

RICARDO ANTONIO ALPINO RODRIGUES

**COMPÓSITO ODONTOLÓGICO CARREGADO COM NANOTUBOS DE
CARBONO: *CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS BIOLÓGICOS***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021**

Ricardo Antonio Alpino Rodrigues

**COMPÓSITO ODONTOLÓGICO CARREGADO COM NANOTUBOS DE
CARBONO: *CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS BIOLÓGICOS***

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Ivana M. A. Diniz
Coorientador: Prof. Dr. Allyson Nogueira Moreira

Belo Horizonte
2021

Ficha Catalográfica

R696c Rodrigues, Ricardo Antonio Alpino.
2021 Compósito odontológico carregado com nanotubos de
T carbono: caracterização e ensaios biológicos / Ricardo
Antonio Alpino Rodrigues. -- 2021.

83 f. : il.

Orientadora: Ivana Márcia Alves Diniz.
Coorientador: Allyson Nogueira Moreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Nanotubos de carbono. 2. Materiais dentários. 3.
Polímeros. I. Diniz, Ivana Márcia Alves. II. Moreira,
Allyson Nogueira. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Compósito odontológico carregado com nanotubos de carbono: caracterização e ensaios biológicos

RICARDO ANTONIO ALPINO RODRIGUES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Clínica Odontológica.

Aprovada em 2 de agosto de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Ivana Márcia Alves Diniz – Orientadora
FO-UFMG

Prof(a). Allyson Nogueira Moreira - Coorientador
FO-UFMG

Prof(a). Carolina Bosso Andre
UFMG

Prof(a). Paulo Antônio Martins Júnior
FO-UFMG

Prof(a). Giovani Lana Peixoto de Miranda

Newton Paiva

Prof(a). Rosângela Maria Ferreira da Costa e Silva
Universidade Federal da Fronteira Sul

Belo Horizonte, 2 de agosto de 2021.

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em ___/___/2021.

Profa. Isabela Almeida Pordus
Coordenadora

Dedico esse trabalho a meus pais pelo esforço que sempre fizeram para que eu tivesse uma boa educação.

AGRADECIMENTO

A Deus, por me dar o dom da vida e iluminar meus caminhos, permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus amados pais Antônio e Nazaré, pela minha criação, sempre me ensinando os valores da vida, como honestidade, bom caráter e retidão... Amo vocês.

A toda minha família, pelo apoio e incentivo para seguir esse caminho, sempre entusiasmados com meus projetos pessoais e profissionais.

A todos os meus amigos que me apoiaram e tornaram mais leves alguns momentos de cansaço.

À Professora Ivana Márcia A. Diniz, que mesmo assumindo uma orientação em andamento, soube se adequar a um tema talvez desafiador para ela e acrescentar muito ao que estava previsto no projeto. Além de me cobrar nas horas oportunas para que o trabalho caminhasse.

Ao professor Allyson Nogueira Moreira, pela coorientação da pesquisa e por sempre estar apoiando os alunos da área de clínica, tornando mais fácil a logística para o desenvolvimento do trabalho.

À professora Monica Yamauti, que mesmo distante fisicamente, nunca me deixou desamparado, colaborando imensamente com o desenvolvimento da pesquisa, criando parcerias para facilitação do trabalho e também me dando uns “cutucões” para que eu caminhasse.

À professora Cláudia Silami de Magalhães, pela serenidade, incentivo e pelas considerações sempre pertinentes.

Ao professor Augusto Cesar Sette-Dias pela colaboração na execução de parte da pesquisa.

À professora Regina Guenka Palma Dibb, pela permissão ao uso do seu laboratório, além da contribuição na execução e análise de parte da pesquisa.

Aos demais professores da Graduação e da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG, por todas as aulas ministradas e por todos os novos conhecimentos proporcionados.

Aos professores Giovani Lana, Ângela Leão Andrade, Carolina Bosso André, Paulo Antônio Martins, Tatiana Almeida e Thais Yumi por aceitarem conhecer e contribuir com meu trabalho, como banca examinadora da minha defesa.

Ao colegiado de Pós-graduação, pelo empenho e dedicação, fazendo com que tenhamos um programa de excelência.

Aos funcionários do colegiado de pós-graduação, por tornarem a parte burocrática mais leve e fácil de ser cumprida.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, pelo carinho diante das demandas acadêmicas.

À colega Luiza de Almeida Queiroz Ferreira, pela colaboração na execução de parte os experimentos.

Ao colega Erick de Souza Ávila do departamento de física, pela colaboração na execução de parte da pesquisa e pelas orientações a respeito de alguns materiais que até então eram novos para mim.

Aos demais colegas da área de clínica odontológica, pela troca de experiência e o bom convívio durante esses anos.

Ao centro de microscopia da UFMG, que nos prestou seus serviços mesmo em um momento de muita restrição.

Ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas pela disponibilidade em nos atender.

À FAPEMIG, por fornecer recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram ou torceram por mim, deixo aqui minha eterna gratidão.

“Experiência não é o que acontece com um homem; é o que um homem faz com o que lhe acontece.”

Aldous Huxley

RESUMO

Nanotubos de carbono (NTC) são materiais promissores ao melhoramento de compósitos odontológicos. Entretanto, a homogeneização e o comprometimento estético dessas associações ainda são um desafio. Além disso, até o momento, não foram exploradas composições capazes de induzir respostas teciduais endógenas de reparo. Neste sentido, este estudo teve como objetivo incorporar duas concentrações de NTC de paredes múltiplas (NTCPM), *as growth*, numa rede polimérica de metilmetacrilato no intuito de investigar as propriedades químicas, mecânicas e biológicas desse novo biomaterial. Produziu-se uma formulação Bis-GMA e TEGDMA (2:1) com 0%; 0,001%; ou 0,01% de NTCPM. Os compósitos foram caracterizados por meio de termogravimetria, espectroscopia no infravermelho com refletância total atenuada (FTIR-ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV). Testes de compressão, flexão, sorção-solubilidade (norma ISO 4049:2009), estabilidade de cor, grau de conversão, e microdureza foram aplicados aos diferentes grupos experimentais. Finalmente, ensaios antimicrobianos em *S. mutans* (ATCC 25175) (suspensão e biofilme) e ensaios em queratinócitos (HaCat) (citotoxicidade) e pré-osteoblastos (MC3T3) (citotoxicidade/diferenciação) foram utilizados para avaliação de citocompatibilidade e bioatividade. Utilizou-se luz LED (470 nm e 800 mW/cm²) para fotoativar os monômeros. De acordo com ANOVA seguido pelo *post-hoc* de Tukey, adotando um nível de significância de 5%, a resistência à compressão foi significativamente maior no grupo 0,001% (125,66 MPa) que no grupo controle (46,94 MPa). A resistência flexural foi significativamente maior no grupo 0,001% (51,74 MPa) quando comparado ao grupo 0,1%. Não houve variação nos valores de sorção, solubilidade e estabilidade de cor entre os grupos avaliados. O grau de conversão foi menor nos grupos com NTCPM quando comparado com o grupo controle, e a microdureza Knoop menor na concentração 0,001% quando comparada aos demais grupos. O exame superficial mostrou maior formação de aglomerados de nanotubos nas amostras mais concentradas. O grupo contendo 0,001% NTCPM apresentou atividade antibiofilme quando comparado com o grupo controle e 0,01%. Todas as concentrações apresentaram citotoxicidade nas HaCat após 7 dias, mas a incorporação de NTCPM favoreceu a mineralização de MC3T3 em relação ao controle. Concluiu-se que tanto as propriedades mecânicas como as biológicas apresentaram melhoras com a adição de baixa concentração de NTCPM (0,001%). A adição de 0,001% de NTCPM parece promissora para incorporação em compósitos odontológicos.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono. Resina composta. Polímeros.

ABSTRACT

Dental composite loaded with carbon nanotube: characterization and biological tests

Carbon nanotubes (CNT) are candidates for the improvement of dental composites. However, the homogenization and aesthetic commitment of CNT' addition are still a challenge. Moreover, heretofore, there is no study investigating compositions capable of inducing tissue responses towards repair. In this sense, this study aimed to incorporate two concentrations of multiple walls CNT (MWCNT), as growth, in a polymeric network. The chemical, mechanical, and biologicals properties of this experimental biomaterials were assessed. A Bis-GMA and TEGDMA (2:1) base was produced with 0%; 0.001%; or 0.01% MWCNT. The composites were assessed using thermogravimetry, infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR), scanning electron microscopy (SEM), and were also subjected to compression, bending, sorption-solubility tests in accordance with ISO 4049 :2009, color stability, degree of conversion, microhardness and also to antimicrobial assays in *S. aureus* (ATCC 25193) (halo formation), *S. mutans* (ATCC 25175) (biofilm adhesion) and biological assays in keratinocytes (HaCat) (cytotoxicity) and pre-osteoblasts (MC3T3) (differentiation). LED light (470 nm and 800 mW / cm²) was used to light-cure the monomers. According to ANOVA followed by Tukey's post-hoc, adopting a significance level of 5%, the compressive strength was significantly higher for the 0.001% group (125.66 MPa) than control (46.94 MPa). Flexural strength was also more significant in the 0.001% (51.74 MPa) group than the 0.1% group. There was no significant difference in the values of sorption and solubility and color stability between the evaluated groups. The degree of conversion was lower in the groups with NTCPM when compared to the control group, however the Knoop microhardness was higher in the group with the highest concentration of NTCPM and lower in the group with the lowest concentration when compared to the control group. Despite not showing bacterial inhibition halo formation in any of the groups, the groups containing NTCPM showed a decrease in biofilm adhesion when compared to the control group. All groups shown cytotoxicity on HaCat, but the addition of MWCNT favored MC3T3 mineralization over control. It was concluded that both mechanical and biological properties improved with the addition of low concentration of MWCNT (0.001%). The addition of 0.001% MWCNT looks promising for incorporation in dental composites.

Keywords: Carbon nanotubes. Composite resin. Polymers.

