



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA



**BIOATIVIDADE DOS CIMENTOS DE IONÔMERO
DE VIDRO: ANÁLISE EM MEV/EDS, FTIR/ATR,
DRX, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTOXICIDADE.**

SÃO LUÍS

2022

THAIS BEZERRA DA MACENO OLIVEIRA

**BIOATIVIDADE DOS CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO: ANÁLISE EM
MEV/EDS, FTIR/ATR, DRX, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTOXICIDADE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Bauer

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Campos Ferreira

SÃO LUÍS

2022

Oliveira, Thais Bezerra Da Maceno

Bioatividade dos cimentos de ionômero de vidro: análise em MEV/EDS, FTIR/ART, DRX, atividade antimicrobiana e citotoxicidade./ thais bezerra da maceno oliveira. – são luís, 2022.

40 f.

Orientador: José Roberto de Oliveira Bauer

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Maranhão, UFMA, 2022.

1. Cimento de ionômero de vidro. 2. Bioatividade. 3. Atividade. 4. Antibacteriana. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDU

THAIS BEZERRA DA MACENO OLIVEIRA

BIOATIVIDADE DOS CIMENTOS DE IONÔMERO DE VIDRO: ANÁLISE EM MEV/EDS, FTIR/ATR, DRX, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE.

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia / / 2022, considerou a candidato(a).

() APROVADO

() REPROVADO

1) Examinador: Prof. Dr. Vicente Castelo Branco Leitune

2) Examinador: Profa. Dra. Viviane Hass

3) Examinador suplente: Profa. Dra. Bárbara Emanoele Costa Oliveira

4) Examinador suplente: Profa. Dra. Ceci Nunes Carvalho

4) Presidente (Orientador): Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Bauer

*Só se pode alcançar um grande êxito quando nos
mantemos fiéis a nós mesmo.*

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Seguir a carreira acadêmica sempre foi o meu maior objetivo profissional e hoje, escrever os agradecimentos da minha dissertação do mestrado, me emociona, pois é o fim de um ciclo que me eleva a mais um degrau em direção ao meu sonho. Chegar até aqui, não foi uma tarefa fácil, foi uma trajetória permeada por inúmeros desafios e incertezas, e trilhar este caminho só foi possível com o apoio de várias pessoas, para as quais, expresso aqui a importância que elas tiveram e ainda tem nesta tão sonhada conquista.

Primeiramente a Deus, em reconhecimento à certeza de que não só nesses dois anos, mas em toda a minha vida Ele sempre esteve presente demonstrando seu infinito amor. Obrigada por nunca me desamparar, por tantas bênçãos e por me dar, talvez, além do que eu mereço. Também não posso deixar de agradecer à Nossa Senhora que sempre olha e intercede ao meu favor. Muito obrigada, mãezinha.

Aos meus pais, Valcy e Arnete, minha eterna gratidão. A frase “Se eu vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes” de Isaac Newton, representa muito bem a nossa relação. É assim que os vejo, GIGANTES, e se cheguei até aqui foi pelo imensurável apoio, direcionamento e incentivo que eles sempre me deram. Eu amo vocês.

Aos meus irmãos, Thiago e Valcy Junior, que dividem comigo há mais de 12 anos a difícil jornada de viver longe dos nossos pais. Obrigada pela partilha dos bons momentos e pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

Ao meu querido orientador, professor Dr. José Roberto de Oliveira Bauer, o qual eu estimo grande admiração pelo seu alto nível científico. Suas críticas construtivas e oportunas, seu interesse pela pesquisa e sua saudável exigência e cobrança contribuíram para que este caminho fosse mais leve. O seu apoio, amizade e dedicação foram determinantes na conclusão deste trabalho. Muito obrigada, professor.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Paulo Vitor Campos Ferreira, a quem hoje posso chamar de amigo. Obrigada pela sua orientação e incansável disponibilidade para o acompanhamento da realização deste trabalho.

A todos os meus amigos do Laboratório de Biomateriais do Maranhão (BIOMMA), que além de me oferecerem a amizade também contribuíram com a obtenção de alguns dados fundamentais para a execução deste trabalho. Muito obrigada, amigos.

Eu não poderia deixar de citar e agradecer aquela que me apresentou o mundo da pesquisa, professora Dra. Viviane Hass. Eu sempre vou ser grata pela oportunidade de ter sido

sua aluna na iniciação científica. Obrigada por ter despertado em mim o interesse pela continuação da vida acadêmica. A senhora é uma das minhas maiores inspirações.

Ao meu marido, Fábio Braz, pelo amor e companheirismo. Obrigada pelo apoio incondicional, por compreender minha ausência, por ser aconchego sempre que precisei. Obrigada pela sua calma e por me transmitir paz, independente da situação. Que essa seja mais uma de muitas outras conquistas que teremos juntos. Eu te amo, amor.

Por fim, e sem dúvida, a pessoa mais importante da minha vida, minha filha Isabella. Minha Isa, por muitas vezes eu pensei que depois de você eu adiaria ou talvez anulasse este sonho, mas você, com toda sua doçura, veio e me mostrou que era você o que faltava para que eu conseguisse realizá-lo. Esse amor dilacerado que eu sinto por você é minha fonte de coragem e resistência. Você trouxe um novo colorido pra minha vida, me ensinou a ser forte, a não desistir, a querer crescer e ser sempre mais, por você, por nós. Sei que devo a você infinitas horas de atenção, brincadeiras e ninares e espero um dia, poder compensá-la por isso. Obrigada por ser minha e por ser o meu maior estímulo nesta caminhada. Eu te amo, infinitamente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Variações de pH ao longo do tempo para os cimentos de ionômero de vidro: pH inicial 4,0	24
Figura 2 -	Variações de pH ao longo do tempo para os cimentos de ionômero de vidro: pH inicial 7,0	24
Figura 3 -	Liberação de íons fluoretos (mg/ml) para os cimentos de ionômero de vidro em Ph4 e pH7.....	25
Figura 4 -	Liberação de íons fosfato (mg/dL) para os cimentos de ionômero de vidro em pH4 e pH7.....	26
Figura 5 -	Liberação de íons cálcio (mg/dL) para os cimentos de ionômero de vidro em pH4 e pH7.....	26
Figura 6 -	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes magnitudes (2000 e 5000) dos materiais testados após 28 dias imersos em SBF: (A e B) Bioglass (C e D) GoldLabel, (E e F) Ionglass, (G e H) Maxxion, (I e J) Vidrion e (K e L) Vitro fill. É possível observar precipitados (indicadores brancos) em todos os CIVs.....	27
Figura 7 -	Análises EDS. A análise composicional dos precipitados mostrou a presença de íons cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}) na estrutura dos CIVs	27
Figura 8 -	Análises de FTIR/ATR após 28 dias de imersão em SBF. Espectros de FTIR mostraram a presença dos grupos funcionais carbonatos ($1080/1413/1453cm^{-1}$)	28
Figura 9 -	Análises de DRX. Os espectros evidenciaram um comportamento amorfo e ausência de picos relativos a componentes que pudessem ser precursores de bioatividade para todos os materiais	28
Figura 10 -	Valores de viabilidade celular (%) dos CIVs testados.....	29
Figura 11 -	Valores da atividade antibacteriana \log_{10} UFC dos CIVs testados	29

RESUMO

Objetivo: avaliar a liberação de íons F^- , Ca^{+2} , PO_4^{-3} , atividade alcalinizante, citotoxicidade, atividade antibacteriana e capacidade de indução da formação de precipitados minerais precursores de hidroxiapatita de cimentos de ionômero de vidro (CIV). **Materiais e métodos:** Foram avaliados seis CIVs comerciais: Bioglass (Biodinâmica), Goldlabel (GC), Vitrofil (DFL), Maxxion (FGM), Vidrion (SS WHITE) e Ionglass (Maquira). Confeccionou-se discos (n=4) para os testes de pH e liberação iônica que foram armazenados em 6 ml de água deionizada/destilada com pH iniciais (pHi) 4 e 7 por 28 dias a 37°. As leituras de pH foram feitas em diferentes tempos (15min, 30min; 1,2, 24 e 48 h; 7,14, 21 e 28 dias). Após 28 dias, analisou-se a liberação de F^- utilizando eletrodo específico e a liberação de Ca^{+2} , PO_4^{-3} foram medidas em um espectrofotômetro de luz UV (BioTek ELX800). Para a citotoxicidade utilizou-se células fibroblásticas, as amostras foram imersas (n=3) e analisadas em 24, 48 e 72h. Para a análise da capacidade de indução da formação de nanoprecursores de hidroxiapatita, discos foram confeccionadas (n =2) e armazenados em fluido corporal simulado (SBF) por 28 dias, a 37°C. Após imersão, os espécimes foram dissecados e analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura/ Espectroscopia Dispersiva de raio-X (MEV/EDS), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR/ATR) e Difração de Raios-x (DRX). Biofilmes de *S. mutans* foram cultivados sobre os discos dos CIVs (n=3) para verificar sua atividade antimicrobiana que foi determinada por contagens de unidades formadoras de colônias e expressas como UFC/mL. Os dados de liberação iônica, citototoxicidade e atividade antibacteriana foram submetidos a ANOVA (One- Way) e Holm-Sidak ($\alpha=0,05$). Os dados referentes ao pH estão representados em valores descritivos. **Resultados:** Independente do pHi, todos os CIVs se apresentaram ácidos ao longo de 28 dias. O Bioglass mostrou maior liberação de Flúor quando comparado ao Gold Label ($p<0,05$) em pH4. Em pH7 não houve diferença na liberação de F^- entre os materiais testados. O Ionglass e Vitro fill tiveram a maior liberação de íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} , respectivamente. As imagens de MEV apontaram a presença de precipitados na superfície de todos os CIVs e os espectros de FTIR mostraram a presença dos grupos funcionais carbonatos ($1080/ 1413/1453cm^{-1}$). Já as análises de DRX não apontaram picos cristalinos nanoprecursores de hidroxiapatita em nenhum dos cimentos de ionômero de vidro testados. Em relação a viabilidade celular, todos os CIVs apresentaram citotoxicidade quando comparado com o grupo controle em 72h($p<0,05$). Os CIVS testados não apresentaram atividade antibacteriana contra o *S.Mutans* ($p<0,05$). **Conclusão:** Os CIVs

apresentam liberação de íons importante para a remineralização. Entretanto, o seu baixo pH, citotoxicidade, ausência de atividade antibacteriana e a não formação de precipitados precursores de hidroxiapatita indicam que os CIVs não são materiais bioativos.

