram limpos com lâminas de bisturi e curetas periodontais e polidos com taça de borracha e pedra pomes (SS White LTDA; Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

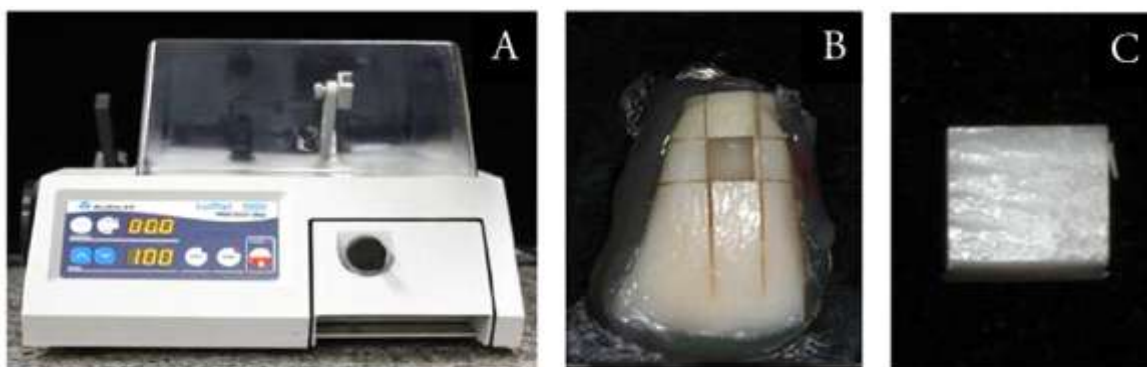
A coroa foi separada da porção radicular, com disco diamantado dupla face (KG Sorensen, Ind. Com. Ltda, Barueri, SP, Brasil) sob constante irrigação de água em micromotor de baixa rotação (Kavo do Brasil Ind. E Com. Ltda., Joinvile, SC, Brasil) (Figura 7B).

Figura 7 - Incisivos bovinos utilizados no estudo: (A) dentes selecionados limpos; (B) porção coronária utilizada.



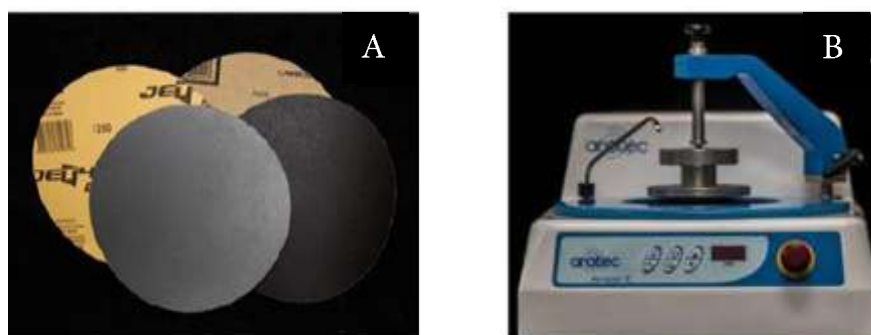
Na porção coronária foram realizados cortes nos sentidos méso-distal e inciso-cervical (Figura 8B) em uma cortadeira metalográfica (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (Figura 8A), com disco diamantado (4" × 012 × 1/2, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) para a obtenção dos fragmentos com área de superfície de 25 mm² (fragmentos de 5x5 mm aproximadamente) (Figura 8C).

Figura 8 - (A) Cortadeira Metalográfica de alta precisão; (B) cortes nos sentidos méso-distal e inciso-cervical; (C) bloco 25 mm².



Cada fragmento foi incluído em resina de poliestireno e teve a superfície de esmalte tratada com lixas de carbeto de silício (SiC), de granulação #600 e #1200 (Figura 9A) sob irrigação constante, utilizando-se uma politriz rotatória (AropolE, Arotec, Cotia, SP, Brasil) (Figura 9B) para planificar a superfície. Ao final, as amostras foram levadas à cuba de ultrassom (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), durante 15 minutos, para remoção de debris presentes na superfície do esmalte.