LISTA DE FIGURAS

METODOLOGIA EXPANDIDA

FIGURA 1.	Aspecto da coloração dos corpos-de-prova.....	22
FIGURA 2.	Trituração do corpo-de.prova.....	23
FIGURA 3.	Ensaio de compressão.....	25
FIGURA 4.	Ensaio de flexão.....	26

ARTIGO 1

FIGURA 1.	Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
FIGURA 2.	Citotoxicidade e viabilidade celular.....	48

ARTIGO 2

FIGURA 1.	Análise termogravimétrica.....	61
FIGURA 2.	Microscopia Eletrônica de Varredura e Atividade antimicrobiana	62
FIGURA 3.	Citotoxicidade e bioatividade.....	64

LISTA DE TABELAS

METODOLOGIA EXPANDIDA

TABELA 1.	Materiais utilizados.....	20
-----------	---------------------------	----

ARTIGO 1

TABELA 1.	Materiais utilizados.....	38
-----------	---------------------------	----

TABELA 2.	Resistência à compressão e resistência flexural.....	43
-----------	--	----

TABELA 3.	Grau de conversão e microdureza Knoop.....	44
-----------	--	----

TABELA 4.	Sorção e Solubilidade.....	45
-----------	----------------------------	----

ARTIGO 2

TABELA 1.	Materiais utilizados.....	56
-----------	---------------------------	----

TABELA 2.	Estabilidade de cor.....	65
-----------	--------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BisGMA	Bisfenol A dimetil metacrilato
TEGDMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
UDMA	Metacrilato de dimetil uretano
BisEMA	Metacrilato etoxilado de bisfenol A
NTC	Nanotubo de carbono
NTCPS	Nanotubos de carbono de parede simples
NTCPM	Nanotubos de carbono paredes múltiplas
DQV	Deposição química por vapor
DMAEMA	Dimetilamino etil metacrilato
LED	Diodo Emissor de Luz
RC	Resistência à compressão
RF	Resistência flexural
Mf	Módulo de elasticidade em flexão
MTT	Metiltetrazólio
PVC	Policloreto de vinila
LDH	Lactato desidrogenase
ANOVA	Análise de variância
FTIR	Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier
ATR	Refletância total atenuada
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	METODOLOGIA EXPANDIDA.....	19
3.1	Delineamento experimental.....	19
3.2	Tamanho da amostra.....	19
3.3	Materiais utilizados.....	19
3.4	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM).....	20
3.5	Manipulação dos polímeros.....	20
3.5.1	Estudos preliminares	21
3.6	Caracterização dos compósitos.....	22
3.6.1	Termogravimetria.....	22
3.6.2	Espectroscopia com refletância total atenuada.....	23
3.6.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	23
3.7	Ensaio mecânicos.....	24
3.7.1	Teste de resistência à compressão e módulo de elasticidade.....	24
3.7.2	Teste de resistência à flexão e módulo flexural.....	25
3.8	Teste de sorção e solubilidade.....	26
3.9	Teste de atividade antibacteriana.....	27

3.9.1	Crescimento bacteriano e inóculo.....	27
3.9.2	Atividade antibiofilme nas superfícies do disco.....	27
3.10	Testes celulares.....	28
3.10.1	Cultura de células.....	28
3.10.2	Obtenção dos meios condicionados com os polímeros.....	29
3.10.3	Citotoxicidade.....	29
3.10.4	Ensaio de integridade da membrana.....	29
3.10.5	<i>Live and Dead</i>	30
3.10.6	Ensaio de Mineralização nas MC3T3.....	30
3.11	Grau de conversão dos monômeros.....	31
3.12	Microdureza Knoop.....	31
3.13	Estabilidade de cor.....	32
3.14	Análise estatística.....	33
4	ARTIGOS	34
4.1	ARTIGO 1.....	35
4.2	ARTIGO 2.....	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE	82

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A evolução dos compósitos resinosos teve grande destaque na década de 50, quando BUONOCORE (1955) mostrou ao mundo a técnica do condicionamento ácido do esmalte, melhorando a adesão à estrutura dental. Já em 1956, BOWEN introduziu o Bis-GMA que melhorou as propriedades das resinas compostas, ampliando a sua indicação. Na verdade, a composição das resinas compostas foto polimerizáveis é basicamente de uma matriz orgânica, partículas inorgânicas, agente de união (silano), sistema foto iniciador, inibidores e pigmentos corantes (PEUTZFELT, 1997; SCHMALZ *et al.*, 2009).

O BisGMA é o monômero base utilizado na maioria dos compósitos resinosos comerciais. Sua alta viscosidade ($\eta = 1369$ Pa.s) torna necessária a associação com monômeros de menor peso molecular (diluentes) para possibilitar a incorporação dos iniciadores, inibidores e partículas de carga (RUEGGERBERG, 2002). O TEGDMA (trietilenoglicol dimetacrilato) ($\eta = 0,05$ Pa.s) é o diluente mais utilizado (DICKENS *et al.*, 2003; SIDERIDOU; TSERKI; PAPANASTASIOU, 2002). Entretanto, seu baixo peso molecular aumenta a contração de polimerização da mistura (ATAI; WATTS, 2006; DEWAELE *et al.*, 2006; FLOYD; DICKENS, 2006). Por este motivo, outros monômeros de baixa viscosidade, porém com alto peso molecular, como o UDMA (metacrilato de dimetil uretano) e o BisEMA (metacrilato etoxilado de bisfenol A) vêm sendo incorporados em diversas formulações comerciais.

A fração de partículas de carga na resina composta melhora algumas propriedades como resistência à compressão, resistência à tração, módulo de elasticidade e principalmente a resistência à abrasão (FERRACANE, 2011). Além disso, o aumento da fração de partículas também propicia menor contração de polimerização, uma vez que, a contração de polimerização depende somente da porção orgânica do material (BEUN *et al.*, 2007). Por outro lado, a ausência ou menor quantidade de partículas de carga permite maior formação de ligações cruzadas dentro do polímero (FERRACANE, 2011). O maior grau de conversão do polímero é importante para a estabilidade da rede polimérica e contribui para menor eluição de monômeros livres passíveis de contaminação do microambiente bucal (O'Brien *et al.*, 2014; Kwon *et al.*, 2015; Davydenko *et al.*, 2018; Pagano *et al.* 2019).

Classicamente, materiais dentários restauradores não são produzidos para induzir respostas teciduais dos dentes. Entretanto, nos últimos cinco anos, vários estudos vêm investigando a melhora das propriedades antimicrobianas e a bioatividade dos materiais odontológicos utilizando, particularmente, nanotecnologias (MAKVANDI *et al.* 2020, MARTINS-JR, 2013). Os nanotubos de carbono (NTC), por exemplo, embora apresentem uma história recente (cerca de 25 anos), têm gerado biomateriais promissores para enxertos ósseos (MARTINS-JR, 2013; VALVERDE *et al.*, 2016). Grande parte da literatura atribui a descoberta destes materiais a Sumio Iijima do NEC's *Fundamental Research Laboratory*. Em 1992, foi conduzida a primeira produção macroscópica de NTC, tendo-se criado nanotubos de parede simples (NTCPS) e nanotubos de paredes múltiplas (NTCPM) pelo método de descarga de arco (EBBESSEN e AJAYAN, 1992). Em 1993, foram criados NTC pelo método de deposição química por vapor (DQV). Neste método, um substrato preparado com uma camada de partículas metálicas catalíticas é aquecido até cerca de 700°C na presença de um gás carbônico, como o acetileno, etileno ou o metano. À medida que o gás se decompõe, libera os átomos de carbono que se recombina e reorganizam na forma de NTC (YACAMÁN *et al.*, 1993). A esses NTC dá-se o nome de *as growth*, ou seja, nanotubos na sua forma nativa.

Os NTC são os materiais mais resistentes e mais rígidos atualmente conhecidos (MAKAR E BEAUDOIN, 2004). Estes materiais são alótropos do carbono de nanoestrutura cilíndrica com relações comprimento/diâmetro que podem atingir valores superiores a 100.000.000:1, maior ao de qualquer outro material conhecido (WANG *et al.* 2009). Morfologicamente, os NTC são pequenas estruturas ocas e alongadas constituídas por paredes enroladas de grafeno com a espessura de um átomo de carbono e de configuração hexagonal similar a uma “rede de galinheiro” ou aos “favos de mel de uma colmeia” (JABEEN *et al.*, 2015; MARTINS-JR *et al.* 2013). Os átomos de carbono estão interligados na rede por ligações covalentes do tipo sp^2 , dotando os NTC de propriedades resistentes excepcionais.

A ligação carbono-carbono é uma das mais fortes encontradas na natureza. Portanto, estas estruturas desfrutam de uma elevada resistência e de uma leveza extraordinária, sendo na teoria cerca de cem vezes mais resistentes e seis vezes mais

leves do que o aço, dado possuírem uma estrutura idealizada composta por átomos de carbono (MARCONDES *et al.*, 2010). Os NTP podem ser entendidos como uma folha de grafeno enrolada em forma de cilindro, enquanto os NTPMs são constituídos por cilindros de grafeno concêntricos. Os NTPSs são mais difíceis serem sintetizados, o que aumenta o seu custo de produção e impede que sejam aplicados em grande escala. Além disso, os NTPMs apresentam melhores propriedades que os NTPSs (NIESSEN, 2006).

As pesquisas com NTC têm sido extremamente amplas e diversificadas, possibilitando vários tipos de aplicações em áreas como a engenharia de materiais, química, eletrônica, medicina e odontologia (ARAÚJO, 2010; MUNK *et al.*, 2016; PRASHANTHA *et al.*, 2013; TONELLI *et al.*, 2015). O uso dos nanotubos tem se voltado particularmente para a descontaminação de solos e produtos alimentícios que contêm produtos tóxicos (DURSUN *et al.* 2016; LIU *et al.*, 2018; TAVENGWA *et al.*, 2016). De fato, o crescente interesse em investigar nanotubos de carbono se deve às suas propriedades físicas e químicas, tais como grande área de superfície e suas excelentes propriedades termomecânicas, as quais possibilitam sua aplicação em sensores e até novos biomateriais aplicados à reconstrução de tecidos (LEE *et al.*, 2011; MARTINS-JR *et al.*, 2013; WEISS *et al.*, 2007).

A incorporação de nanotubos de carbono em polímeros já produziu compósitos com propriedades mecânicas e biológicas diferenciadas (BORGES *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2018, MAKVANDI *et al.* 2020; TURAGAM, PRASAD MUDRAKOLA, 2013; WANG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.* 2007). Devido a essas mudanças físicas, o uso destes compósitos tem aumentado nas últimas décadas com a incorporação de nanoestruturas em matrizes biológicas naturais ou sintéticas (ABARRATEGI, *et al* 2008; ZHANG, *et al*, 2006). Entretanto, um desafio no desenvolvimento desses novos polímeros odontológicos utilizando NTC é produzir a dispersão homogênea dos nanotubos nesta rede polimérica (ZHANG *et al.*, 2007). Usualmente, para melhorar essa dispersão, os processos de funcionalização química ou carboxilação podem ser utilizados, modificando a estrutura nativa para uma superfície mais reativa (KRUPKE, *et al.*, 2003; TISIS, *et al.* 2006). Por outro lado, esses processos encarecem a produção da nanotecnologia. Outro desafio é a identificação das quantidades de NTC capazes de produzir resultados favoráveis ao mesmo tempo que não comprometam a estética da matriz polimérica.

A utilização dos NTC *as growth* em concentrações abaixo de 0,1% nunca foi explorada em polímeros odontológicos. Essa estratégia poderia melhorar a dispersão dos NTC na rede polimérica e reduzir a formação de aglomerados de nanotubos, os quais podem enfraquecer as propriedades mecânicas do material (LI, *et al.* 2014). A incorporação de NTC *as growth* nesses polímeros poderia resultar em um biomaterial de baixo custo com propriedades físicas e mecânicas satisfatórias, antimicrobianas, além de propriedades indutoras de resposta tecidual. Neste sentido, este estudo teve como objetivo incorporar NTC na sua forma nativa em compósitos a fim de investigar as propriedades químicas, mecânicas e biológicas desse novo biomaterial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar um polímero odontológico de baixo custo contendo nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir polímeros com diferentes micro concentrações de nanotubos de carbono
- Caracterizar fisicoquimicamente a incorporação de nanotubos de carbono em um polímero odontológico, por meio de termogravimetria, grau de conversão e microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar as propriedades mecânicas de um polímero odontológico contendo nanotubos de carbono, por meios dos ensaios de compressão, flexão e microdureza knoop.
- Avaliar as propriedades ópticas por meio do ensaio de estabilidade de cor.
- Analisar o comportamento biológico do compósito, por meios de ensaios microbianos (*S. mutans*) e em cultura de células epiteliais e mesenquimais (HaCat e MC3T3, respectivamente).

3. METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Delineamento experimental

Foi realizado um estudo experimental *in vitro*, cujas variáveis independentes foram as diferentes concentrações de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) incorporados na formulação de um polímero à base de metacrilatos em dois níveis: 0,001% e 0,01%. Além destes, foi definido um grupo controle sem a adição de NTCPM, totalizando assim três grupos experimentais.

As variáveis dependentes analisadas foram: resistência à compressão e o módulo de Young, resistência à flexão e o módulo flexural, grau de conversão, microdureza Knoop, sorção e solubilidade dos compósitos em meio aquoso, atividade antimicrobiana (formação de halo), crescimento bacteriano superficial, estabilidade de cor, citotoxicidade e diferenciação celular, além da caracterização dos compósitos por meio de termogravimetria, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho com refletância total atenuada.

3.2 Tamanho da amostra

Para se testar estatisticamente as hipóteses nulas, o tamanho da amostra foi definido de acordo com a norma internacional (ISO 4049:2009) que trata dos polímeros odontológicos.

Com o objetivo de evitar vieses entre as condições do experimento, foi realizada uma randomização bloqueada, em que um espécime de cada grupo foi alocado de forma aleatória para a sua confecção e execução dos ensaios. Esse sorteio foi realizado através do site [www.sorteador.com.br].

3.3 Materiais utilizados

A descrição dos materiais, formulação, peso molecular e fabricante estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos materiais utilizados

MATERIAL	FÓRMULA	PESO MOLECULAR	FABRICANTE
Bis-GMA	C ₂₉ H ₃₆ O ₈	512.59 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA
TEGDMA	C ₁₄ H ₂₂ O ₆	286.32 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA
Canforoquinona	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166.22 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA
EDMAB	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.24 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA
Ácido nítrico	HNO ₃	63.01 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98.08 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA
Nanotubos de carbono	C	12.0 g/mol	Sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física (ICEX/UFMG)

Dados fornecidos pelos fabricantes

3.4 Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM)

Os NTCPM foram doados pelo Centro de Tecnologia em Nanotubos da UFMG (CTNano) da Universidade Federal de Minas Gerais. Os NTCPM foram produzidos por meio da técnica de deposição química em fase vapor (DQV), utilizando-se metais de transição como catalisadores e etileno como precursor de carbono (JAURIS *et al.*, 2011). No processo de crescimento, as principais variáveis controladas foram a quantidade de hidrocarbonetos e catalisadores (metais como Fe, Ni e Co) envolvidos, a temperatura de termodecomposição desses hidrocarbonetos, a morfologia e forma de impregnação das matrizes com os catalisadores.

3.5 Manipulação dos compósitos

3.5.1 Estudos preliminares

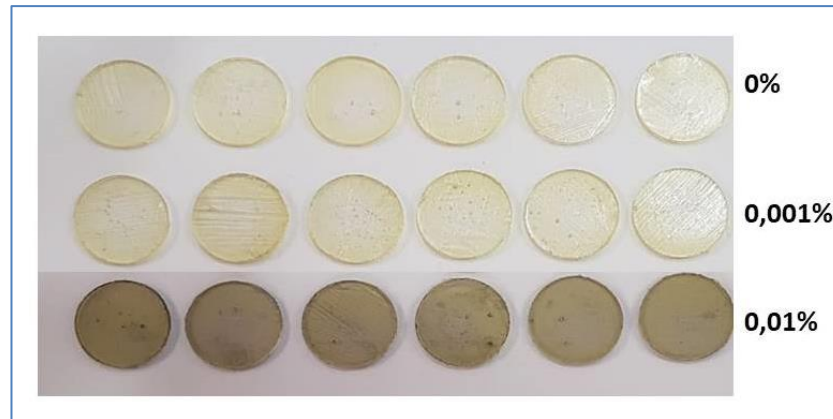
Como não havia na literatura dados a respeito da concentração de NTCPM as *growth* em polímeros de metilmetacrilato, decidiu-se junto ao pessoal do laboratório de nanomateriais do Departamento de Física da UFMG, a manipulação arbitrária dos polímeros nas seguintes concentrações de nanotubos: 0,1; 0,3 e 0,5%.

A matriz orgânica foi preparada com bisfenol A glicidil metacrilato (BisGMA) e trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) na proporção 2:1 em mols. O fotoiniciador canforoquinona e o co-iniciador dimetilamino etil metacrilato (DMAEMA), foram adicionados na concentração 0,5% (p/p) cada um. Inicialmente, diferentes concentrações de nanotubos de carbono foram adicionadas ao TEGDMA e submetidas à sonificação por 4 min para dispersão das nanopartículas. Além destes, foi definido um grupo controle sem a adição de NTC. Em seguida o BisGMA foi adicionado ao TEGDMA e misturado com o auxílio de uma espátula de madeira até se obter uma mistura homogênea. Finalmente, o iniciador e co-iniciador foram adicionados e o compósito foi armazenado em vidro âmbar, protegido adicionalmente com papel alumínio, para prevenir fotoativação e armazenado à 4°C.

Durante o processo de fotoativação dos compósitos constatou-se que as concentrações de NTCPM foram muito altas, pois os polímeros ficaram pretos, impedindo a transmissão de luz e bloqueando assim a reação de polimerização. Após a fotoativação, observou-se que o interior do corpo de prova continuava com aspecto líquido e a superfície ficava, no máximo, com aspecto borrachoide.

Diante do ocorrido, decidiu-se diminuir a concentração de NTCPM da amostra, repetindo assim todo o processo, utilizando apenas duas concentrações: 0,001% – e outra dez vezes mais concentrada – 0,01%. Nestas concentrações, os polímeros não adquiriram a cor preta, tendo o de maior concentração um aspecto âmbar (Figura 1).

FIGURA 1 – Aspecto da coloração dos corpos de prova



Fonte: Do autor, 2020.

Para fotoativação dos compósitos em todos os ensaios utilizou-se uma fonte de Diodo Emissor de Luz (LED) Bluephase, (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) com comprimento de onda centrado em 470 nm, região espectral dentro da banda de maior absorção da canforoquinona. A irradiância do equipamento foi de 800 mW/cm², sendo a fotoativação de cada espécime feita por 40 segundos, parâmetros convencionalmente empregados para a cura das resinas comerciais.

3.6 Caracterização dos compósitos

3.6.1 Termogravimetria

Para o preparo da amostra, os compósitos foram fotoativados como descrito anteriormente e após 24h foram particulados utilizando gral e pistilo de porcelana, obtendo assim uma amostra fina e homogênea (Figura 2).

A análise termogravimétrica foi realizada no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas (ICEX) da UFMG. Utilizou-se analisador termogravimétrico (DTG - 60H, Shimadzu, Kioto, Japão) com atmosfera de ar sintético em um quociente de vazão de 50 ml/min e elevação da temperatura até 900 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min. Durante a análise, a variação de massa da

amostra resultante da eliminação de seus componentes foi registrada em função da temperatura.

FIGURA 2 – Trituração do corpo de prova



Fonte: Do autor, 2020.

3.6.2 Espectroscopia com refletância total atenuada

Cinco amostras de cada grupo, assim como do BisGMA, TEGDMA e NTCPM separadamente foram analisadas por meio de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR) para verificar se houve a formação de uma nova fase química nos compósitos ou se os nanotubos de carbono apenas ficaram dispersos na matriz monomérica sem que algum tipo de ligação ocorresse.

Foi utilizado um espectrofotômetro IR Spirit (Shimadzu, Kioto, Honshu, Japão) com ATR Miracle (Pike Technologies, Madison, Wisconsin, EUA). Inicialmente o cristal de ATR foi completamente limpo com álcool isopropílico e uma varredura *background* foi realizada para eliminar qualquer interferência externa na leitura das amostras. Aproximadamente 0,05 mL de cada compósito não polimerizado foram colocados sobre o cristal de ATR e fotoativado por 40s, e então uma varredura foi realizada.

Usando um FTIR software (Spectrum 10, PerkinElmer, Waltham, MA, EUA), um gráfico foi obtido.

3.6.3 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras analisadas foram provenientes do ensaio de flexão, cujos fragmentos foram montados em *stubs* de forma que a superfície fraturada ficasse paralela ao solo e posteriormente coberta por deposição de carbono para que a amostra se tornasse condutora. As análises foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de feixe duplo (Quanta 200, FEI Company, Hillsboro, OR, EUA).

3.7 Ensaaios mecânicos

3.7.1 Testes de resistência à compressão e módulo de elasticidade

Para avaliar a resistência à compressão (RC) e o módulo de Young (de elasticidade) (E), corpos-de-prova foram confeccionados utilizando-se moldes de teflon (n=5 por grupo) sob forma de cilindro com 12,0 mm de altura e 6,0 mm de diâmetro, os quais foram armazenados em água à 36°C por 24h. (CHARBRIER, F. *et al.*, 1999; BRESCIANI, E *et al.*, 2004; YLI-URPO, H., *et al.*, 2005). Os ensaios foram realizados em uma máquina universal de ensaios (EZ-LX Shimadzu, Kioto, Japão) a uma velocidade de 1 mm/min (Figura 3). Para os ensaios de RC, os corpos de prova foram colocados em posição vertical, com força incidente no longo eixo. A resistência à compressão foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$RC = \frac{F}{\pi \cdot r^2}$$

Em que F é a força máxima aplicada (N) e r é a metade do diâmetro do corpo de prova (mm). Os valores de RC foram obtidos em MPa.

O módulo de Young foi calculado na região elástica linear do diagrama tensão-deformação pela seguinte fórmula:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Em que:

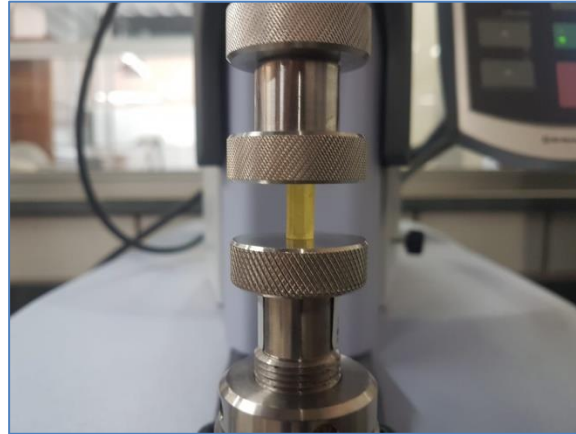
$$\sigma = \frac{F}{A}$$

[σ = tensão; F = força aplicada (N); A = área da seção transversal do corpo de prova (mm²)]

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$$

[ε = deformação uniaxial elástica; Δl = deslocamento na região de deformação elástica (mm); l_0 = comprimento inicial do corpo de prova (mm)].

FIGURA 3 – Corpo de prova posicionado para o teste de compressão



Fonte: Do autor, 2020.