Palavras-chaves: Cimento de ionômero de vidro. Bioatividade. Atividade antibacteriana. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the release of F^- , Ca^{+2} , PO_4^{-3} ions, alkalinizing activity, cytotoxicity, antibacterial activity and the capacity to induce the formation of mineral precipitates precursors of hydroxyapatite of glass ionomer cements (GIC). **Materials and Methods:** Six commercial GICs were evaluated: Bioglass (Biodinâmica), Goldlabel (GC), Vitrofil (DFL), Maxxion (FGM), Vidrion (SS WHITE) and Ionglass (Maquira). Disks were made (n=4) for pH and ionic release tests, which were stored in 6 ml of deionized/distilled water with initial pH (pHi) 4 and 7 for 28 days at 37°C. pH readings were taken at different times (15min, 30min; 1,2, 24 and 48 h; 7,14, 21 and 28 days). After 28 days, the release of F^- was analyzed using a specific electrode and the release of Ca^{+2} and PO_4^{-3} were measured in a UV light spectrophotometer (BioTek ELX800). Fibroblastic cells were used for cytotoxicity, samples were immersed (n=3) and analyzed at 24, 48 and 72hrs. For the analysis of the capacity to induce the formation of hydroxyapatite nano precursors, disks were made (n = 2) and stored in simulated body fluid (SBF) for 28 days at 37°C. After immersion, specimens were dissected and analyzed in Scanning Electron Microscopy (SEM/EDS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR/ATR) and X-Ray Diffraction (XRD). *S. mutans* biofilms were cultured over GIC disks (n=3) to verify their antibacterial activity, which were determined by counting of colony unit formations and expressed as CFU/ml. The data of ionic release, cytotoxicity and antibacterial activity were submitted to ANOVA (One-Way) and Holm-Sidak ($\alpha=0,05$). Data referring to pH are represented in descriptive values. **Results:** Regardless of pHi, all GIC were acidic over 28 days. Bioglass showed greater fluoride release when compared to Gold Label ($p<0,05$), at pH 4. At pH 7, there was no difference on F^- release between tested materials. Ionglass and Vitro fill had the highest release of Ca^{+2} and PO_4^{-3} , respectively. SEM images indicated the presence of precipitates on the surface of all GICs and FTIR spectra showed the presence carbonate ($1080/1413/1453\text{ cm}^{-1}$) functional groups. Meanwhile, XRD analyzes did not indicate crystalline peaks of hydroxyapatite nano precursors in any of the glass ionomer cements tested. Regarding cell viability, all GICs presented cytotoxicity when compared to the control group in 72h ($p<0,05$). The GICs tested did not show antibacterial activity against *S. mutans* ($p<0,05$). **Conclusion:** GICs present important ion release for remineralization. However, their low pH, cytotoxicity, absence of antibacterial activity and the non-formation of hydroxyapatite precursors precipitates indicate that GICs are not bioactive materials.

Keywords: Glass ionomer cements. Bioactivity. Antibacterial activity. Cytotoxicity.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	11
2 CAPÍTULO I	14
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Dentro do campo da Odontologia restauradora, o ionômero de vidro, pode ser considerado um dos primeiros materiais bioativos (SPAGNUOLO, 2016) devido à liberação de íons biologicamente ativos (fluoreto, sódio, fosfato e silicato) no ambiente aquoso circundante em níveis nos quais eles têm propriedades biológicas (MAKANJUOLA *et al.*, 2022).

Dentre os íons liberados por este material, há um destaque para o flúor (YOSHIHARA *et al.*, 2017) Acredita-se, que quando liberado pelos CIVs, o flúor provoca uma remineralização através da formação de fluorapatita (HYUN-JUNG *et al.*, 2021). De acordo com Hafshejani *et al.* (2017), a liberação de flúor desse material também concede a ele uma atividade anticariogênica através da modificação da patogenicidade das bactérias. O flúor liberado por esse material inibe a enzima enolase, que controla indiretamente o sistema fosfotransferase, responsável pela entrada de açúcar nas bactérias e obtenção de energia interferindo no metabolismo da célula bacteriana (PIRES *et al.*, 2022) Além disso, a acidez do meio provocado pela queda do pH em decorrência do ácido poliacrílico torna o ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano (CHING *et al.*, 2018; SPEZZIA, 2017).

Apesar de já ter seu uso consolidado na odontologia, ainda existem controvérsias na literatura sobre a real efetividade da atividade antibacteriana e capacidade de neoformação tecidual dos CIVs. O estudo de Farrugia e Camilleri (2015) apontam que a quantidade de flúor liberado pelos CIVs não é suficiente para minimizar ou anular o crescimento bacteriano. A revisão sistemática de Randall e Wilson (1999) mostra que não há evidência conclusiva sobre o efeito positivo dos CIVs contra a cárie recorrente. Adicionalmente, Cury *et al.* (2015) mostram que o efeito antibacteriano do flúor, clinicamente, não é relevante e sua eficácia no controle da cárie ainda não foi comprovada. Em relação a capacidade de remineralização, estudos laboratoriais (MORAES *et al.*, 2021) mostram que apesar da formação da fluorapatita, que apresenta maior estabilidade química em pH baixo que a hidroxiapatita, os íons F^- não têm a capacidade de estimular a formação de novos tecidos, não apresentando assim, características de bioatividade.

A bioatividade pode ser definida como uma resposta biológica específica na interface tecido-material que resulta na formação de uma ligação entre eles (GIANNINI, 2021; VALLITTU *et al.*, 2018) De acordo com Hamdy (2018) , um material restaurador bioativo inclui pelo menos um ou mais dos seguintes comportamentos: remineralização dos tecidos

duros através da liberação de flúor e/ou outros minerais e formação semelhante a apatita ao longo da interface do tecido material por imersão em líquido que simula os fluidos fisiológicos normais. A literatura aponta os CIVs como um material naturalmente bioativo (SIDHU; NICHOLSON, 2016). No entanto, essa bioatividade é determinada em sua capacidade de formação de apatita na superfície do material após imersão em um fluido fisiológico (MAKANJUOLA *et al.*, 2022)

Para Darvel (2021) determinar a bioatividade desta forma configura ausência de uma resposta biológica específica, que é uma característica crucial de um material bioativo (SKALLEVOLD *et al.*, 2019). Ele descreve essa resposta como um resultado químico da reatividade do vidro e da composição do meio abrindo precedentes para críticas sobre as metodologias utilizadas nos testes de bioatividade (DARVEL, 2021). Os mesmos são realizados com a imersão do material em soluções super saturadas, como o *simulated body fluid* (SBF) (KOKUBO; TAKADAMA, 2006) onde a resposta positiva para o teste é o aparecimento de um precipitado de apatita naquele material (DARVEL, 2021). O trabalho de Pan *et al.* (2010) levanta um questionamento sobre a bioatividade ser prevista a partir da formação de um precipitado de apatita observado simplesmente na imersão no SBF. Para Ferracane e Bertassoni (2021), a precipitação mineral resultante de uma supersaturação de um ambiente com misturas apropriadas de íons cálcio e fosfato não constitui bioatividade, a menos que seja dirigido por células.

Apesar disso, é possível encontrar na literatura trabalhos definindo a bioatividade dos CIVs através da formação de precipitados de hidroxiapatita após a imersão em SBF sem que haja nenhum contato do material com células vivas (MAKANJUOLA *et al.* 2022; MORAES *et al.*, 2021) quando na verdade, a bioatividade deve ser determinada pela resposta biológica da interação do material com organismos vivos (SONARKAR; PURBA, 2015).

Os resultados clínicos controversos dos CIVs podem ser o reflexo das falhas na determinação das propriedades desse material nos estudos laboratoriais. A revisão sistemática de Raggio *et al.* (2016) enfatiza que há um número maior de falhas em restaurações após a técnica de tratamento restaurador atraumático (ART) quando o tratamento foi realizado com CIV. Adicionalmente, estudos longitudinais relataram que as taxas de insucesso são ainda maiores quando o procedimento é realizado em cavidades envolvendo múltiplas superfícies, apresentando uma taxa de sobrevivência de 71% após um ano da restauração com este material (LOPES *et al.*, 2018). O ensaio clínico de Ersim *et al.* (2006) e Akman e Tosun (2020) mostram que os CIVs não possuem desempenho clínico superior ao ser comparado com outros materiais restauradores o que corrobora com a revisão sistemática de Rosa *et al.* (2019) que aponta, que,

independentemente do material restaurador utilizado, exames clínicos, radiográficos e microbiológicos mostram que a selagem correta da cavidade leva a inativação de lesões cáries. Darvel (2021) explica esse processo como uma “resposta de defesa contra um desafio” onde há a formação de uma dentina reparadora que acontece com o objetivo de selar e proteger a polpa independente do material restaurador utilizado.

Assim, fica a dúvida da real capacidade do CIV em relação a sua propriedade antibacteriana, capacidade de formar nanoprecussores de hidroxiapatita e a sua biocompatibilidade. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de diferentes cimentos de ionômero de vidro convencionais na indução da formação de precipitados minerais precursores de hidroxiapatita, bem como a atividade antibacteriana contra os *streptococos mutans*, viabilidade celular/citotoxicidade e a sua liberação iônica.

2. CAPÍTULO I

Os Cimentos de Iônomero de Vidro São Materiais Bioativos?

A ser submetido à periódico ainda a definir

Thaís Bezerra da Maceno Oliveira¹;
Fabiola Rodrigues Sampaio Nunes¹;
Bárbara Emanuele Costa Oliveira²;
Shiley Maria de Nazaré Rocha Cardoso¹;
Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos³;
Paulo Vitor Campos Ferreira¹;
José Bauer¹

¹Programa de Pós- Graduação em Odontologia, Laboratório de Biomateriais do Maranhão (BIOMMA), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil

²Programa de Pós- Graduação em Odontologia, Universidade Ceuma

³Departamento de Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil

Autor correspondente:

José Bauer

Endereço: Universidade Federal do Maranhão (UFMA) , Departamento de Odontologia II.