Figura 9 - (A) Lixas de Carbeto de Silício de granulação; (B) Politriz Giratória, utilizada para planificar e polir os blocos dentais.

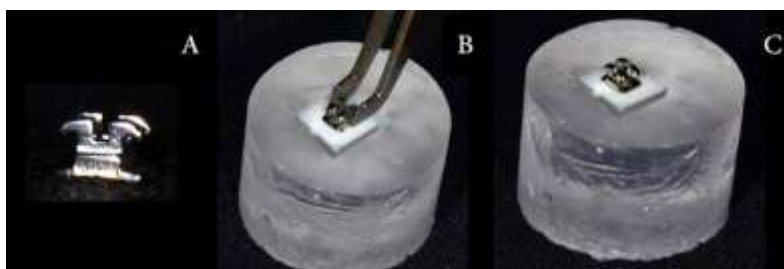


Após a limpeza, bráquetes Edgewise Standard (Figura 10A) foram colados no centro de cada bloco (Figura 10B) de acordo com as normas do fabricante do sistema adesivo Transbond XT Light Cure Adhesive.

Para o procedimento de colagem cada espécime foi seco com leves jatos de ar comprimido, por 20 s. Em seguida, aplicou-se o ácido fosfórico a 35% (Ultra Etch™ – Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA), por 30 s.

Após o condicionamento, uma fina camada do *primer* foi aplicada sobre a superfície, com aplicador próprio e fotopolimerizada por 20 s. Em seguida, uma pequena quantidade da resina composta foi aplicada diretamente à base do bráquete. O bráquete então foi posicionado no bloco e levemente pressionado para promover escoamento da resina composta. O excesso de material foi removido (Figura 10C) e fotoativação foi realizada por 10 s nos lados mesial e distal do bráquete com aparelho fotopolimerizador LED Valo no modo Standard.

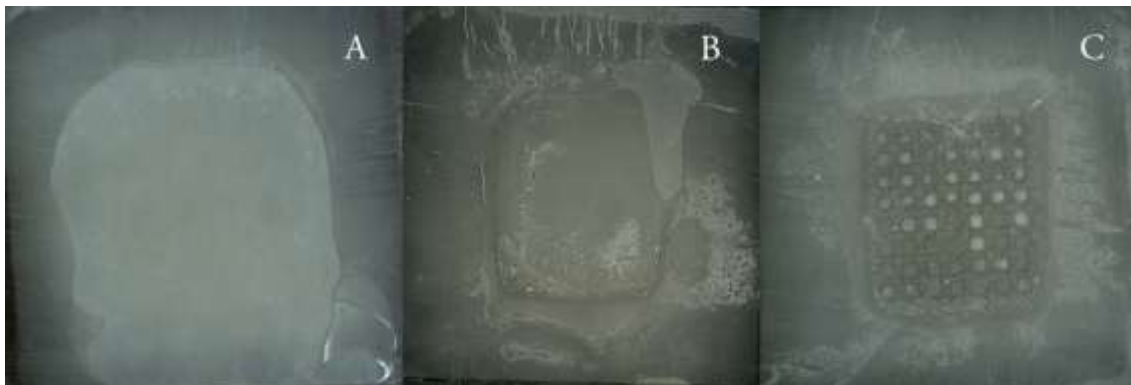
Figura 10 - (A) Bráquete Edgewise Standard para incisivo; (B) Posicionamento do bráquete no centro do bloco após a aplicação da resina composta; (C) Excessos removidos.



Após a colagem, os espécimes dos três grupos (n=10) foram armazenados em água destilada por 24 horas, a 37° C. Passadas as 24 h, os bráquetes foram removidos por ensaio de cisalhamento com um cinzel incidindo na base do bráquete, em máquina de ensaio universal Instron (modelo 4411, Canto, MA, USA), com uma célula de carga de 5 Kg, a uma velocidade de 0,5 mm/min.

O padrão de fratura foi avaliado em lupa estereoscópica MZ75 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) com magnificação de 15 x. Os padrões de fratura foram classificados como: ACE – falha adesiva entre resina composta e esmalte (Figura 11A); M – falha adesiva entre resina composta e esmalte associada à falha coesiva de resina composta (Figura 11B); ACB – falha adesiva entre resina composta e bráquete (Figura 11C).