3.7.2 Teste de resistência à flexão e módulo flexural

Para cada grupo experimental, cinco corpos-de-prova foram confeccionados com auxílio de matriz de aço bi-partida nas dimensões 25 ± 2 mm x $2 \pm 0,1$ mm x $2 \pm 0,1$ mm. A fotoativação foi realizada utilizando irradiância e tempo de exposição semelhante aos utilizados nos testes anteriores. Os espécimes foram armazenados a seco, à 36 °C por 24h. O teste de dobramento em três pontos foi realizado em máquina universal de ensaios (EZ-LX Shimadzu, Kioto, Japão), com distância entre os apoios de 20 mm (Figura 4).

A resistência flexural (σ) em megapascal foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\sigma = \frac{3Fl}{2bh^2}$$

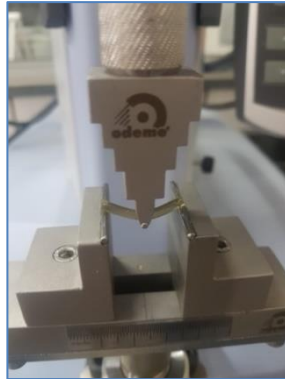
Onde: F é a carga máxima (N) exercida no espécime; l é a distância (mm) entre os apoios; b é a largura (mm) do espécime; h é a altura (mm) do espécime.

O módulo de elasticidade em flexão foi calculado de acordo com o gráfico de carga em função do deslocamento, obtido para cada corpo-de-prova. Os valores compreendidos na porção linear inicial foram utilizados para o cálculo, segundo a fórmula:

$$MF = \frac{C \cdot L^2}{4 \cdot b \cdot h^3 \cdot d} \times 10^{-3}$$

Onde: M_f = módulo de elasticidade em flexão (MPa); C = carga registrada durante a deformação elástica (N); L = distância entre os apoios (mm); b = largura do corpo de prova (mm); h = altura do corpo-de-prova (mm); d = deflexão correspondente a C .

FIGURA 4 – Corpo de prova posicionado nos apoios



Fonte: Do autor, 2020.

3.8 Teste de sorção e solubilidade

Foram preparados cinco corpos-de-prova de cada compósito, na forma de disco, em moldes de $15 \pm 0,1$ mm de diâmetro e $1,0 \pm 0,1$ mm de espessura. Essas amostras foram acondicionadas dentro de pequenos frascos de vidro em estufa à 36 ± 1 °C por 22 h. Em seguida, foram mantidas à 23 ± 1 °C por 2 h e, subsequentemente, pesadas. Este procedimento foi repetido até a obtenção de uma massa constante, denominada m_1 .

As amostras foram então, imersas em água destilada com (pH=7) e mantidas em estufa à 36 ± 1 °C. Após sete dias, as amostras foram removidas da água, lavadas com água corrente, secas rapidamente com papel e pesadas, sem ultrapassar o tempo de 1 minuto desde a remoção da água. A massa obtida, correspondente a cada medida foi denominada m_2 .

Em seguida, as amostras foram colocadas novamente na estufa 36 ± 1 °C por 24 h, na sequência foram mantidas à 23 ± 1 °C por 1 h e, subsequentemente, pesadas. Este procedimento foi repetido até a obtenção de uma massa constante, denominada m_3 .

O volume dos discos (V) ($V=\pi.r^2.h$) também foi medido e, para calcular a sorção e a solubilidade dos compósitos em água, foram utilizadas as seguintes equações:

$$\text{Sorção em água} = \frac{(m_2-m_3)}{V}$$

$$\text{Solubilidade em água} = \frac{(m_1-m_3)}{V}$$

Os resultados de sorção e solubilidade em água corresponderam à média aritmética dos valores obtidos para os cinco corpos de prova de cada compósito estudado.

3.9 Teste de atividade antibacteriana

3.9.1 Crescimento bacteriano e inóculo

Uma cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi usada no estudo e mantida congelada (-80° C) em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) suplementado com 10% de glicerol até o uso. Os *S. mutans* foram cultivados em caldo BHI durante a noite em frasco anaeróbio colocado em incubadora a 37 ° C. A quantificação das bactérias presentes no inóculo foi medida através dos valores de densidade óptica (DO). A DO foi determinada em uma concentração de 0,05 a 660 nm (MQX200, BioTek, Winooski, VT, EUA). A quantidade de inóculo utilizado correspondeu a aproximadamente 1×10^8 UFC / mL.

3.9.2 Atividade antibiofilme nas superfícies do disco

Para a análise antibacteriana, células bacterianas foram semeadas na superfície de cada disco de polímero medindo 15 mm de diâmetro e 1,3 mm de espessura ($n = 4$ por grupo). Antes da incubação, os espécimes foram esterilizados por irradiação de raios gama (25 kGy). Os espécimes foram colocados em microplacas de 24 poços contendo o inóculo em caldo BHI suplementado com 5% de sacarose (GONÇALVES *et al.*, 2020). A microplaca foi colocada em frasco anaeróbio e incubada a 37° C, por 24 horas. Após a cultura, os espécimes foram transferidos para uma nova placa e lavados com solução salina tampão fosfato (PBS) uma vez. A solução foi aspirada e o biofilme foi

raspado com um raspador de células estéril. A seguir, o biofilme foi colocado em contato com 100 μL de solução de PBS e diluído em série (10^{-2} a 10^6). Três microgotas (10 μL) de cada diluição foram colocadas em uma placa de Petri contendo ágar BHI (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Uma placa foi dividida igualmente para cada diluição para cada espécime estudado. Posteriormente, as microplacas foram incubadas em jarra anaeróbia a 37 °C, por 24 horas. Os valores de UFC obtidos para cada microgota foram multiplicados por 100 para corrigir os valores e obter o número de UFC/mL.

A atividade antimicrobiana dos nanotubos de carbono avaliados na forma pura nas concentrações de 0,01% e 0,001% também foi avaliada, ou seja, sem incorporação aos polímeros de metacrilato. Um total de 100 μL de cada concentração de solução de CNT (0,1 e 0,01% - ou 10 x concentradas) foi colocado em um tubo contendo 152 μL de inóculo (1×10^8 UFC/mL de *S. mutans*) e 748 μL de caldo BHI, totalizando 1 mL. Este teste foi realizado em triplicata. Os tubos controle foram preenchidos com apenas 1 mL de meio de cultura e os demais com 152 μL de inóculo e 848 μL de meio. Os tubos foram mantidos em jarra anaeróbia e colocados em incubadora agitadora (TE-420, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), durante a noite, a 92 rpm, a 36,4 °C. Um total de 100 μL de cada tubo foi retirado e colocado em uma placa de 96 poços. A leitura também foi realizada em triplicata em leitor de microplacas (MQX200, BioTek, Winooski, VT, EUA). Uma DO de 660 nm foi usada para medir a concentração de bactérias presentes nos tubos.

3.10 Testes celulares

3.10.1 Cultura de células

As linhagens de células imortalizadas epiteliais – queratinócitos humanos (HaCaT) e células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3) obtidas comercialmente foram expandidas em meio de cultura regular DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:F12), suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, e 1% de estreptomicina (Todos Gibco, Nova Iorque, EUA). As células foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , à temperatura de 37° C.

3.10.2 Obtenção dos meios condicionados com os polímeros

Os corpos de prova de cada polímero foram pesados e colocados em meio de cultura regular 1% p/v e incubados em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, à temperatura de 37° C, por 24h (TSIGKOU *et al.*, 2009). O meio condicionado com os biomateriais foi colocado em contato com as células após o plaqueamento de acordo com os ensaios e tempos experimentais descritos a seguir.

3.10.3 Citotoxicidade.

Para os testes de citotoxicidade, as células foram plaqueadas em quadruplicata à densidade de 1×10^3 células/poço em placas de 96-poços. Após 24h, os meios condicionados foram adicionados às células. Após 24h, 48h e 72h de contato com o meio de cultura, o ensaio de integridade de membrana pela quantificação de lactato desidrogenase (LDH) foi realizado nos sobrenadantes de ambas as culturas celulares, HaCat e MC3T3. Após 7 dias, o ensaio de viabilidade *Live and Dead* também foi realizado, mas apenas nos queratinócitos humanos. Em ambos os ensaios, grupos controles cultivados em condições ideais foram utilizados como referência para os demais tratamentos e considerados com 100% de viabilidade. A viabilidade dos grupos tratados foi calculada multiplicando-se o valor da absorbância/fluorescência de cada poço (unidade amostral) por 100, e em seguida dividindo-se esse valor pela média dos valores do grupo em condição ideal.

3.10.4 Ensaio de integridade da membrana

O ensaio de integridade de membrana foi realizado utilizando o Kit CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. É um método para estimar o número de células não viáveis presentes em placas de múltiplos poços. Mede a liberação de lactato desidrogenase a partir de células com a membrana danificada. LDH liberado para o meio de cultura é medido com um composto enzimático (diaforase) que resulta na conversão de resazurina

em resorufina. A absorvância é dada pela coloração quantificada por espectrofotômetro, e é proporcional ao número de células lisadas. A leitura foi realizada em três momentos (24, 48 e 72h) por meio da mensuração das absorvâncias das amostras que foram realizadas a 540nm em espectrofotômetro UV-Visível (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

3.10.5 *Live and Dead*

A presença de células vivas/mortas também foi avaliada nos queratinócitos por meio do kit Live/Dead BackLight™ (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) após 7 dias do plaqueamento para obtenção dos extratos. Os meios condicionados foram trocados dia sim, dia não. A observação foi realizada por meio de microscopia de fluorescência (Cytation 5 Cell, Biotek, Winooski, VT, EUA), utilizando uma lente objetiva 10x. As imagens e a quantificação da fluorescência foram realizadas a 488 nm e 544 nm.

3.10.6 Diferenciação - Ensaio de Mineralização nas MC3T3

Para o teste de diferenciação, apenas as células da linhagem MC3T3 foram utilizadas. As células foram semeadas em triplicata à densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 24-poços e, após a confluência, os tratamentos foram iniciados. As células receberam meio regular ou de indução (DMEM:F12, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina (Todos Gibco), KH_2PO_4 à 1,8 mM e dexametasona à 10 µM (Sigma-Aldrich) e condicionados com os polímeros por 14 dias. Os meios condicionados foram trocados a cada 2 dias. Controles de células (condições ideais) tratadas apenas com meio regular ou de indução foram utilizados para referência.

Para a quantificação e análise qualitativa da formação dos depósitos de mineralização foi utilizada a coloração com Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich). Após o período de contato com os biomateriais, os meios foram aspirados, os poços fixados com álcool isopropílico à 75% por 10 min, e reidratados com água destilada. Em seguida, a solução de vermelho de alizarina 1%, pH 4,2, foi deixada em contato com as células por 15 min. Os poços foram então lavados com PBS até que não apresentassem mais

liberação de corante. As placas foram deixadas secar ao ar livre e, em seguida, fotografadas. A análise quantitativa foi obtida pela solubilização dos nódulos mineralizados com solução de ácido acético 10% e metanol 4:1. Os poços foram lidos a 490 nm (Cytation Multimode Reader, Biotek).

3.11 Grau de conversão dos monômeros

O grau de conversão dos compósitos foi avaliado por meio de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR).