Av. dos Portugueses, 1966. Campus do Bacanga CEP: 65.080-805

São Luís - Maranhão - Brasil

E- mail: jose.bauer@ufma.br

RESUMO

Objetivo: avaliar a liberação de íons F^- , Ca^{+2} , PO_4^{-3} , atividade alcalinizante, citotoxicidade, atividade antibacteriana e capacidade de indução da formação de precipitados minerais precursores de hidroxiapatita de cimentos de ionômero de vidro (CIV). **Materiais e métodos:** Foram avaliados seis CIVs comerciais: Bioglass (Biodinâmica), Goldlabel (GC), Vitrofil (DFL), Maxxion (FGM), Vidrion (SS WHITE) e Ionglass (Maquira). Confeccionou-se discos (n=4) para os testes de pH e liberação iônica que foram armazenados em 6 ml de água deionizada/destilada com pH iniciais (pHi) 4 e 7 por 28 dias a 37°. As leituras de pH foram feitas em diferentes tempos (15min, 30min; 1,2, 24 e 48 h; 7,14, 21 e 28 dias). Após 28 dias, analisou-se a liberação de F^- utilizando eletrodo específico e a liberação de Ca^{+2} , PO_4^{-3} foram medidas em um espectrofotômetro de luz UV (BioTek ELX800). Para a citotoxicidade utilizou-se células fibroblásticas, as amostras foram imersas (n=3) e analisadas em 24, 48 e 72h. Para a análise da capacidade de indução da formação de nanoprecursores de hidroxiapatita, discos foram confeccionadas (n =2) e armazenados em fluido corporal simulado (SBF) por 28 dias, a 37°C. Após imersão, os corpos de prova foram dissecados e analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura/ Espectroscopia Dispersiva de raio-X (MEV/EDS), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR/ATR) e Difração de Raios-x (DRX). Biofilmes de *S. mutans* foram cultivados sobre os discos dos CIVs (n=3) para verificar sua atividade antimicrobiana que foi determinada por contagens de unidades formadoras de colônias e expressas como UFC/mL. Os dados de liberação iônica, citototoxicidade e atividade antibacteriana foram submetidos a ANOVA (One- Way) e Holm-Sidak ($\alpha=0,05$). Os dados referentes ao pH estão representados em valores descritivos. **Resultados:** Independente do pHi, todos os CIVs se apresentaram ácidos ao longo de 28 dias. O Bioglass mostrou maior liberação de Flúor quando comparado ao Gold Label ($p<0,05$) em pH4. Em pH7 não houve diferença na liberação de F^- entre os materiais testados. O Ionglass e Vitro fill tiveram a maior liberação de íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} , respectivamente. As imagens de MEV apontaram a presença de precipitados na superfície de todos os CIVs e os espectros de FTIR mostraram a presença dos grupos funcionais grupos funcionais carbonatos ($1080/1413/1453cm^{-1}$). Já as análises de DRX não apontaram picos cristalinos nanoprecursores de hidroxiapatita em nenhum dos cimentos de ionômero de vidro testados. Em relação a viabilidade celular, todos os CIVs apresentaram citotoxicidade quando comparado com o grupo controle em 72h($p<0,05$). Os CIVS testados não apresentaram atividade antibacteriana contra o *S.Mutans* ($p<0,05$). **Conclusão:** Os CIVs apresentam liberação de íons importante para a remineralização. Entretanto, o seu baixo

pH, citotoxicidade, ausência de atividade antibacteriana e a não formação de precipitados precursores de hidroxiapatita indicam que os CIVs não são materiais bioativos.

Palavras-chaves: Cimento de ionômero de vidro. Bioatividade. Atividade antibacteriana. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the release of F^- , Ca^{+2} , PO_4^{-3} ions, alkalinizing activity, cytotoxicity, antibacterial activity and the capacity to induce the formation of mineral precipitates precursors of hydroxyapatite of glass ionomer cements (GIC). **Materials and Methods:** Six commercial GICs were evaluated: Bioglass (Biodinâmica), Goldlabel (GC), Vitrofil (DFL), Maxxion (FGM), Vidrion (SS WHITE) and Ionglass (Maquira). Disks were made (n=4) for pH and ionic release tests, which were stored in 6 ml of deionized/distilled water with initial pH (pHi) 4 and 7 for 28 days at 37°C. pH readings were taken at different times (15min, 30min; 1,2, 24 and 48 h; 7,14, 21 and 28 days). After 28 days, the release of F^- was analyzed using a specific electrode and the release of Ca^{+2} and PO_4^{-3} were measured in a UV light spectrophotometer (BioTek ELX800). Fibroblastic cells were used for cytotoxicity, samples were immersed (n=3) and analyzed at 24, 48 and 72hrs. For the analysis of the capacity to induce the formation of hydroxyapatite nano precursors, disks were made (n = 2) and stored in simulated body fluid (SBF) for 28 days at 37°C. After immersion, specimens were dissected and analyzed in Scanning Electron Microscopy (SEM/EDS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR/ATR) and X-Ray Diffraction (XRD). *S. mutans* biofilms were cultured over GIC disks (n=3) to verify their antibacterial activity, which were determined by counting of colony unit formations and expressed as CFU/ml. The data of ionic release, cytotoxicity and antibacterial activity were submitted to ANOVA (One-Way) and Holm-Sidak ($\alpha=0,05$). Data referring to pH are represented in descriptive values. **Results:** Regardless of pHi, all GIC were acidic over 28 days. Bioglass showed greater fluoride release when compared to Gold Label ($p<0,05$), at pH 4. At pH 7, there was no difference on F^- release between tested materials. Ionglass and Vitro fill had the highest release of Ca^{+2} and PO_4^{-3} , respectively. SEM images indicated the presence of precipitates on the surface of all GICs and FTIR spectra showed the presence carbonate ($1080/1413/1453\text{ cm}^{-1}$) functional groups. Meanwhile, XRD analysis did not indicate crystalline peaks of hydroxyapatite nano precursors in any of the glass ionomer cements tested. Regarding cell viability, all GICs presented cytotoxicity when compared to the control group in 72h ($p<0,05$). The GICs tested did not show antibacterial activity against *S. mutans* ($p<0,05$). **Conclusion:** GICs

present important ion release for remineralization. However, their low pH, cytotoxicity, absence of antibacterial activity and the non-formation of hydroxyapatite precursors precipitates indicate that GICs are not bioactive materials.

Keywords: Glass ionomer cements. Bioactivity. Antibacterial activity. Cytotoxicity

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, inúmeros estudos tem sido publicados buscando o desenvolvimento de materiais bioativos através da incorporação de partículas liberadoras de íons cálcio e fosfato que estimulam a remineralização (BALBINOT *et al.*, 2020; BRAGA, 2019; BARAS *et al.*; 2019; CARVALHO *et al.*, 2015) . A presença de partículas bioativas nos materiais proporcionam o aumento do pH (CARNEIRO *et al.*, 2018), atividade antibacteriana (BAUER *et al.*, 2019), atividade enzimática (MAKOWSKI; RAMSBY, 2004) e a precipitação de uma camada rica em cálcio e fosfato (FERNANDO *et al.*, 2017) nanoprecursores de hidroxiapatita (BRAGA; FRONZA, 2020).

Inúmeros estudos também tem adicionado partículas bioativas em cimento de ionômero de vidro em busca da bioatividade com a formação de precipitados ricos em cálcio e fosfato (ANA *et al.*, 2003; CALUWÉ *et al.*, 2017; KARIMI; REZABEIGI; DREW, 2019; OSORIO *et al.*, 2015; YLI-URPO *et al.*, 2004). No entanto, alguns autores relatam que o cimento de ionômero de vidro já apresenta características de bioatividade desde a sua invenção por Wilson e Kent em 1971 (SPAGNUOLO, 2022; WILSON; KENT, 1972). A maioria dos cimentos apresentam partículas de silicato com uma complexa mistura de componentes como: SiO₂ (24,9%), Al₂O₃ (14,2%), AlF₃ (4,6%), CaF₂ (12,8%), NaAlF₆ (19,2%), AlPO₄ (24,2%) que liberam íons Ca⁺², PO₄⁻³ e F⁻ (YLI-URPO *et al.*, 2004; SIDHU; NICHOLSON, 2016) capazes de formar precipitados (PROENÇA *et al.*, 2020).

Por outro lado, críticas contundentes tem sido apontada na metodologia da avaliação da bioatividade através da formação de precipitados dos novos *smart materials* (DARVELL, 2021; GIANNINI, 2021). A bioatividade deve ser determinada através da interação com células e tecidos vivos com o intuito de produzir uma resposta específica, como a formação mineral biologicamente direcionada (FERRACANE; BERTASSONI, 2021). No entanto, ela tem sido caracterizada com a formação de precipitado de apatita na superfície do material após a imersão em uma solução saturada com íons Ca⁺² e PO₄⁻³ (SKALLEVOLD *et al.*, 2019) sem que haja o contato com células, configurando ausência de uma resposta biológica o que não constitui bioatividade (FERRACANE; BERTASSONI, 2021).

Sabendo que a bioatividade deve ser estabelecida em uma condição biológica com a presença de células e/ou bactéria (PAN *et al.*, 2010) o uso desta metodologia pode levar a resultados falsos positivos (CALUWÉ *et al.*, 2017) e por isso testes celulares devem ser conduzidos para validar os resultados. Entretanto, não há na literatura um relato da avaliação

da bioatividade (FERNANDO *et al.*, 2017), que avalia o impacto desses precipitados em organismo vivos.