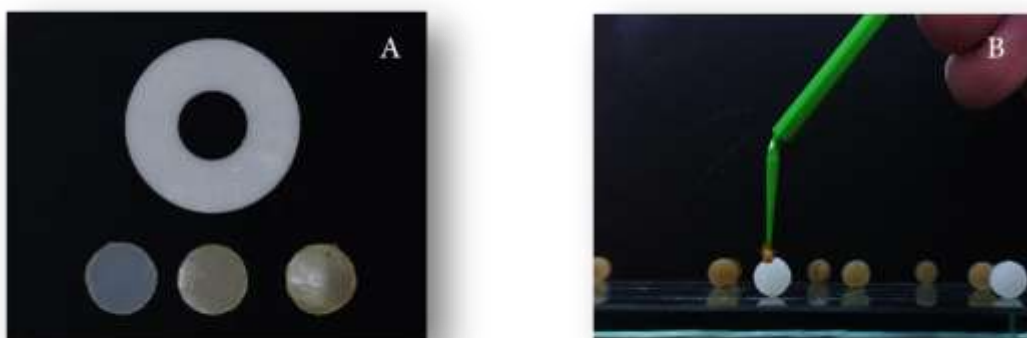
Figura 11 - (A) Falha adesiva entre resina composta e esmalte; (B) – Falha adesiva entre resina composta e esmalte associada à falha coesiva de resina composta; (C) Falha adesiva entre resina composta e bráquete



Ensaio de formação de biofilme 24 h de *Streptococcus mutans*:

Os corpos-de-prova foram confeccionados utilizando-se os mesmos parâmetros de confecção das amostras do teste de sorção de água e solubilidade porém, com 2 mm de espessura e 5 mm de diâmetro (Figura 12A). As amostras pertencentes ao grupo adicionado para este teste (Grupo TC - Transbond XT Light Cure Adhesive + recobrimento de 2 camadas de ORMOSIL-QAMS) foram recobertas por duas camadas de ORMOSIL-QAMS puro aplicadas com microaplicadores descartáveis (Microbrush, WI, EUS) com intervalo de 5 minutos entre a primeira e a segunda camada (Figura 12B).

Figura 12 - A) Corpos-de-prova e matriz de teflon utilizada para sua confecção; B) Aplicação de ORMOSIL-QAMS puro.



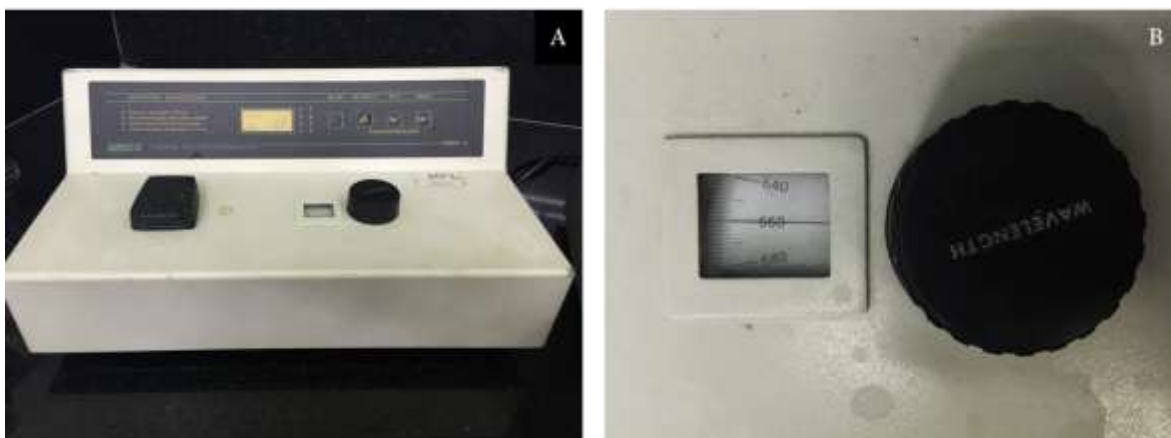
Preparo da Solução Starter: Em um tubo tipo Falcon (50 mL) contendo meio BHI enriquecido de glicose 20%, colônias de uma placa de *Streptococcus mutans* UA159 foram cultivadas por 18 horas em estufa de CO₂ (SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) (Figura13) a 37° C.