Foi utilizado um espectrofotômetro IR Spirit (Shimadzu, Kioto, Honshu, Japão) com ATR Miracle (Pike Technologies, Madison, Winsconsin, EUA). Inicialmente o cristal de ATR foi completamente limpo com álcool isopropílico e uma varredura *background* foi realizada para eliminar qualquer interferência externa na leitura das amostras. Aproximadamente 0,05ml de cada compósito não polimerizado foi colocado sobre o cristal de ATR e escaneado. Em seguida a amostra foi fotoativada por 40s e uma nova varredura foi realizada. O espectro de absorção das amostras não polimerizadas e polimerizadas foi obtido na região entre 4000 e 400 cm^{-1} , com 32 varreduras a 4 cm^{-1} .

Usando um FTIR software (Spectrum 10, PerkinElmer, Waltham, MA, EUA), um gráfico foi obtido pela associação de picos de absorbância com grupos de monômeros funcionais: intensidade de pico de absorbância da dupla ligação de carbono alifático (em 1638 cm^{-1}) e do componente aromático (1608 cm^{-1}). Após a obtenção dos valores de absorbância (R polimerizado e R não polimerizado), o GC foi calculado usando a equação:

$$\text{GC} = \left(1 - \frac{R_{\text{polimerizado}}}{R_{\text{não polimerizado}}} \right) \times 100$$

3.12 Microdureza Knoop

Um total de 18 corpos de prova (n=6) foram confeccionados utilizando uma matriz de aço com 4 mm de diâmetro por 2 mm de espessura. O polímero foi inserido na matriz e sobre ele foi colocada uma lamínula de vidro para comprimir o material evitando a formação de bolhas deixando a superfície extremamente lisa e em seguida o polímero

foi fotoativado por 40s. Após a confecção dos corpos de prova, os mesmos foram armazenados em estufa a 36 °C por 24h.

Para análise da microdureza Knoop foi utilizada uma máquina de microindentação (Microhardness Testers HMV-2, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) com uma carga de 10g aplicada por 30s.

Os espécimes foram individualmente posicionados de forma que a superfície de teste fosse mantida perpendicular à ponta da máquina. Em cada disco foram realizadas três endentações igualmente espaçadas e não mais próximas que 1 mm uma das outras e da borda do corpo de prova. Após a realização das três endentações, o valor médio foi calculado para cada espécime.

3.13 Estabilidade de cor

Cinco corpos de prova por grupo foram preparados em moldes de $15 \pm 0,1$ mm de diâmetro e $1,0 \pm 0,1$ mm de espessura para análise de estabilidade de cor. O material foi inserido em um único incremento na matriz e então coberto com uma lamela de vidro para criar uma superfície lisa. Os corpos-de-prova foram fotopolimerizados em placas de vidro com dispositivo e parâmetros descritos anteriormente. Os corpos-de-prova foram colocados em caixas escuras e mantidos secos em incubadora a 36 °C por 7 dias (ISO 7491: 2009). As medidas de cor foram realizadas com espectrofotômetro Vita Easyshade® (Advance 4.0, Bad Säckingen, Alemanha) em quatro tempos experimentais diferentes, em triplicata: 7 dias após a confecção dos espécimes (t_0) e 7, 14 e 21 dias após imersão em água destilada; t_1 , t_2 e t_3 respectivamente. Os espécimes foram armazenados em água destilada em incubadora a 36 °C durante todo o tempo experimental. Para as leituras, o espectrofotômetro foi calibrado com a base de cerâmica fornecida pelo fabricante. Os corpos-de-prova foram retirados da água destilada e secos com papel absorvente. Em seguida, a sonda do dispositivo foi posicionada perpendicularmente no centro de cada corpo de prova para todas as medições. As medições foram realizadas com o corpo de prova colocado contra um fundo branco.

Os dados foram obtidos na escala CIE-Lab (International Color Association, 1978). A mudança de cor foi medida por meio da fórmula $\Delta E: \Delta E_{ab} = ((\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 +$

(Δb) 2) 1/2, considerando os três tempos distintos: t0-t1; t0-t2 e t0-t3. Os limiares de perceptibilidade e aceitabilidade foram considerados um valor de $\Delta E_{ab} = 1,2$ e $\Delta E_{ab} = 2,7$, respectivamente (Paravina *et al.*, 2015).

3.14 Análise estatística

Os testes de adesão foram aplicados para avaliar a distribuição normal e homogeneidade de variância. Quando os valores atenderam a essas premissas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do post-hoc de Tuckey. No entanto, caso as premissas não tenham sido atendidas, as diferenças entre os grupos foram avaliadas usando os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e post-hoc Dunn-Bonferroni e em todos os casos foi adotado um nível de significância de 5%. Os testes foram aplicados utilizando o *software* estatístico SPSS Versão 20.0 (*Statistical Productand Service Solutions*, IBM, Nova York, EUA) e o nível de significância adotado foram de 5%.

4 ARTIGOS

Os capítulos resultados e discussão serão apresentados sob a forma de artigos científicos. O artigo 1 foi formatado segundo as normas do periódico “Materials Research” e o artigo 2 foi formatado segundo as normas do periódico “Clinical Oral Investigations”.

4.1 Artigo 1

Multi-walled carbon nanotubes loaded methyl-methacrylate polymers as promising filler-free composites

Ricardo Antonio Alpino Rodrigues^a, Mônica Yamauti^{a,b}, Luiza de Almeida Queiroz Ferreira^a, Érick de Souza Ávila^c, Cláudia Silami de Magalhães^a, Luiz Orlando Ladeira^c, Regina Guenka Palma-Dibb^d, Allyson Nogueira Moreira^a, Ivana Márcia Alves Diniz^a

^a Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^b Department of Restorative Dentistry Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita 13 Nishi 7, 060-8586, Sapporo, Japan.

^c Department of Physics, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^d Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Corresponding author

Prof. Ivana M. A. Diniz. Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil. Zip code: 31.270-901. Telephone: +55 31 34092437. E-mail: ivanadiniz@ymail.com

Abstract

Carbon nanotubes (CNT) could be candidates for physicochemical improvement and greater interactivity of composites with the organic substrate. However, one of the main drawbacks of CNT-based polymers is self-agglomeration and poor dispersion of carbon nanotubes within the polymeric matrix. The study aimed to micro-load multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) into an experimental methyl-methacrylate polymer at two concentrations (0.01 and 0.001%) to assess its mechanical and biological properties. The compressive strength was enhanced in the 0.001% group (125.66 MPa) compared to the control (46.94 MPa). Flexural strength was increased in the 0.001% (51.74 MPa) group compared to the 0.1% group and statistically similar to the control (43.65 MPa). Knoop microhardness, in turn, was significantly reduced for the less concentrated MWCNT group. No differences regarding the degree of conversion were found between MWCNT groups, although both showed reduced values compared to the control. The less concentrated group also showed numerically less sorption and solubility, although with no statistical difference with the control and 0.01% MWCNT groups. No cytotoxicity on oral keratinocytes was observed for up to 72h. It was concluded that the mechanical properties enhanced at low concentrations of MWCNT (0.001%), although no improvement in the cytocompatibility could be observed. Most physicochemical properties of methyl-methacrylate polymers were compromised with the increase in the amount of MWCNT incorporated. However, the addition of 0.001% MWCNT looks promising for reinforcing composites.

Keywords: Carbon nanotubes, composite resin, polymers, physicochemical properties

1 Introduction

Methyl-methacrylate (MMA) composites have been widely accepted in the medical/dental fields. Considered mechanically reasonable and of low cost, MMA polymers are used for implantable or removable devices¹⁻⁴. However, the intrinsic characteristics of the available methacrylate-based composites, i.e., inadequate flexibility and high chemical and stress-related degradation, have an influence on their overall clinical performance⁵⁻⁷. Reinforcement of the polymer matrix with inorganic fillers may enhance some of its mechanical properties. However, microcracks generated within the organic matrix are easily propagated by rigid components and may lead to the material's fracture.⁸

The incorporation of carbon nanotubes (CNT) in MMA based-polymers has already produced composites with differentiated mechanical strength and biological properties^{2,3,9-11}. One of the main merits of substituting or reducing the number of inorganic fillers by CNT is its to increase volumetric stability during polymerization, thus reducing curing shrinkage or degradation after polymerization^{12,13}. Furthermore, CNT-PMMA complexes have also been examined for their clinically applicable drug-free antimicrobial adhesion properties^{3,12,13}, since CNT have an intrinsic antibiofilm activity.

Small amounts of CNT (e.g., 0.1, 0.5, 1, and 2 wt%) have positively impacted the mechanical and antimicrobial properties of epoxy-based composites^{3,11,14-16}. Nevertheless, a challenge in the development of CNT-loaded polymers is to produce the homogeneous dispersion of the nanotubes in the organic matrix^{12,17}. Usually, to optimize dispersion, chemical functionalization or carboxylation processes can be used¹⁸. In turn, these processes make nanotechnology production more expensive. The use of CNT at concentrations ten or one hundred times below the regular concentrations of carbon nanotubes loaded into composites has never been explored in dental polymers. It is possible that, at low concentrations, drawbacks regarding CNT self-aggregation are minimized, whereas the nanotubes' advantages of strengthening and bioactivity are kept. Herein, we made a comprehensive physicochemical investigation of multi-wall CNT loaded at 0.01 and 0.001% into an experimental methyl methacrylate polymeric network.

2 Material & Methods

2.1 Multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and methyl-methacrylate based polymer incorporation

MWCNT were produced and donated by the Nanotube Technology Center (CTNano) from the Universidade Federal de Minas Gerais. MWCNT were obtained using the chemical vapor deposition (CDV), as reported previously ^{19,20}. The organic matrix was prepared with bisphenol A glycidyl methacrylate (BisGMA) and triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA), 2:1 (both from Sigma-Aldrich) (Table 1). A control group was primarily defined without the addition of MWCNT (0% MWCNT). Next, different concentrations of MWCNT (0.001 and 0.01% w/w) were added to TEGDMA and subjected to sonification for 4 min to disperse the nanotubes. BisGMA was then added to TEGDMA and mixed with the aid of a wooden spatula until a homogeneous mixture was obtained. Finally, camphorquinone photoinitiator at 0.5% (w/w) and dimethylamino ethyl methacrylate co-initiator (DMAEMA) at 0.5% (w/w) were added (both from Sigma-Aldrich) (Table 1). The composite was stored in amber glass, at 4 °C, protected from light to prevent spontaneous photoactivation.

Table 1 – Materials.

Material	Formula	Weight Molecular	Manufacturer
Bis-GMA	C ₂₉ H ₃₆ O ₈	512.59 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
TEGDMA	C ₁₄ H ₂₂ O ₆	286.32 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
Camphorquinone	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166.22 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA
DMAEMA	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.24 g/mol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA

Carbon nanotubes	C	12.01 g/mol	Nanotube Technology Center (CTNano); Belo Horizonte, MG, Brazil
------------------	---	-------------	---

Bis-GMA = A glycidyl methacrylate; TEGDMA= triethylene glycol dimethacrylate; DMAEMA = dimethylamino ethyl methacrylate co-initiator.