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar a liberação de íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e F, atividade de alcalinização, formação de precipitados bem como a atividade antibacteriana e citotoxicidade de diferentes cimentos de ionômero de vidro comerciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 6 cimentos de ionômero de vidro comercial, a composição, fabricante, número de lote e composição estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Nome, fabricante, número de lote, composição dos materiais utilizados no estudo

Material Fabricante (Lote)	Composição	
	Pó	Líquido
Maxxion R FGM (070319)	<i>Após a mistura das fases:</i> Vidro de Aluminofluorsilicato, Ácido Policarboxílico, Ácido Tartárico, Fluoreto de Cálcio, Radiopacificadores e Água	
Bioglass R Biodinamica (078/21)	Fluorsilicato de Cálcio, Bário, Alumínio, Ácido poliacrílico e Cargas Inorgânicas	Ácido poliacrílico, Ácido Tartárico e Água Deionizada
Vitro Fil DFL (12071201)	Silicato de flúor, estrôncio, alumínio, ácido poliacrílico desidratado e óxido de ferro	Ácido poliacrílico, Ácido Tartárico e Água destilada
Vidrion R SSWhite 00500321	Fluorsilicato de sódio, cálcio, alumínio, sulfato de bário, ácido poliacrílico e pigmentos	Ácido tartárico e água destilada.
Ionglass Maquira 956220	Fluorsilicato de sódio, cálcio e alumínio	Ácido poliacrílico, Ácido Tartárico e Água Deionizada.
GC Gold GC 201021	<i>Após a mistura das fases:</i> Vidro de Aluminofluorsilicato, Ácido Policarboxílico, Ácido Tartárico, Fluoreto de Cálcio, Radiopacificadores e Água	

2.1 Análise de pH e liberação iônica

Duas soluções com diferentes valores de pH inicial foram preparadas: uma solução de $\text{pH}_i 4$ (utilizando ácido clorídrico para o ajuste) e uma solução de $\text{pH}_i 7$ (utilizando o

hidróxido de sódio para o ajuste). Quatro discos (10mmx1mm) foram confeccionados para cada grupo experimental. Os CIVs foram manipulados com espátula de plástico e bloco de papel, inseridos em matriz de silicone, cobertos com uma tira de poliéster e prensados com lâmina de vidro. Foi padronizado o tempo de presa de 10min para todos os CIVs. Os corpos de prova foram armazenados em frascos plásticos individuais contendo 5 ml das soluções preparadas (pH 4 ou pH 7) em estufa à 37 °C. A leitura do pH foi verificada nos intervalos de 15m,30m,1h,2h, 24h, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias com o auxílio de um eletrodo (QM-A338, Quimis, São Paulo, Brasil) posicionado diretamente nos frascos (PROENÇA *et al.*, 2020; MORAES *et al.*, 2021).

Após a análise da atividade alcalina, as soluções onde os corpos de prova estavam armazenados anteriormente foram utilizadas para a mensuração das concentrações de íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e F^- .

Para a mensuração da concentração dos íons cálcio foi utilizado o reagente colorimétrico arsenazo (cálcio arsenazo, Doles, lote # 13051, Goiânia, GO, Brasil) e para o fosfato o respectivo reagente colorimétrico (fosfato, Doles, lote # 14041, Goiânia, GO, Brasil). A quantificação de íons Ca^{2+} e PO_4^{-3} foram realizadas em três leituras repetidas de cada amostra por meio de um espectrofotômetro (ELX800, Biotek, Winooski, VT, EUA), sendo determinada uma média aritmética da absorbância das misturas a 650 nm.

Para liberação de íons fluoretos (F^-) foi utilizado um eletrodo de íons seletivo para F^- (Modelo Q400ISE, Quimis, São Paulo, Brasil) acoplado a um analisador digital pH/ F^- (Alyser Fluoreto 18AF-001). O aparelho foi previamente calibrado usando soluções padrões com as seguintes concentrações de F^- : 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16ppm, após o tamponamento com TISAB II (1mL:1mL). As leituras dos íons na solução foram feitas em triplicatas (MORAES *et al.*, 2021).

2.2 Formação de nanoprecursos (MEV/EDS, FTIR-ATR e DRX)

Dois corpos de prova em formato de disco (10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram confeccionados para cada grupo da mesma maneira descrita nos itens anteriores. As amostras foram posicionadas em frascos plásticos individuais contendo 5 ml de solução de fluido corporal simulado (SBF) e armazenados em estufa por 28 dias a 37°C. Após o período de imersão, estas foram retiradas da solução e desidratadas em dessecador por 24 h (MORAES *et al.*, 2021).

As análises de MEV/EDS (TM3030, Hitachi, Tóquio, Japão) em ampliações de 2000x e 5000x foram obtidas antes e depois da imersão em SBF para caracterização morfológica dos precipitados depositados na superfície. Posteriormente, espectros de FTIR/ATR foram coletados (IRTracer-100, Shimadzu, Quioto, Japão) para identificação de bandas características de precipitados de cálcio e fosfato. Os espectros foram obtidos em modo de transmitância, com 60 varreduras em resolução de 4 cm^{-1} e extensão de 400 a 2000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de Brometo de potássio (KBr) (PROENÇA *et al.*, 2020).

Caracterização adicional dos precipitados foi realizada através de medidas de difração de Raios-X em um difratômetro (D8 Advance, Bruker, Alemanha) com radiação $\text{Cu-K}\alpha$ (40 kV, 40 mA), detector linear e fenda de 0,6 mm. Todas as medidas foram feitas à 25 °C, com passo angular (2θ) de 0,02° e intervalo de medida de 4 a 94° .

2.3 Citotoxicidade

As células de fibroblastos gengivais humanos HGF (American Type Culture Collection - ATCC® CRL-2014™), foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2 em atmosfera úmida, e cultivada em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB; Atlanta biologicals®), 100 U mL^{-1} de penicilina, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e 250 mg mL^{-1} Fungizone (anfotericina B; Gibco) e armazenadas a 37°C em 5% de CO_2 até o momento do uso. Para avaliar seus efeitos biológicos, o meio condicionado foi produzido por imersão dos corpos de prova (\varnothing 5 mm, 1 mm h / esterilizados / luz ultravioleta / 30 min), ao meio de cultura a 37°C por 24h.

A viabilidade celular relativa das amostras foi avaliada usando solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio brometo 0,5% + DMEM/SFB). As placas foram incubadas por 24 horas (37°C, umidade 98%, 5% de CO_2) protegidas da luz. Depois desse período, o meio foi trocado por dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (100 μL /poço) e incubada por 30 min a 37°C e o valor de absorbância foi registrado em leitura espectrofotométrica a um comprimento de onda de 550 nm (Synergy H1, Bio Tek Instruments, Winooski, VT, EUA). A partir dos valores de absorbância obtidos foram calculadas as porcentagens de viabilidade celular. O cálculo considerou: % Viabilidade = $\text{TA} / \text{T1} \times 100$. Onde: TA = média da absorbância da célula tratada – absorbância do branco da amostra / T1 = absorbância da suspensão celular sem tratamento. Foram gerados gráficos comparativos entre as concentrações testadas e as porcentagens de crescimento e viabilidade celulares utilizando-se o programa

GraphPad Prism. (GraphPad Software, LLC, 2365 Northside Dr., Suite 560, San Diego, CA 92108, EUA) (BIANCHI *et al.*, 2013; CALDAS *et al.*, 2019).

2.4 Atividade Antibacteriana

Para avaliação da atividade antimicrobiana, três amostras de cada grupo foram preparadas a partir de matrizes (10 mm x 2 mm) e fixadas à tampa de uma placa de 24 poços. Alíquotas de *Streptococcus mutans* (UA159) congeladas foram depositadas em placas de ágar BHI (BHI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e foram incubadas por 48 horas a 37°C. Unidades formadoras de colônias (UFC) foram coletadas e transferidas para tubos contendo caldo BHI suplementado com 1% de sacarose e cultivadas até a fase experimental tardia. A fim de formar um inóculo microbiano, as suspensões foram ajustadas usando a solução padrão 0.5 da escala de McFarland, resultando em uma suspensão com uma concentração aproximada de 10^8 UFC/mL (COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017).

Alíquotas de 1 ml de BHI suplementado com 1% de sacarose foram adicionadas a cada poço de uma placa de 24 poços estéril, seguida por 100 µl da solução microbiana ajustada. A tampa contendo as amostras esterilizadas foi posicionada na placa. Todas as amostras foram submersas na suspensão de caldo e inóculo. A placa foi incubada por 24h a 37°C. Após 24 horas, uma alíquota de 100 µl de cada poço foi transferida para tubos contendo 1 ml de solução salina estéril e vortexada vigorosamente. Foram realizadas diluições seriadas de alíquotas dessas suspensões até alcançar uma diluição de 10^{-8} e 2 gotas de 20 µl de cada diluição foi inoculada em ágar BHI (BD, Sparks, USA) para determinar o número de unidades formadoras de colônias. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, 10% CO₂. Após 48 horas foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias por meio de um estereomicroscópio. Os resultados foram expressos em log₁₀ UFC/mL (COSTA OLIVEIRA; CURY; RICOMINI FILHO, 2017).

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o Software SigamPlot 13.0. Os dados obtidos foram tabulados e avaliados quanto a sua distribuição normal. Os dados de liberação iônica, citototoxicidade e atividade antibacteriana foram submetidos a ANOVA (One-way) e Holm-Sidak ($\alpha=0,05$). Os dados referentes ao pH, análise de MEV/EDS, FTIR/ATR e DRX estão representados em valores descritivos.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade alcalinizante

As análises de pH de todas as condições testadas neste estudo com diferentes CIVs convencionais estão apresentadas nas Figuras 1 e 2. Independente do pH inicial, todos os CIVs se apresentaram ácidos ao longo de 28 dias.

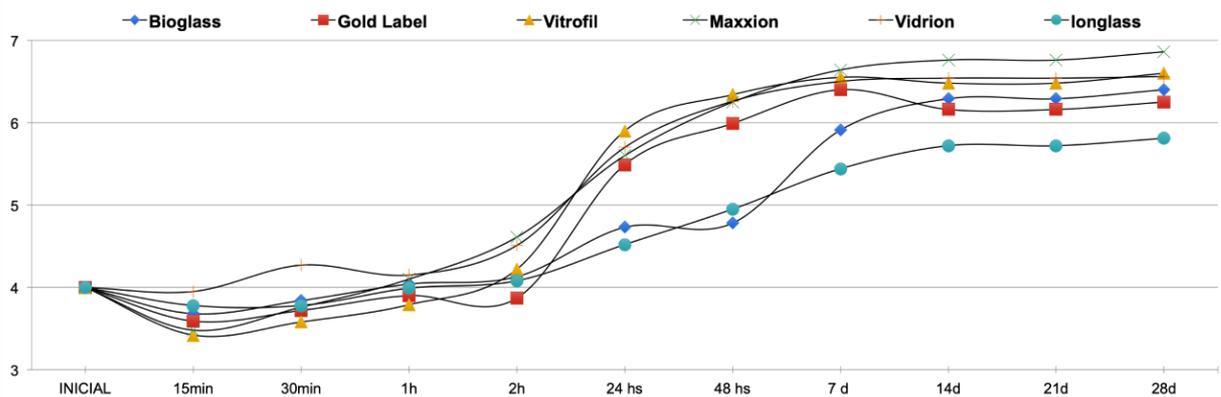


Figura 1 - Variações de pH ao longo do tempo para os cimentos de ionômero de vidro : pH inicial 4,0