Figura 13 - Estufa a 37° C, CO₂ a 5%.



Preparo do Inóculo: Após as 18 h, uma nova solução de BHI e glicose foi preparada e a ela foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL da solução Starter. A leitura inicial deste inóculo no espectrofotômetro (Unico 1100 RS Espectrophotometer, Suite E Daiton, NJ, USA) (Figura 14A) foi de ~ 0,200, em comprimento de onda de 660 nm (Figura 14B). O inóculo retornou à estufa de CO₂ a 37° C e uma nova leitura foi efetuada de hora em hora, até que a leitura chegasse a uma absorbância de ~ 0,700.

Figura 14 - (A) Espectrofotômetro 1100 RS; (B) Comprimento de onda ajustado para 660 nm.



Preparo do Meio de Cultura: Foram preparados dois meios de cultura, um contendo meio BHI; o inóculo de *Streptococcus mutans* e sacarose 20% e outro

contendo apenas BHI estéril (controle negativo). Uma placa de 24 poços foi preenchida com o meio contendo inóculo e outra com o meio estéril. Os corpos-de-prova foram colocados nos respectivos poços e as placas foram mantidas em estufa de CO₂, a 37° C por 24 h.

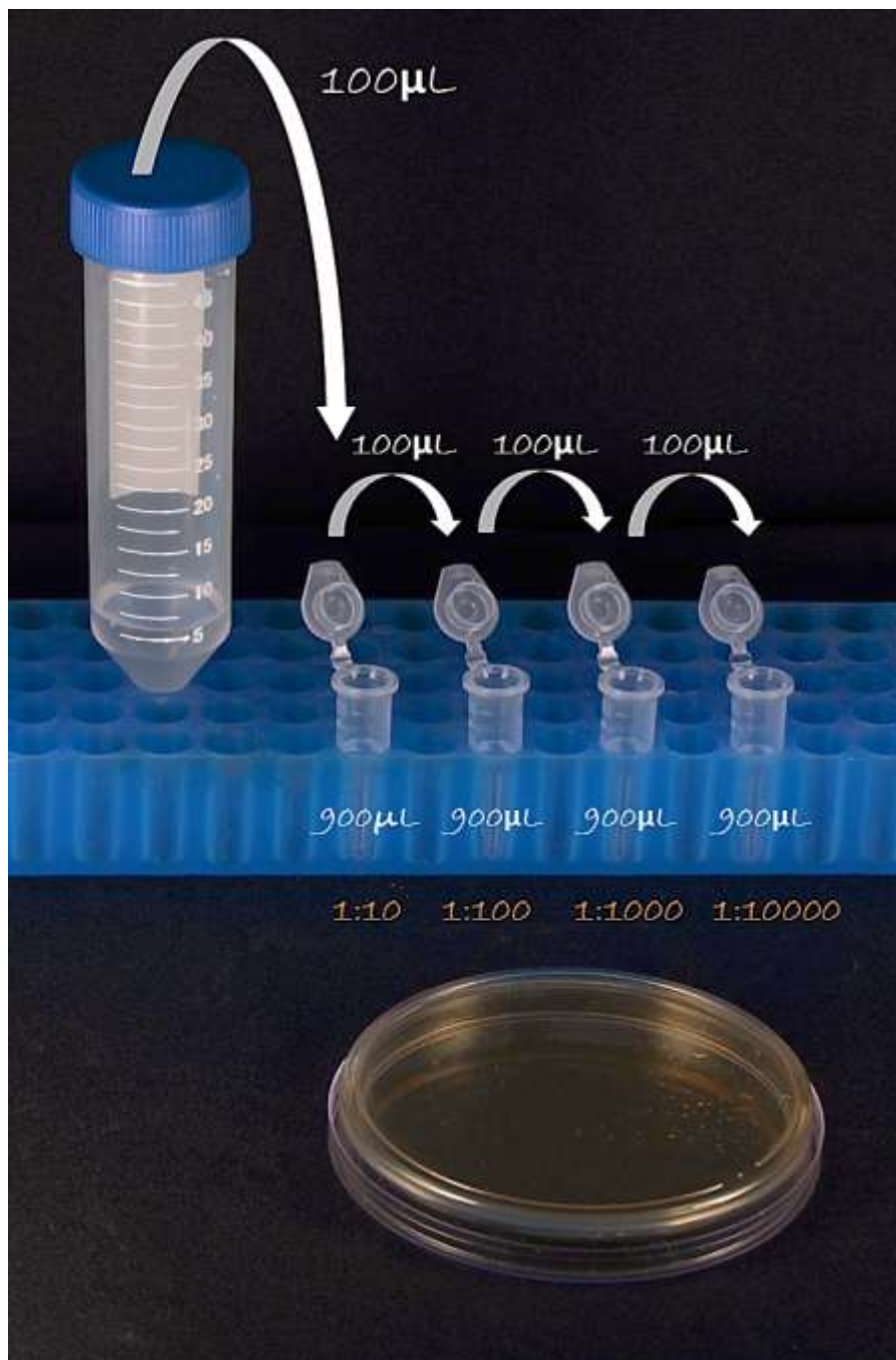
Plaqueamento: Após as 24 h, cada corpo-de-prova passou por 5 imersões em solução de soro estéril para remoção de biofilme fracamente aderido. Em seguida, foram colocados em um tubo tipo Falcon contendo 5 mL de solução de soro estéril, foram vortexeados (Figura 15A) e sonicados (9.9 s cada pulso com amplitude de 5%) (Vibra Cell, Sonics & Material, Newtown, CT, EUA) (Figura 15B), por 1 minuto.