2.2 Preparation of specimens

Disc-shaped specimens were prepared in a single increment using a 15.0 mm \pm 0.1 mm of diameter and 1.0 mm \pm 0.1 mm of thickness mold. Next, samples were covered with a glass coverslip and light-cured for 40 seconds with a Light Emitting Diode source (LED, Bluephase, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Germany) (470 nm and 800 mW/cm²).

2.3 Compressive strength and modulus of elasticity

Specimens were made for each group in the form of a cylinder with a height of 12.0 mm and a diameter of 6.0 mm using Teflon molds (n = 5 per group). The cylinders were stored in water at 36 °C for 24 hours,²¹ and the tests were performed in a universal machine (EZ-LX Shimadzu, Kyoto, Japan), at a speed of 1 mm/min, according to American Dental Association²² and the data was expressed as MPa.

2.4 Flexural strength and flexural modulus tests

For each experimental group, five specimens were made with the aid of a split steel matrix in the dimensions 25 \pm 2 mm x 2 \pm 0.1 mm x 2 \pm 0.1 mm (n = 5 per group). After photoactivation, the specimens were stored dry at 36 °C for 24 hours. The three-point bend test was performed in a universal testing machine (EZ-LX Shimadzu, Kyoto, Japan), with a 20 mm spacing between supports, according to the ISO 4049²³. The flexural strength was calculated as FS (σ) = 3FI/2bh², where F stands for load at fracture (N), I is the span length, and b and h are the width and thickness of the specimens in mm, respectively. The flexural modulus was determined from the slope of the initial linear part

of the stress-strain curve, calculated as $FM = Fl^3/4bh^3d$, where F is the load at some point on the linear region of the stress-strain curve; d is the slack compensated deflection at load F ; and l , b , and h are as defined above.

2.4 Sorption and solubility test

Five discs of each composite were prepared in molds of 15 ± 0.1 mm in diameter and 1.0 ± 0.1 mm in thickness. Samples were placed in small glass bottles at 36°C for 22 h. Then, they were kept at 23°C for 2 h and, subsequently, weighed. This procedure was repeated until a constant mass, denominated m_1 , was obtained.

Next, samples were immersed in distilled water and kept at 36°C . After seven days, the samples were removed from the solution, washed in running water, and the excess water dried out with absorbent paper. The specimens were then weighed without exceeding the time of 1 minute since the water was removed. The obtained mass, corresponding to each measure, was denominated m_2 . Finally, the samples were placed again at 36°C for 24 hours, then at 23°C for another hour and weighed. This procedure was repeated until a constant mass, denominated m_3 , was obtained, according to the ISO 4049²³. Water sorption (WS) and solubility (SL) over the experimental time were calculated as $WS = (m_2 - m_3)/V$; $SL = (m_1 - m_3)/V$, where V is the volume of the specimen, in cubic millimeters.

2.5 Degree of conversion

The degree of conversion (DC) of the composites was assessed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy with attenuated total reflectance (IR Spirit spectrophotometer Shimadzu, Kyoto, Honshu, Japan) with ATR Miracle (Pike Technologies, Madison, Wisconsin, USA) (FTIR-ATR). Approximately 0.05 ml of each non-polymerized composite was placed on the ATR crystal and scanned ($n=5$ per group). Next, samples were light-cured for 40 s, and another scanning was performed. The absorption spectrum of non-polymerized and polymerized was found in the region between 4000 and 400 cm^{-1} , with 32 scanning tools at 4 cm^{-1} .

Using a FTIR software (Spectrum 10, PerkinElmer, Waltham, MA, USA), a graph was set by correlating the absorbance points with the groups of monomers, i.e., absorbance

intensity peaks of the aliphatic carbon double bond (at 1,638 cm⁻¹) and the aromatic component (at 1,608 cm⁻¹). After obtaining the absorbance values (R polymerized and R non-polymerized), the DC percentage was defined using the equation:

$$DC = \left(1 - \frac{R_{\text{polymerized}}}{R_{\text{non-polymerized}}} \right) \times 100$$

2.6 Knoop microhardness

The specimens were made using a steel matrix with 4 mm in diameter and 2 mm in thickness (n = 5 per group). The polymer was inserted into the matrix, and a glass coverslip was inserted over it to compress the material. This measure prevents the formation of bubbles and confers a smooth surface. Next, the polymer was photoactivated for the 40 s. The specimens were kept at 36 °C for 24 hours.

For the Knoop microhardness analysis, a micro indentation machine (Microhardness Testers HMV-2, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) was used with a load of 10g applied for the 30s. The specimens were individually positioned perpendicular to the tip of the machine. For each disk, three indentations were equally spaced, not closer than 1 mm from each other and to the edge of the specimen. The mean value of three indentations was recorded for each specimen.

2.7 Scanning electron microscopy (SEM)

One specimen of each group was analyzed under scanning electron microscopy (SEM—Quanta 200, FEI Company, Hillsboro, OR). Specimens were sputter-coated with carbon (Denton Vacuum Desk II—Denton Vacuum Inc., Moorestown, NJ).

2.8 Citocompatibility

Commercially obtained epithelial cell line – human skin keratinocytes (HaCaT) – were expanded in regular culture medium DMEM: F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: F12), supplemented with 10% serum fetal bovine, 1% penicillin, and 1% streptomycin (All Gibco, New York, USA). Cells were incubated in a humid atmosphere containing 5% CO₂, at 37 °C. A polymer-conditioned media was performed for each experimental group, as

previously reported ²⁴. Briefly, each polymer was kept in contact with supplemented culture medium (1% w/v) and incubated in a humid atmosphere containing 5% CO₂, at 37 °C, for 24 hours. The conditioned medium was placed in contact with the cells according to the assays and experimental times described below.

For cytotoxicity tests, cells were plated in quadruplicate at a density of 1×10^3 cells/well in 96-well plates. Control groups grown under ideal conditions were used to reference the other treatments and considered 100% viable. The membrane integrity assay was performed using the CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Lactate deshydrogenase released into the culture medium is measured with an enzyme compound (diaphorase) that results in the conversion of resazurin to resorufin. The absorbance is given by the color quantified by a spectrophotometer and is proportional to the number of cells lysed. The reading was performed in three moments (24, 48, and 72h) by measuring the absorbances of those performed at 540nm in a UV-Visible spectrophotometer (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

After 7 days of culturing in conditioned media, the presence of live/dead cells was evaluated using the Live/Dead kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Conditioned media were changed every other day. The observation was performed by means of fluorescence microscopy (Cytation 5 Multimode Reader, Biotek, Winooski, VT, USA) using a 10x objective lens. Fluorescence images and quantification were performed at 488 nm and 544 nm. The viability of the treated groups was calculated by multiplying the fluorescence value of each well (sample unit) by 100 and then dividing this value by the average of the values in the ideal group.

Statistical Analysis

The values of compressive strength, elasticity modulus, flexural strength, and flexural modulus; and cytotoxicity were evaluated by tests of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (Levéne). ANOVA was used to evaluate the effect of different concentrations of MWCNT on the composites followed by multiple comparisons between groups by posthoc test (Tukey). The tests were applied using the statistical software SPSS

Version 20.0 (Statistical Product and Service Solutions, IBM, New York, USA) and the level of significance adopted was 5%.

3. Results and discussion

3.1 Mechanical properties of carbon nanotubes-based polymers were improved by the addition of 0.001% MWCNT

TABLE 2. Values of mean and standard deviation (SD) of mechanical tests on composites with different concentrations of carbon nanotubes.

Group	Compressive strength (MPa)	Elastic modulus (MPa)	Flexural strength (MPa)	Flexural module (MPa)
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Control (0%)	46.94 \pm 26.01 ^a	182.91 \pm 25.42 ^a	43.65 \pm 2.90 ^{a,b}	396.52 \pm 69.34 ^a
0.001%	125.66 \pm 29.32 ^b	284.19 \pm 63.88 ^b	51.74 \pm 3.34 ^a	427.94 \pm 57.38 ^a
0.01%	84.02 \pm 24.83 ^{a,b}	234.38 \pm 52.19 ^{a,b}	35.82 \pm 4.51 ^b	336.75 \pm 71.93 ^a

Different letters in the same column indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 2 presents the results of compressive strength, elastic modulus, flexural strength, and flexural modulus in MPa of composites at different concentrations of carbon nanotubes. The compressive strength was numerically higher in all groups of composites with MWCNT when compared to the control group. The 0.001% MWCNT group showed the highest resistance, being significantly enhanced compared to the control group ($p = 0.001$). Regarding the elastic module, the results were similar to the compressive strength, i.e., the concentration group 0.001% significantly higher than the control group ($p = 0.004$). Flexural strength was significantly higher in the 0.001% MWCNT samples when compared to the highest concentration group ($p = 0.002$), whereas the flexural module did not show a significant difference among any of the groups analyzed ($p = 0.055$).

Higher numerical values were obtained for the 0.001% polymer in all mechanical tests, and some of them showed to be statistically different from the control or the 0.01% experimental groups. It was expected that the presence of MWCNT could increase the mechanical properties of the polymers. However, the difference between the two MWCNT concentrations evaluated can be partially justified by clusters of MWCNT formed in the 0.01% samples. This could be confirmed by SEM analysis. Drawbacks in obtaining uniform dispersion of MWCNT in increasingly concentrated carbon nanotubes-loaded polymers could have contributed to the formation of agglomerates in the polymeric network ^{11,12,25}. These agglomerates may act as stress concentration points where fractures can be initiated, thus leading to inferior properties ^{11,25}.

3.2 The degree of conversion of methyl-methacrylate composites was reduced by the incorporation of MWCNT

Table 3. Values of mean and standard deviation (SD) of degree of conversion and Knoop microhardness tests on composites with different concentrations of carbon nanotubes.

Group	n	Degree of conversion	Knoop hardness
		(%)	number
		Mean±SD	Mean±SD
Control (0%)	5	24,57±1,24 ^a	7,24±1,50 ^a
0,001%	5	22,90±0,34 ^b	4,87±1,42 ^b
0,01%	5	21,26±0,55 ^b	8,06±2,06 ^a

Means and standard deviation of the degree of conversion and Knoop microhardness (KHN) in function of the different concentrations of carbon nanotubes. Different letters in the same column indicate a statistically significant difference ($p < 0,05$).

Table 3 presents the results of the degree of conversion and Knoop microhardness as a function of the different experimental groups. The degree of conversion was statistically

lower in the experimental groups compared to the control group ($p = 0.00$). No statistically significant difference was found between the MWCNT's experimental groups. This finding was unexpected due to the numerically improved compressive strength, elastic modulus, flexural strength, and flexural modulus presented at the 0.001% MWCNT group. On the other hand, it is known that the mechanical properties can be more dependent on the cross-linking density of the polymer formed than the degree of conversion itself ^{26,27}.

The Knoop microhardness was similar between the highest concentration of carbon nanotubes concerning the control group with the lowest concentration, whereas the MWCNT less concentrated polymer showed significantly lower microhardness values concerning the other groups ($p = 0.01$). Previous studies have shown that hardness is reduced when the degree of conversion is also reduced ²⁸. It correlates well with the reduced Knoop microhardness found for the 0.001% samples. Otherwise, this trend was not observed for the 0.01% samples considering that both MWCNT-loaded polymers presented a similar degree of conversion. Further studies are needed to comprehensively assess the dissipation of MWCNT in the organic matrix.