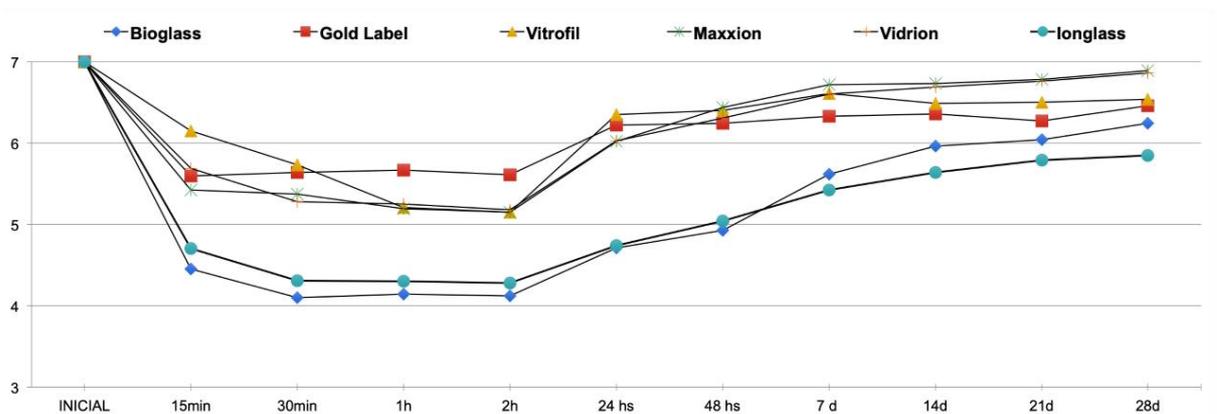


Figura 2 - Variações de pH ao longo do tempo para os cimentos de ionômero de vidro : pH inicial 7,0

3.2 Liberação iônica

3.2.1 Liberação de íons de flúor (F^-)

As médias e desvios padrão da liberação de íons fluoreto, dos grupos testados, em diferentes pHs, são mostrados na Figuras 3. Em pH4 e pH7 o cimento de ionômero de vidro Bioglass mostrou maior liberação de Flúor quando comparado ao Gold Label ($p < 0,05$), enquanto os demais CIV apresentaram valores similares ($p < 0,05$).

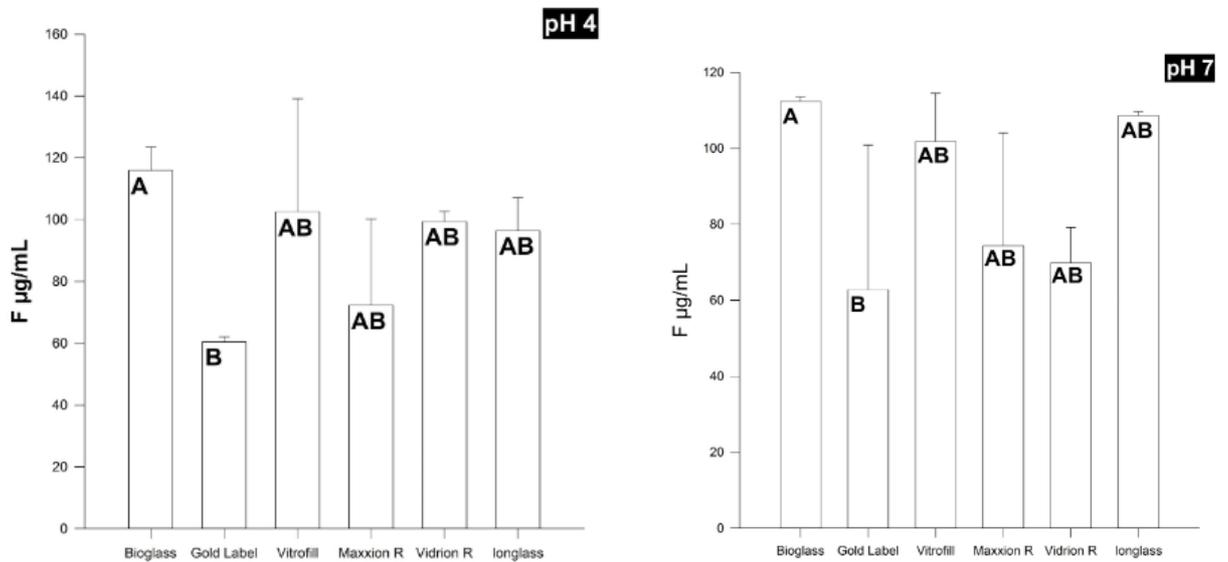


Figura 3 - Liberação de íons fluoretos (mg/ml) para os cimentos de ionômero de vidro em Ph4 e pH7

3.2.2 Liberação de Cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-})

As Figuras 4 e 5 mostra as médias e desvios padrão do cálcio e liberação de íons fosfato para os grupos testados em um pH 4 e 7. O cimento de ionômero de vidro Ionglass apresentou valores de liberação de íons cálcio maiores que os demais grupos no pH4 e pH7. Ao avaliar a liberação de íons fosfato, em pH4 o cimento de ionômero de vidro Vitro fill teve uma maior liberação enquanto que no pH7 o CIV Maxxion obteve o maior valor.

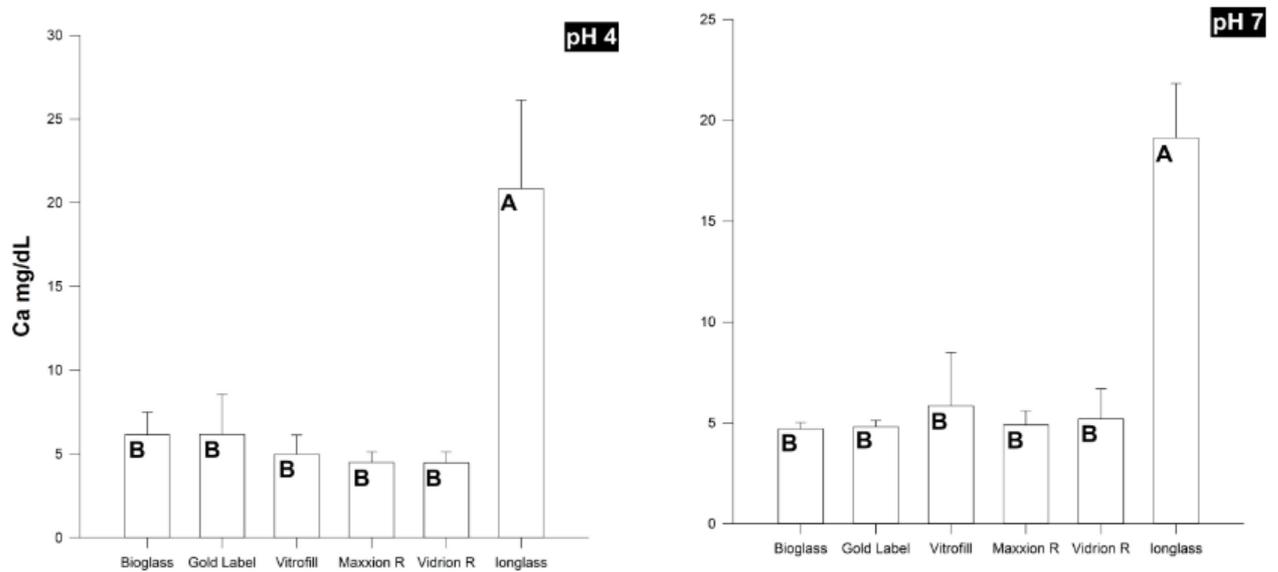


Figura 4 - Liberação de íons fosfato (mg/dL) para os cimentos de ionômero de vidro em pH4 e pH7

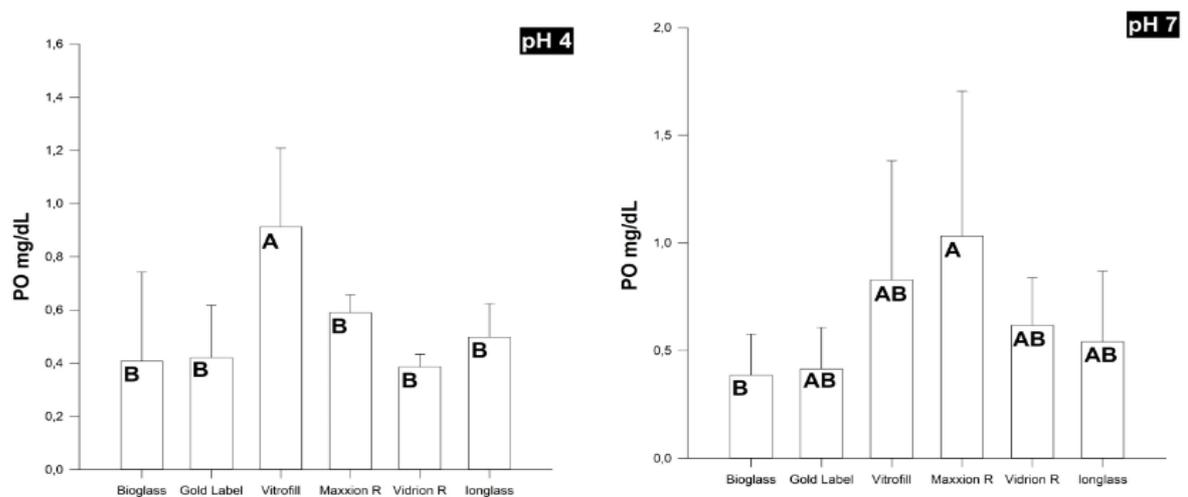


Figura 5 - Liberação de íons cálcio (mg/dL) para os cimentos de ionômero de vidro em pH4 e pH7

3.2.3 Análises de MEV/EDS, FTIR-ATR e DRX

As imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos materiais testados após 28 dias imersos em SBF (Figura 6) mostraram a presença de precipitados cristalinos na superfície de todos os CIVs. A análise composicional dos precipitados mostrou a presença de

íons cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}) na estrutura de todos os materiais (Figura 7). Os espectros de FTIR (Figura 8) grupos funcionais carbonatos ($1080/1413/1453\text{cm}^{-1}$). Nas análises de DRX (Figura 9), os espectros evidenciaram ausência de picos relativos a componentes que pudessem ser precursores de bioatividade.