Figura 15 - (A) Amostra vortexeada em solução de soro estéril; (B) Sonicador ajustado para 9.9 s cada pulso com amplitude de 5%.



Do soro vortexeado e sonicado de cada amostra, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um *eppendorf* contendo 900 µL de soro estéril (diluição 1:10). Este processo foi repetido até que a diluição chegasse a 1:10000 (Figura 16). De cada diluição, uma alíquota de 10 µl foi despejada em uma placa de Petri contendo BHI Ágar. Com uma alça de vidro previamente flambada e resfriada, a alíquota dispensada foi espalhada sobre toda a superfície do Ágar. O procedimento foi repetido para todas as diluições. As placas de Petri foram incubadas em estufa de 5% de CO₂, a 37° C, por 48 horas.

Figura 16 - Esquema de diluições para plaqueamento em BHI ágar. As diluições se iniciam a partir do soro em que as amostras são vortexeadas e sonicadas. Alíquotas de 100 μ L são transferidas para *eppendorfs* contendo 900 μ L de solução de soro estéril. Foram feitas diluições de 10, 100, 1000 e 10000 vezes.



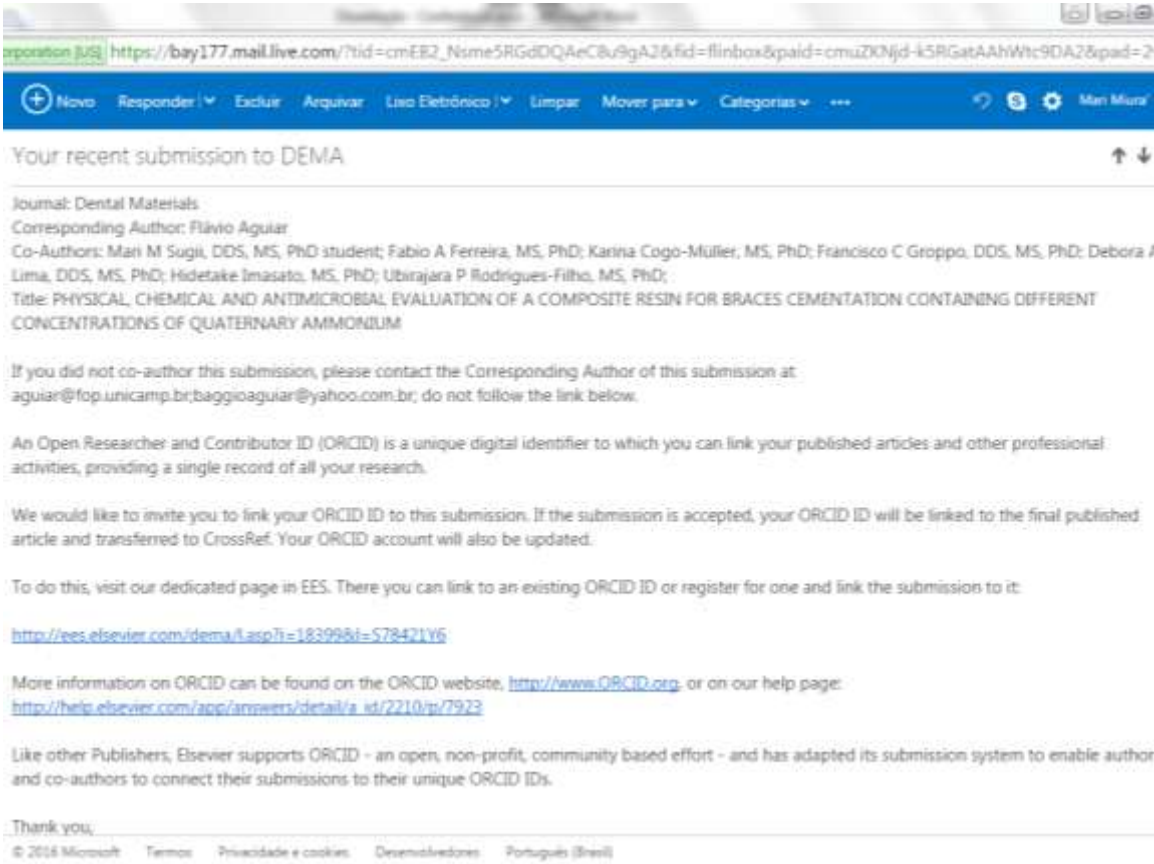
Seleção das placas para contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (CFU/ml)

Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e foram selecionadas para contagem de CFU/ml apenas as placas que continham no mínimo 20 colônias e no máximo 300. A contagem foi feita à olho-nu, sem auxílio de equipamentos sendo as colônias contadas marcadas no fundo da placa com um marcador permante.

Análise estatística