3.3 MWCNT incorporation did not interfere in the sorption and solubility properties of the composites

Table 4 shows the results of the sorption and solubility tests. Both sorption and solubility showed the highest values in the control group, followed by the 0.01% concentration group. The 0.001% MWCNT group showed the lowest values for sorption and solubility. However, when compared, these differences were not statistically significant.

TABLE 4. Values of mean and standard deviation (SD) of sorption and values of the median and interquartile range (IQR) of solubility in composites with different concentrations of carbon nanotubes (MWCNT).

Group	Sorption	Solubility
	($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)
	Mean \pm SD	Median \pm IQR

Control (0%)	47.35±1.62 ^a	29.31±4.99 ^a
0,001%	45.05±1.80 ^a	24.84±3.61 ^a
0,01%	47.07±2.55 ^a	27.36±1.12 ^a

Different letters in the same column indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$).

Although the results of sorption and solubility were similar for all groups, composites containing MWCNT, particularly the lowest concentration (0.001%), have shown numerically less sorption and solubility. The growth of these values due to the increase in the concentration of MWCNT may be due to the lack of silanization of these particles. Non-adherence of MWCNT in the resinous matrix can make it more permeable²⁵.

3.4 0.001% MWCNT showed an even distribution of carbon nanotubes on its surface

Representative electronic photomicrographs of MWCNT incorporation into the polymers are depicted in Fig 1. MWCNT images depict a high-density typical filamentous structure (1A to D). The representative surface morphology refers to fractured surfaces after the flexural strength test of each polymer (2A, 3A, and 4A). Small and high magnification images show that 0.01% MWCNT present less dispersion and superficial agglomeration of carbon nanotubes (4C, D). The 0.001% group showed an even distribution and more sparsely distributed MWCNT particles on the polymer surface (3C, D). These morphological features corroborate the enhanced mechanical properties of the less concentrated MWCNT polymer, possibly indicating better dispersion of the MWCNT within the methyl-methacrylate matrix.

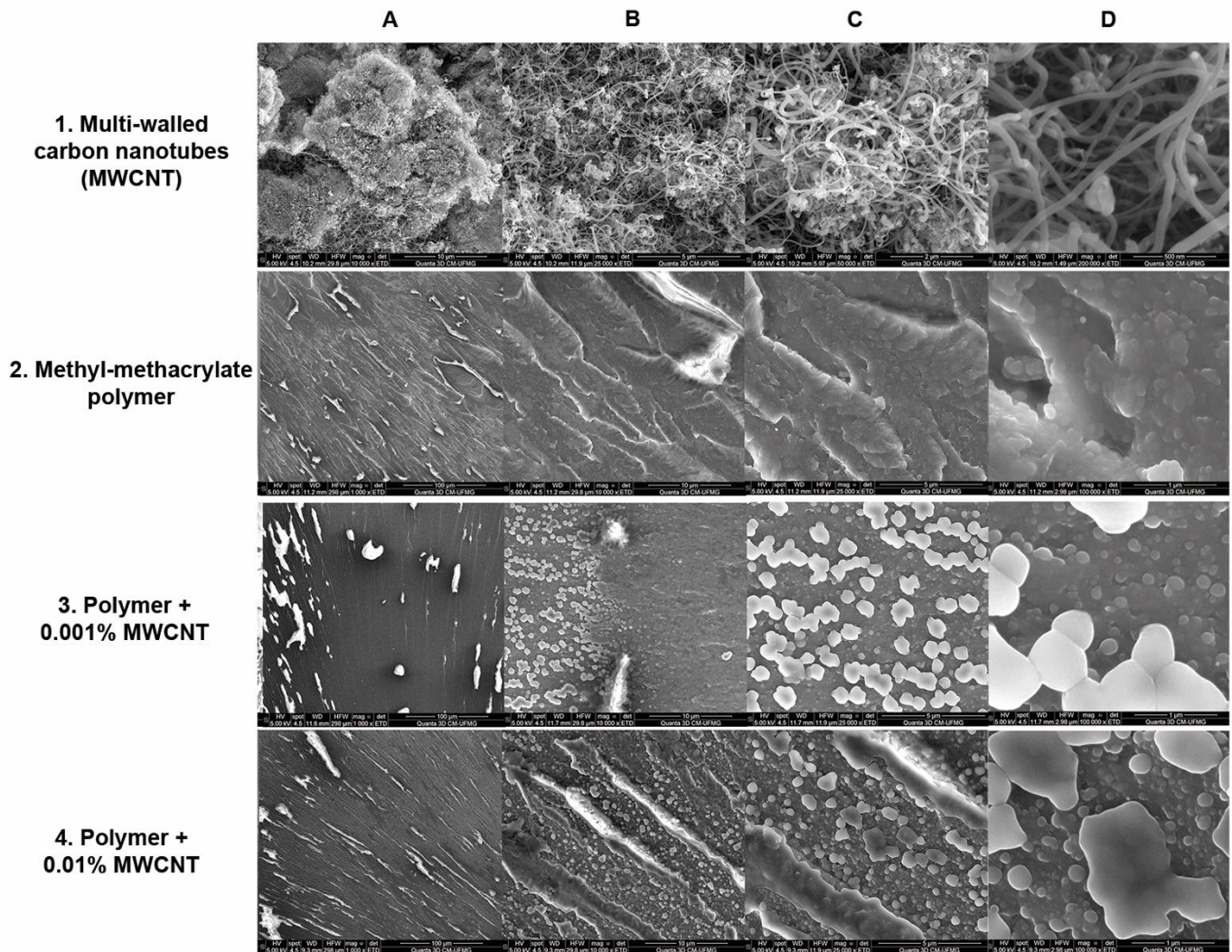
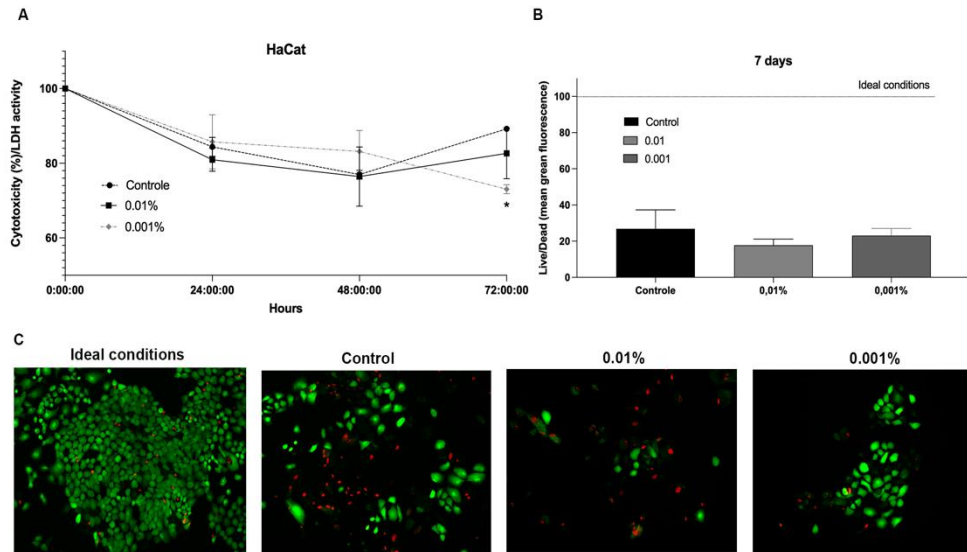


Figure 1: Surface morphological images of the multiple-wall carbon nanotubes (MWCNT) (1). Representative fractured surfaces of methyl methacrylate-based polymer loaded or not with MWCNT at different concentrations (2-4). Images from column A to column D show images as per increased magnification.

3.5 Short-term analysis showed cytocompatibility of all groups, but reduced viability at 7 days on epithelial cells

The media conditioned with dental polymers showed little or no cytotoxicity (viability above 80%) up to 72h of culture in keratinocytes (Figure). However, after 7 days of culture, HaCat cell cultures showed a significant reduction in viability (below 30%) for all groups compared to the group cultivated under ideal conditions ($p < 0.05$) (Figure 2).



FIGURE

2.

Cytotoxicity of different resin polymers with or without loading (control) of MWCNT at 0.01 or 0.001% on keratinocytes (HaCat). Viability assay at 24h, 48h and 72h times (lactate dehydrogenase/LDH activity) (A). Ideal conditions are cells grown in culture medium without conditioning. Viability after 7 days (Live/Dead) (B, C). Data are expressed by mean \pm standard deviation.

Despite the advantages of polymers based on methyl methacrylate and their consolidated use, both composite resins and their respective adhesive systems can have some undesirable effects such as cytotoxicity and even genotoxicity²⁹. These effects are mainly due to residual monomers released from composite resins^{30–33}. The present study is in line with the literature where the contact of the formulations in conditioned culture medium promoted severe cytotoxicity^{31,33}. Another study reported similar findings after assessing the contact of 6.25–25% MWCNT polymer extracts (3 cm²/mL) on epithelial cells. However, the viability was evaluated solely at 24 h time interval. From our studies, the incorporation of MWCNTs did not change the level of cytotoxicity of dental polymers in any tested conditions.

Conclusion

The incorporation of 0.001% of MWCNT into the polymeric matrix increases some mechanical properties of the polymer alone. At higher concentrations, such as 0.01%, MWCNT dispersion into the polymeric network was compromised, and some mechanical

properties weakened. The biological performance of the micro-addition of MWCNT could provide new insights regarding its antibiofilm activity and bioactivity in vivo.

Acknowledgments

The authors are grateful to the gamma irradiation laboratory of Centro de Desenvolvimento Tecnológico Nuclear (CDTN) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), to the microscopy center of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), and also to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financing project number APQ-01352-15.

References

1. Valverde TM, Castro EG, Cardoso MHS, Martins-Júnior PA, Souza LMO, Silva PP, *et al.* A novel 3D bone-mimetic scaffold composed of collagen/MTA/MWCNT modulates cell migration and osteogenesis. *Life Sci* [Internet]. 2016;162:115–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.003>
2. Makvandi P, Gu JT, Zare EN, Ashtari B, Moeini A, Tay FR, *et al.* Polymeric and inorganic nanoscopyical antimicrobial fillers in dentistry. *Acta Biomater* [Internet]. 2020;101:69–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.025>
3. Kim KI, Kim DA, Patel KD, Shin US, Kim HW, Lee JH, *et al.* Carbon nanotube incorporation in PMMA to prevent microbial adhesion. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–11.
4. Zhang K, Zhang N, Weir MD, Reynolds MA, Bai Y, Xu HHK. Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):669–87.
5. Lohbauer U, Belli R, Ferracane JL. Factors involved in mechanical fatigue degradation of dental resin composites. *J Dent Res.* 2013;92(7):584–91.
6. Van de Sande FH, Opdam NJ, da Rosa Rodolpho PA, Correa MB, Demarco FF, Cenci MS. Patient Risk Factors– Influence on Survival of Posterior Composites. *J Dent Res.* 2013;92:S78–83.