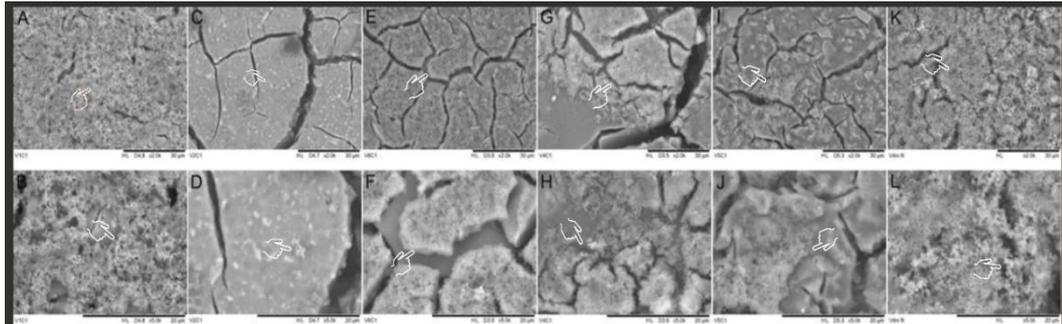


Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes magnitudes (2000 e 5000) dos materiais testados após 28 dias imersos em SBF: (A e B) Bioglass (C e D) GoldLabel, (E e F) Ionglass, (G e H) Maxxion, (I e J) Vidrion e (K e L) Vitro fill. É possível observar precipitados (indicadores brancos) em todos os CIVs

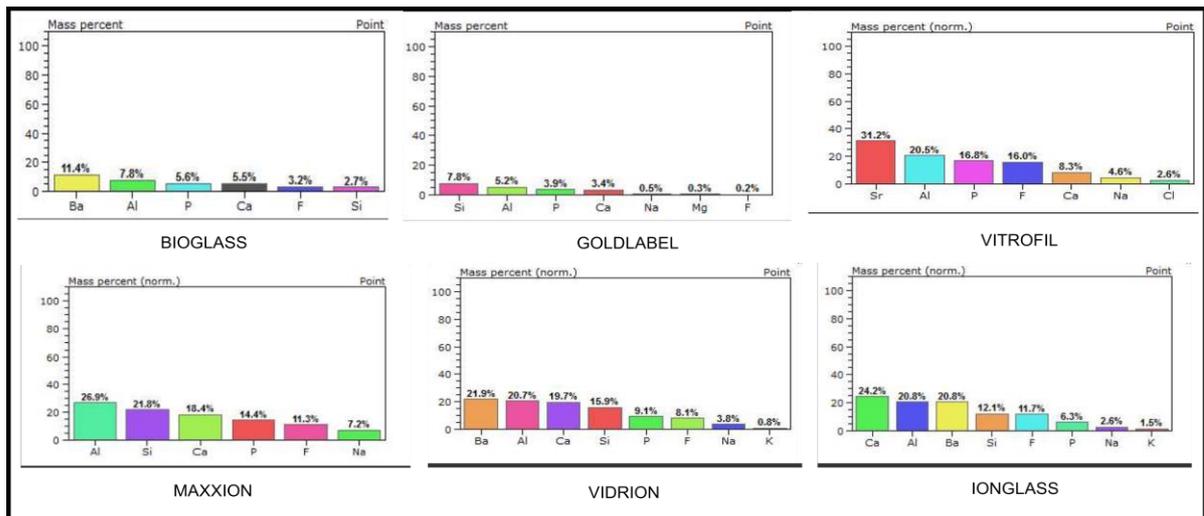


Figura 7 - Análises EDS. A análise composicional dos precipitados mostrou a presença de íons cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^{-3}) na estrutura dos CIVs

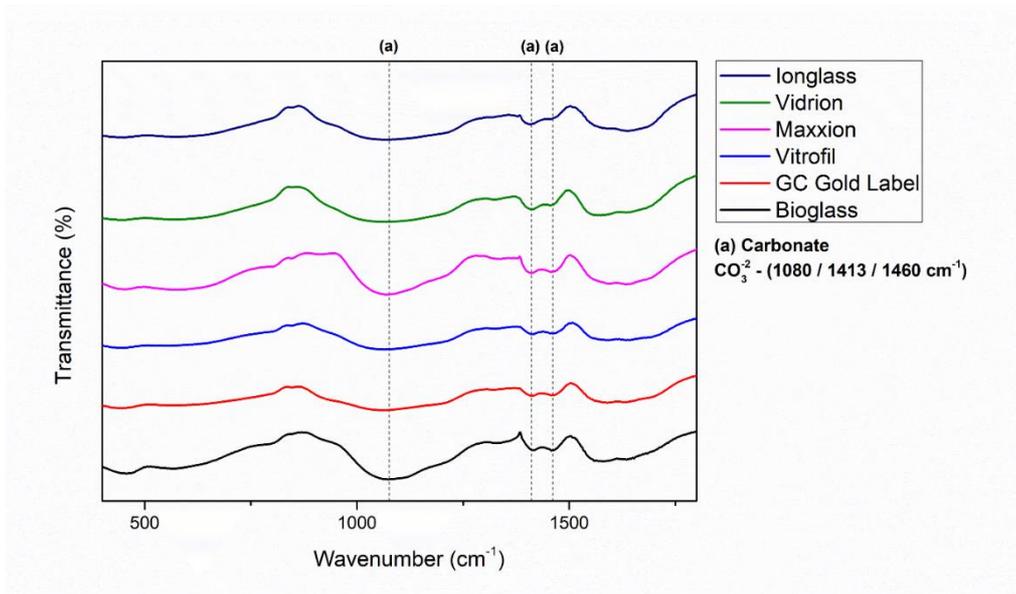


Figura 8 - Análises de FTIR/ATR após 28 dias de imersão em SBF. Espectros de FTIR mostraram a presença dos grupos funcionais carbonatos ($1080/1413/1453\text{cm}^{-1}$)

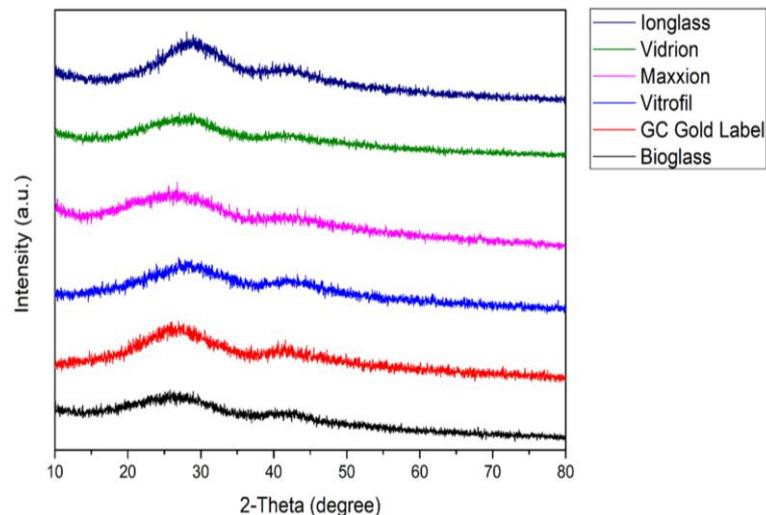


Figura 9 - Análises de DRX. Os espectros evidenciaram um comportamento amorfo e ausência de picos relativos a componentes que pudessem ser precursores de bioatividade para todos os materiais

3.2.4 Citotoxicidade

Os resultados dos testes de citotoxicidade em termos de viabilidade de fibroblastos dos CIVs por 24, 48 e 72 h são apresentados na Figura 10, como porcentagens de viabilidade celular em relação ao grupo controle (100% = não tóxico). Em 24h, os grupos experimentais

Longlass e Bioglass apresentaram viabilidade celular próximo à 60% enquanto que os demais apresentaram viabilidade celular acima de 70% ($p>0,05$). Entretanto, em 72hrs todos os grupos experimentais apresentaram viabilidade celular abaixo de 50% o que configura efeito citotóxico do material, quando comparado ao controle ($p<0,05$).

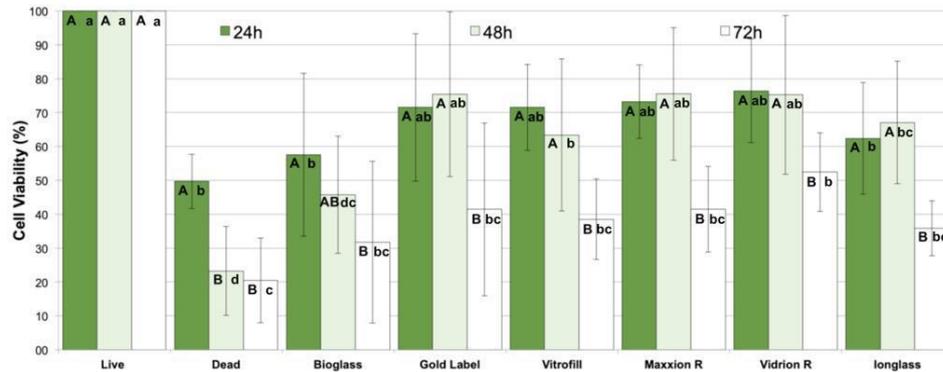


Figura 10 - Valores de viabilidade celular (%) dos CIVs testados

3.2.5 Atividade antibacteriana

A Figura 11 mostra os resultados em média e desvio padrão da avaliação da atividade antibacteriana dos materiais testados. Os CIVs testados não apresentaram redução significativa das unidades formadoras de colônia (UFC) de streptococcus mutans quando comparados com o grupo controle representado pela clorexidina 0,12% ($p>0,05$).