Os dados referentes às propriedades físico-químicas foram submetidos à análise ANOVA e Tukey pós-teste com nível de significância de 5%. Os dados obtidos do ensaio de formação de biofilme foram primeiramente submetidos à análise não paramétrica Kruskal-Wallis e em seguida a pós-teste Student-Newman-Keuls também com nível de significância de 5%.

ANEXO



corporation JUS | https://bay177.mail.live.com/?tid=cmER2_Nsme5RGdDQAcCBu9gA2&fid=flinbox&paid=cmuzZKNjd-k5RGatAAHWt:9DA7&pad=2

Novo Responder Excluir Arquivar Lido Eletrônico Limpar Mover para Categorias

Your recent submission to DEMA

Journal: Dental Materials
Corresponding Author: Flávio Aguiar
Co-Authors: Mari M Sugii, DDS, MS, PhD student; Fabio A Ferreira, MS, PhD; Karina Cogo-Müller, MS, PhD; Francisco C Groppo, DDS, MS, PhD; Debora A Lima, DDS, MS, PhD; Hidetake Imasato, MS, PhD; Ubirajara P Rodrigues-Filho, MS, PhD;
Title: PHYSICAL, CHEMICAL AND ANTIMICROBIAL EVALUATION OF A COMPOSITE RESIN FOR BRACES CEMENTATION CONTAINING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF QUATERNARY AMMONIUM

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at: aguiar@fop.unicamp.br; baggioaguiar@yahoo.com.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/dema/i.asp?i=18399&i=578421Y6>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7922

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable author and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

© 2014 Microsoft Termos Privacidade e cookies Desenvolvedores Português (Brasil)