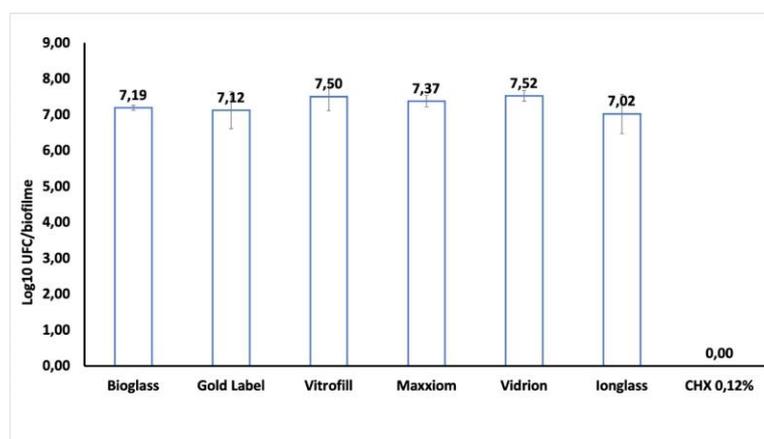


Figura 11 - Valores da atividade antibacteriana log₁₀ UFC dos CIVs testados

4 DISCUSSÃO

A bioatividade é uma propriedade desejável para os cimentos de ionômero de vidro. Compreender a interação na interface substrato-material é crucial para a longevidade do tratamento restaurador. Materiais bioativos são definidos como materiais capazes de interagir/provocar respostas no tecido vivo, organismos ou células (SONARKAR; PURBA, 2015). E recentemente alguns estudos citam o CIV como um material bioativo (SIDHU; NICHOLSON, 2016; KHOROUSHI; KESHANI, 2013; SPAGNUOLO, 2016):

No entanto, a forma como a sua bioatividade tem sido determinada ainda suscita algumas discussões. De acordo com Caluwé *et al.* (2017), a determinação da bioatividade destes materiais, após imersão em soluções ionicamente saturadas (PBS ou SBF), podem levar a resultados falsos/positivos. Portanto, testes celulares *in vitro* e experimentos *in vivo* devem ser realizados para validá-los. Isso nos levou a investigar diferentes CIVs comerciais no intuito de mostrar a sua real capacidade de indução de formação de precursores de hidroxiapatita, a resposta da sua interação com células vivas e sua atividade antimicrobiana.

A capacidade de formação de hidroxiapatita na superfície dos CIVs é usada como marcador de bioatividade (MAKANJUOLA *et al.*, 2022) Esse processo está diretamente associado a capacidade de liberação iônica (cálcio, fosfato e flúor) e neutralização do meio (CALUWÉ *et al.*, 2017). Estudos *in vitro* mostram que esses íons podem formar hidroxiapatita e remineralizar lesões de esmalte e dentina (PROENÇA *et al.*, 2020; SKRTIC *et al.*, 1996). Quando liberados em baixo pH, podem ajudar a prevenir a desmineralização das estruturas dentárias (XU; WEIR; SUN, 2009). Nesse estudo, todos os CIVs investigados apresentaram liberação de cálcio e fosfato. Em pH4, o CIV Ionglass apresentou valores de liberação de íons cálcio maiores que os demais grupos e o Vitro Fill obteve os melhores resultados para íons fosfato. A formação de precipitados precursores de hidroxiapatita foi avaliada das análises de MEV/EDS, FTIR-ATR e DRX como recomendada por Fernando *et al.* (2017). As análises de MEV/EDS apontaram a presença de precipitados contendo cálcio e fosfato na superfície de todos os CIVs testados, além de outros elementos oriundos da própria composição do material.

Já as análises de FTIR mostraram a presença apenas ligações de carbonato ($1080\text{cm}^{-1}/1413/1453\text{cm}^{-1}$). Por outro lado, as análises de DRX apontaram para um comportamento amorfo do material, sem a presença de picos cristalinos nanoprecursores de hidroxiapatita em nenhum dos cimentos de ionômero de vidro testados o que indica a ausência de bioatividade dos materiais de acordo com Fernando *et al.* (2017) e Zamparini *et al.* (2019). Esses resultados podem ser explicados pela acidificação do meio ocasionada pelos CIVs, como

apontam os dados de pH. O estudo de Proença *et al.* (2020) demonstra que o pH mais adequado para favorecer a precipitação de minerais precursores de hidroxiapatita varia entre 8 e 10.

Adicionalmente a capacidade de indução a formação de precipitados, um material bioativo deve interagir com tecidos vivos sem causar efeitos adversos (COSTA *et al.*, 2014) Um pH menos agressivo ou básico, torna viável o uso do material em cavidades muito profundas (XIE *et al.*, 2008) Os CIVs apresentam pH relativamente baixo nas primeiras horas devido à liberação de ácidos (MORAES *et al.*, 2021). No trabalho de Smith e Ruse (1986), os cimentos de ionômero de vidro apresentaram pH ácido de forma imediata podendo isso ser esse o principal fator contribuinte para a irritação pulpar. Nossos achados mostram que a acidez do pH ficou crítica nas primeiras horas para todos os CIVs sendo a causa sugestiva do resultado citotóxico apresentado por todos os materiais em 72hrs, além da alta liberação de íons que podem causar algum dano celular.

Ainda sobre a biocompatibilidade, o estudo *in vitro de* Soheili Majd, Goldberg e Stanislawski (2003) demonstra que a citotoxicidade de alguns CIVs podem ser atribuído a presença de alumínio e/ou ferro em sua composição. Os materiais avaliados em nosso estudo possuem em sua a composição, alumínio, bário, silício, estrôncio e magnésio. De acordo com Costa *et al.* (2003), os componentes metálicos de alguns biomateriais restauradores podem causar efeitos citotóxicos em células.

O efeito antibacteriano dos CIVs já foi relatado anteriormente (WIEGAND; BUCHALLA; ATTIN, 2007), acredita-se que o flúor liberado por este material possui um efeito antimicrobiano (HAFSHEJANI *et al.*, 2017) e a acidez do meio provocado pela queda do pH torna o ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano (SPEZZIA, 2017). Moreau e Xu (2010) mostram que os CIVs possuem uma maior liberação de F⁻ em pH 4 quando comparado ao pH7 o que se caracteriza como um comportamento inteligente tendo em vista que há uma maior liberação de F⁻ quando o pH for reduzido para a faixa cariogênica.

No presente estudo, o CIV Bioglass apresentou o maior valor referente a liberação de flúor em pH4 se assemelhando aos resultados supracitados, no entanto, os resultados da atividade antibacteriana mostram que os CIVs aqui testados não foram capazes de neutralizar o meio rico em bactérias o que corrobora com os achados de Caluwé *et al.* (2017) que mostram que a quantidade de flúor liberado pelos CIVs não é o suficiente para interferir na enzima enolase, que regula a via glicolítica do metabolismo celular das bactérias associadas à cárie.

Os resultados clínicos dos CIVs apresentados por alguns estudos podem ser justificados pelos nossos achados. Segundo Raggio *et al.* (2016) há um percentual maior de falhas em restaurações com a técnica de tratamento restaurador atraumático (ART) quando ela

foi realizada com CIV e a principal causa da necessidade de substituição do material restaurador são o aparecimento de novas cáries. Adicionalmente, uma revisão sistemática de estudos clínicos não revela nenhuma evidência conclusiva sobre seu efeito inibidor de cárie pelos CIVs (RANDALL; WILSON, 1999) e o ensaio clínico de Corralo e Maltz (2013) sugere que os CIVs não são superiores a materiais inertes quando se avalia o sucesso do tratamento restaurador. Os resultados do presente estudo mostram que os cimentos testados apresentam apenas a capacidade de liberar íons, sem o controle do pH, ausência de formação de precipitados e atividade antibacteriana, além de apresentar um comportamento citotóxico.

Com base no exposto, é necessário uma busca contínua pelo desenvolvimento de materiais que englobem o novo conceito de bioatividade proposto por Darvell (2021), Ferracane e Bertassoni (2021) e Giannini (2021) com o intuito de compensar as limitações do material aqui demonstradas e prolongar a vida útil da restauração.

5 CONCLUSÃO

Os CIVs apresentam liberação de íons importante para a remineralização. Entretanto, o seu baixo pH, citotoxicidade, ausência de atividade antibacteriana e a não formação de precipitados precursores de hidroxiapatita indicam que os CIVs não são materiais bioativos.

REFERÊNCIAS

- ANA, I. D. *et al.* Effects of added bioactive glass on the setting and mechanical properties of resin-modified glass ionomer cement. **Biomaterials**, Guilford, v. 24, p. 18, p. 3061-3070, 2003.
- BALBINOT, G. de S. *et al.* Niobium containing bioactive glasses as remineralizing filler for adhesive resins. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 36, n. 2, p. 221-228, 2020.
- BARAS, B. H *et al.* Novel endodontic sealer with dual strategies of dimethylaminohexadecyl methacrylate and nanoparticles of silver to inhibit root canal biofilms. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 35, n. 8, p. 1117-1129, 2019.
- BAUER, J. *et al.* Dentin pretreatment with 45S5 and niobophosphate bioactive glass: effects on pH, antibacterial, mechanical properties of the interface and microtensile bond strength. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 90, p. 374-380, 2019.

- BIANCHI, L. *et al.* Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblast-like cells. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 101, n. 8, p. 1498-1507, 2013.
- BRAGA, R. R. Calcium phosphates as ion-releasing fillers in restorative resin-based materials. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 3-14, 2019.
- BRAGA, R. R.; FRONZA, B. M. The use of bioactive particles and biomimetic analogues for increasing the longevity of resin-dentin interfaces: A literature review. **Dental Materials Journal**, Tokyo, v. 9, n. 1, p. 62-68, 2020.
- CALDAS, I. P. *et al.* In vitro cytotoxicity of dental adhesives: a systematic review. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 35, n. 2, p. 195-205, 2019.
- CALUWÉ, T. *et al.* Addition of bioactive glass to glass ionomer cements: effect on the physicochemical properties and biocompatibility. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 33, p. e186-e203, 2017.
- CARNEIRO, K. K. *et al.* Bioactivity and properties of an adhesive system functionalized with an experimental niobium-based glass. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 78, p. 188-195, 2018.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Effect of airborne-particle abrasion on dentin with experimental niobophosphate bioactive glass on the microtensile bond strength of resin cements. **Journal of Prosthodontic Research**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 129-135, 2015.
- CORRALO, D. J.; MALTZ, A. M. Clinical and ultrastructural effects of different liners/restorative materials on deep carious dentin: a randomized clinical trial. **Caries Research**, Basel, v. 47, n. 3, p. 243-250, 2013.
- COSTA OLIVEIRA, B. E.; CURY, J. A.; RICOMINI FILHO, A. P. Biofilm extracellular polysaccharides degradation during starvation and enamel demineralization. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. e0181168, 2017.
- COSTA, C. A. S. *et al.* In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. **Biomaterials**, Guilford, v. 24, n. 21, p. 3853-3858, 2003.
- COSTA, C. A. S. *et al.* Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 30, n. 7, p. 769-784, 2014.
- DARVELL, B. W. Bioactivity: symphony or cacophony? A personal view of a tangled field. **Prosthesis**, São José dos Pinhais, v. 3, p. 75-84, 2021.
- FERNANDO, D. *et al.* Bioactive glass for dentin remineralization: a systematic review. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 76, p. 1369-1377, 2017.

FERRACANE, J. L.; BERTASSONI, L. E. Interface between materials and oral biology. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 100, n. 10, p. 1009-1010, 2021.

GIANNINI, M. "Bioactivity" in restorative dentistry: standing for the use of innovative materials to improve the longevity of restorations in routine dental practice. **The Journal of Adhesive Dentistry**, New Malden, v. 23, n. 2, p. 176-178, 2021.

HAFSHEJANI, T. M. *et al.* Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 262, p. 317-328, 2017.

KARIMI, A. Z.; REZABEIGI, E.; DREW, R. A. L. Glass ionomer cements with enhanced mechanical and remineralizing properties containing 45S5 bioglass-ceramic particles. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Amsterdam, v. 97, p. 396-405, 2019.

KHOROUSHI, M.; KESHANI, F. A review of glass-ionomers: From conventional glass-ionomer to bioactive glass-ionomer. **Dental Research Journal**, Isfahan, v. 10, n. 4, p. 411-420, 2013.

MAKANJUOLA, J. O. *et al.* A new hydrolytic route to an experimental glass for use in bioactive glass-ionomer cement. **Journal of Materials Research and Technology**, [S. l.], v. 18, p. 2013-2024, 2022.

MAKOWSKI, G. S.; RAMSBY, M. L. Differential effect of calcium phosphate and calcium pyrophosphate on binding of matrix metalloproteinases to fibrin: comparison to a fibrin-binding protease from inflammatory joint fluids. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 136, n. 1, p. 176-187, 2004.

MORAES, J. F. *et al.* Formation of hydroxyapatite nanoprecursors by the addition of bioactive particles in resin-modified glass ionomer cements. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, Oxford, v. 110, p. 102933, 2021.

MOREAU, J. L.; XU, H. H. K. Fluoride releasing restorative materials: effects of pH on mechanical properties and ion release. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 26, n. 11, p. e227-e235, 2010.

OSORIO, E. *et al.* A novel bioactive agent improves adhesion of resin-modified glass-ionomer to dentin. **Journal of Adhesion Science and Technology**, Utrecht, v. 29, b. 15, p. 1543-1552, 2015.

PAN, H. *et al.* Apatite-formation ability: Predictor of "bioactivity"? **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 6, n. 11, p.4181-4188, 2010.

PROENÇA, M. A. M. *et al.* Orthodontic resin containing bioactive glass: preparation, physicochemical characterization, antimicrobial activity, bioactivity and bonding to enamel. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, New York, v. 99, p. 102575, 2020.

RAGGIO, D. P. *et al.* Do glass ionomer cements prevent caries lesions in margins of restorations in primary teeth? **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 147, n. 3, p. 177-185, 2016.

RANDALL, R. C.; WILSON, N. H. Glass-ionomer restoratives: a systematic review of a secondary caries treatment effect. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 78, n. 2, p. 628-637, 1999.

SIDHU, H. K.; NICHOLSON, J. W. A review of glass-ionomer cements for clinical dentistry. **Journal of Functional Biomaterials**, Basel, v. 7, n. 3, p. 16, 2016.

SKALLEVOLD, H. E. *et al.* Bioactive glass applications in dentistry. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 23, p. 5960, 2019.

SKRTIC, D. *et al.* Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate/methacrylate composites in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 75, n. 9, p. 679-686, 1996.

SMITH, D. C.; RUSE, D. Acidity of glass ionomer cements during setting and its relation to pulp sensitivity. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 112, n. 5, p. 654-657, 1986.

SOHEILI MAJD, E.; GOLDBERG, M.; STANISLAWSKI, L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. **Biomaterials**, Guilford, v. 24, n. 1, p. 3-9, 2003.

SONARKAR, S.; PURBA, R. Bioactive materials in conservative dentistry. **International Journal of Contemporary Dental and Medical Reviews**, [S. l.], v. 2015, p. 1-4, 2015.

SPAGNUOLO, G. Bioactive dental materials: the current status. **Materials**, Basel, v. 15, n. 6, 2016.

SPEZZIA, S. Cimento de ionômero de vidro: revisão de literatura. **Journal of Oral Investigations**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 74-88, 2017.

WIEGAND, A.; BUCHALLA, W.; ATTIN, T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 23, n. 3, p. 343-362, 2007.

WILSON, A. D.; KENT, B. E. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. **British Dental Journal**, London, v. 132, n. 4, p. 133-135, 1972.

XIE, D. *et al.* Bioactive glass-ionomer cement with potential therapeutic function to dentin capping mineralization. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 116, n. 5, p. 479-487, 2008.

XU, H. H. K.; WEIR, M. D.; SUN, L. Calcium and phosphate ion releasing composite: effect of pH on release and mechanical properties. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 25, n. 4, p. 535-542, 2009.

YLI-URPO, H. *et al.* Release of silica, calcium, phosphorus, and fluoride from glass ionomer cement containing bioactive glass. **Journal of Biomaterials Applications**, Lancaster, v. 19, n. 1, p. 5-20, 2004.

ZAMPARINI, F. *et al.* Properties of calcium silicate-monobasic calcium phosphate materials for endodontics containing tantalum pentoxide and zirconium oxide. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 23, n. 1, p. 445-457, 2019.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na odontologia moderna, há um grande interesse na aplicação de materiais bioativos para fins restauradores, no entanto, ainda há controvérsias na literatura sobre a determinação da bioatividade. Nosso trabalho mostra que para ser bioativo, além da capacidade de um material em formar cristais de hidroxiapatita em sua superfície, é necessário que eles interajam com células/tecidos vivos, provocando uma resposta positiva. O presente estudo fornece evidências de que o CIV pode não ser um material bioativo. Reforçamos a necessidade de mais estudos para esclarecer e/ou potencializar essa propriedade dos CIVs.

REFERÊNCIAS

- AKMAN, H.; TOSUN, G. Clinical evaluation of bulk-fill resins and glass ionomer restorative materials: a 1-year follow-up randomized clinical trial in children. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, Lagos, v. 23, n. 4, p. 489-497, 2020.
- CALUWÉ, T. *et al.* Addition of bioactive glass to glass ionomer cements: effect on the physicochemical properties and biocompatibility. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 33, p. e186-e203, 2017.
- CHING, H. S. *et al.* Modification of glass ionomer cements on their physical mechanical and antimicrobial properties. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, Hamilton, v. 30, n. 6, p. 557-571, 2018.
- CURY, J. A. *et al.* Are fluoride-releasing dental materials clinically effective in controlling caries? **Dental Materials**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 323-333, 2015.
- DARVELL, B. W. Bioactivity: symphony or cacophony? A personal view of a tangled field. **Prosthesis**, London, v. 3, n. 1, p. 75-84, 2021.
- ERSIN, N. K. *et al.* A clinical evaluation of resin-based composite and glass ionomer cement restorations placed in primary teeth using the ART approach Results at 24 months. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 137, n. 11, p. 1529-1536, 2006.
- FARRUGIA, C.; CAMILLERI, J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements: a literature review. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. e89-e90, 2015.
- FERRACANE, J. L.; BERTASSONI, L. E. Interface between materials and oral biology. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 100, n. 10, p. 1009-1010, 2021.
- GIANNINI, M. "Bioactivity" in restorative dentistry: standing for the use of innovative materials to improve the longevity of restorations in routine dental practice. **The Journal of Adhesive Dentistry**, New Malden, v. 23, n. 2, p. 176-178, 2021.
- HAFSHEJANI, T. M. *et al.* Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 262, p. 317-328, 2017.
- HAMDY, T. M. Bioactivity: a new buzz in dental materials. **EC Dental Science**, [S. l.], v. 17, n. 8, 2018.
- HYUN-JUNG, K. *et al.* Effects of bioactive glass incorporation into glass ionomer cement on demineralized dentin. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 7016, 2021.
- KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, [S. l.], v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006.

- LOPES, C. M. C. F. *et al.* Randomized clinical trial of art class ii restorations using two glass ionomer cements: one-year follow-up. **Pediatric Dentistry**, Chicago, v. 40, n. 2, p. 98-104, 2018.
- MAKANJUOLA, J. O. *et al.* A new hydrolytic route to an experimental glass for use in bioactive glass-ionomer cement. **Journal of Materials Research and Technology**, [S. l.], v. 18, p. 2013-2024, 2022.
- MORAES, J. F. *et al.* Formation of hydroxyapatite nanoprecursors by the addition of bioactive particles in resin-modified glass ionomer cements. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, Oxford, v. 110, p. 102933, 2021.
- PAN, H. *et al.* Apatite-formation ability: Predictor of “bioactivity”? **Acta Biomaterialia**, Kidlington, v. 6, n. 11, p. 4181-4188, 2010.
- PIRES, P. M. *et al.* Assessment of the remineralisation induced by contemporary ion-releasing materials in mineral-depleted dentine. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 26, n. 10, p. 6195-6207, 2022.
- RAGGIO, D. P. *et al.* Do glass ionomer cements prevent caries lesions in margins of restorations in primary teeth? **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 147, n. 3, p. 177-185, 2016.
- RANDALL, R. C.; WILSON, N. H. Glass-ionomer restoratives: a systematic review of a secondary caries treatment effect. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 78, n. 2, p. 628-637, 1999.
- ROSA, W. L. O. *et al.* Is a calcium hydroxide liner necessary in the treatment of deep caries lesions? A systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 588-603, 2019.
- SIDHU, H. K.; NICHOLSON, J. W. A review of glass-ionomer cements for clinical dentistry. **Journal of Functional Biomaterials**, Basel, v. 7, n. 3, p. 16, 2016.
- SKALLEVOLD, H. E. *et al.* Bioactive glass applications in dentistry. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 23, p. 5960, 2019.
- SONARKAR, S.; PURBA, R. Bioactive materials in conservative dentistry. **International Journal of Contemporary Dental and Medical Reviews**, [S. l.], v. 2015, p. 1-4, 2015.
- SPAGNUOLO, G. Bioactive dental materials: the current status. **Materials**, Basel, v. 15, n. 6, 2016.
- SPEZZIA, S. Cimento de ionômero de vidro: revisão de literatura. **Journal of Oral Investigations**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 74-88, 2017.
- VALLITTU, P. K. *et al.* Bioactive dental materials: do they exist and what does bioactivity mean? **Dental Materials**, Copenhagen, v. 34, n. 5, p. 693-694, 2018.

YOSHIHARA, K. *et al.* Bacterial adhesion not inhibited by ion-releasing bioactive glass filler. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 33, n. 6, p. 723-734, 2017.