7. Koottathape N, Takahashi H, Iwasaki N, Kanehira M, Finger WJ. Quantitative wear and wear damage analysis of composite resins in vitro. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2014;29:508–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.10.003>
8. Li X, Liu W, Sun L, Aifantis KE, Yu B, Fan Y, *et al.* Resin composites reinforced by nanoscaled fibers or tubes for dental regeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014.
9. Cao W, Zhang Y, Wang X, Li Q, Xiao Y, Li P, *et al.* Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2018;29(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-018-6172-z>
10. Zhang F, Xia Y, Xu L, Gu N. Surface modification and microstructure of single-walled carbon nanotubes for dental resin-based composites. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2007;86(1):90–7.
11. Wang R, Tao J, Yu B, Dai L. Characterization of multiwalled carbon nanotube-polymethyl methacrylate composite resins as denture base materials. *J Prosthet Dent* [Internet]. 2014;111(4):318–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.07.017>
12. Turagam N, Prasad Mudrakola D. Effect of Micro-Additions of Carbon Nanotubes to Polymethylmethacrylate on Reduction in Polymerization Shrinkage. *J Prosthodont.* 2012;22(2):105–11.
13. Pienkowski DA, Andrews RJ. Polymethylmethacrylate augmented with carbon nanotubes. US Pat 6,872,403 [Internet]. 2005; Available from: <https://patents.google.com/patent/US6872403B2/en>
14. Saeb MR, Bakhshandeh E, Khonakdar HA, Mäder E, Scheffler C, Heinrich G. Cure kinetics of epoxy nanocomposites affected by MWCNTs functionalization: A review. *Sci World J.* 2013;2013.

15. Liu F, Yang X, Wu X, Xi X, Gao H, Zhang S, *et al.* A dispersive magnetic solid phase microextraction based on ionic liquid-coated and cyclodextrin-functionalized magnetic core dendrimer nanocomposites for the determination of pyrethroids in juice samples. *Food Chem* [Internet]. 2018;268(June):485–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.105>
16. Zhang F, Xia Y, Xu L, Gu N. Surface modification and microstructure of single-walled carbon nanotubes for dental resin-based composites. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2008;86(1):90–7.
17. Wang W, Ciselli P, Kuznetsov E, Peijs T, Barber AH. Effective reinforcement in carbon nanotube-polymer composites. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2008;366(1870):1613–26.
18. Tasis D, Tagmatarchis N, Bianco A, Prato M. Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chem Rev.* 2006;106(3):1105–36.
19. Satishkumar BC, Govindaraj A, Rao CNR. Bundles of aligned carbon nanotubes obtained by the pyrolysis of ferrocene-hydrocarbon mixtures: Role of the metal nanoparticles produced in situ. *Chem Phys Lett.* 1999;307(3–4):158–62.
20. Hernadi K, Fonseca A, Nagy JB, Bernaerts D, Lucas AA. Fe-catalyzed carbon nanotube formation. *Carbon N Y.* 1996;34(10):1249–57.
21. Yli-Urpo H, Lassila LVJ, Närhi T, Vallittu PK. Compressive strength and surface characterization of glass ionomer cements modified by particles of bioactive glass. *Dent Mater.* 2005;21(3):201–9.
22. New American Dental Association specification no. 27 for direct filling resins. Council on Dental Materials and Devices. *J Am Dent Assoc.* 1977;94(6):1191–4.
23. 4^a, editor. International Organization for Standardization, Technical Committee. ISO/TC 106/SC 1. Dentistry polymer-based restorative materials (ISO 4049). Geneva; 2009.
24. Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Biomaterials Differentiation of fetal

osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass O conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials* [Internet]. 2009;30(21):3542–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.019>

25. Zeng W, Liu F, He J. Physicochemical Properties of Bis-GMA/TEGDMA Dental Resin Reinforced with Silanized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Silicon*. 2018;11(3):1345–53.
26. de Oliveira DCRS, Souza-Junior EJ, Dobson A, Correr ARC, Brandt WC, Sinhoreti MAC. Evaluation of phenyl-propanedione on yellowing and chemical-mechanical properties of experimental dental resin-based materials. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(6):555–60.
27. Dauvillier BS, Feilzer AJ, De Gee AJ, Davidson CL. Visco-elastic parameters of dental restorative materials during setting. *J Dent Res*. 2000;79(3):818–23.
28. Freitas PH, André CB, Fronza BM, Giannini M, Rosalen PL, Consani S, *et al*. Physicochemical properties, metalloproteinases inhibition, and antibiofilm activity of doxycycline-doped dental adhesive. *J Dent*. 2021;104(December 2020):1–10.
29. Pagano S, Coniglio M, Valenti C, Negri P, Lombardo G, Costanzi E, *et al*. Biological effects of resin monomers on oral cell populations: Descriptive analysis of literature. *Eur J Paediatr Dent*. 2019;20(3):224–32.
30. Kwon JH, Park HC, Zhu T, Yang H. Inhibition of odontogenic differentiation of human dental pulp cells by dental resin monomers. 2015;1–7.
31. Mahdhaoui K, Fournier B, Derbanne MA. Unbound monomers do diffuse through the dentin barrier. *Dent Mater* [Internet]. 2017;33(6):743–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.04.007>
32. Davydenko V, Starchenko I, Davydenko A, Trufanova V K V. THE IMPACT OF THE ACRYLIC MONOMER ON THE MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF RAT LINGUAL MUCOSA. *Georg Med News*. 2018;278:146–51.

33. Vining KH, Scherba JC, Bever AM, Alexander MR, Celiz AD, Mooney DJ. Synthetic Light-Curable Polymeric Materials Provide a Supportive Niche for Dental Pulp Stem Cells. *Adv Mater.* 2018;30(4):1–9.

4.2 Artigo 2

Carbon nanotubes micro-addition confers promising antibiofilm activity and cytocompatibility properties to methyl-methacrylate composites

Ricardo Antonio Alpino Rodrigues¹, Luiza de Almeida Queiroz Ferreira¹, Érick de Souza Ávila², Mônica Yamauti^{1,3}, Wesley Fernandes-Braga⁴, Augusto César Sette-Dias⁵, Cláudia Silami de Magalhães¹, Luiz Orlando Ladeira², Allyson Nogueira Moreira¹, Ivana Márcia Alves Diniz¹

¹ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil.

² Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Brazil.

³ Department of Restorative Dentistry Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

⁴ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

⁵ School of Dentistry, Centro Universitário Newton Paiva, Av. Silva Lobo, 1730, 30431-259, Belo Horizonte, Brazil.

Corresponding author

Prof. Ivana M. A. Diniz. Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil. Zip code: 31.270-901. Telephone: +55 31 34092437. E-mail: ivanadiniz@ymail.com

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01352-15 to Prof. Yamauti and scholarship for Dr. Ferreira). We thank the laboratory of gamma irradiation from the Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). We also thank the Center for Image Acquisition and Processing of the Institute of Biological Sciences and the Microscopy Center at UFMG for providing the equipment and technical support for experiments involving image acquisition.

Abstract

Objectives: This study aimed to optimize classical composites by loading two concentrations of multi-walled CNT (MWCNT) as growth into a methyl-methacrylate polymeric network. **Material and Methods:** A Bis-GMA and TEGDMA (2:1) base was produced at 0% (control); 0.001%; or 0.01% MWCNT. The composites were assessed using thermogravimetric analysis and color stability tests. Samples were morphologically observed using scanning electron microscopy (SEM). The antibiofilm activity was evaluated in a *Streptococcus mutans* strain (ATCC 25175) seeded on the experimental polymeric surfaces. Essential cellular functions, i.e., survival and osteodifferentiation, were evaluated in pre-osteoblasts cells (MC3T3). **Results:** A curve shift to the right was observed in both MWCNT-loaded polymers meaning improved thermal stability compared to the control group. The 0.001% group showed even distribution and fewer carbon nanotubes agglomeration than the 0.01% MWCNT-loaded polymer. The antibiofilm activity on the disc surface was significantly increased in the 0.001% MWCNT discs. All groups have shown no cytotoxicity on the MC3T3 cells up to 72h, and the addition of MWCNT favored MC3T3 mineralization over the control, particularly at 0.001%. Finally, no significant changes in color stability and color properties were detected concerning MWCNT incorporation. **Conclusions:** The micro-addition of MWCNT at 0.001% confers antimicrobial properties and bioactivity to methyl-methacrylate polymers without compromising their optical properties. **Clinical Relevance:** Micro-addition of carbon

nanotubes into composites may contribute to minimally invasive procedures in a clinical setting.

Keywords: multi-walled carbon nanotubes. composite. bioactivity. antimicrobial activity. optical properties.

Introduction

Adhesive-based restorations are the treatment of choice for carious lesions concerning its conservative approach. However, recurrent decay is one of the primary reasons for methyl-methacrylate composite restorations replacement due to gap formation from curing shrinkage or degradation after polymerization [1, 2]. In the last five years, numerous studies have investigated the improvement of antimicrobial properties of dental materials to overcome issues related to light-cured fillings [3–6]. Because of the clinical success of the polymeric matrices of composites, efforts have been focused on the synthesis of new organic/inorganic fillers or the modification of pre-existing ones [4, 5, 7–10]. The incorporation of antimicrobial substances, for example, aims to minimize the amount of dental tissue removed, favoring the maintenance of sound dentin that can be locally remineralized [5, 11, 12].

Composite resins produce little or no biological response in the dental tissue. Conversely, most polymeric matrices used in adhesive systems and restorative materials are cytotoxic and can release potentially harmful substances to the pulp tissue [13–15]. The development of more compatible and interactive biomaterials, such as liners and bases, could lead to a host repairing response that also helps the arrest of the carious process. Furthermore, the stimulation of endogenous repair mechanisms may delay dental pulp's invasive treatments [16].

Carbon nanotubes (CNT) have been applied purely or in association with other biomaterials to extract toxic compounds dispersed in the environment and food products [17–19]. Accumulated evidence has shown that CNT also present antimicrobial properties [20, 21]. Moreover, CNT may reduce curing shrinkage in methyl-methacrylate polymers [7]. Accordingly, the investigation of CNT biotechnologies capable of reducing composites

cytotoxicity while inhibiting secondary caries development could make adhesive restorative materials safer and greater commercially. In this sense, this study aimed to incorporate multi-walled CNT (MWCNT), as growth, into a polymeric network to investigate some physicochemical and biological properties of an experimental methyl-methacrylate biomaterial.

Materials and methods

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) polymer incorporation

MWCNT were donated by the Nanotube Technology Center (CTNano) from the Universidade Federal de Minas Gerais. MWCNT were obtained using chemical vapor deposition (CDV) [22, 23]. The organic matrix was prepared with bisphenol A glycidyl methacrylate (BisGMA) and triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) in the proportion 2:1 in moles (both from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Table 1). Different concentrations of MWCNT (0.001 and 0.01% w/w) were primarily added to TEGDMA and then subjected to sonification for 4 min to disperse the nanotubes. Next, BisGMA was added to TEGDMA and mixed with the aid of a wooden spatula until a homogeneous mixture was obtained. Finally, the camphorquinone photoinitiator and the dimethylamino ethyl methacrylate co-initiator (DMAEMA) were added at a concentration of 0.5% (w/w) each (both from Sigma-Aldrich) (Table 1). The composite was stored at 4 °C in an amber glass protected with aluminum foil to prevent spontaneous photoactivation. A control group was similarly defined without the addition of MWCNT (0% MWCNT).

Table 1 Materials

BisGMA	TEGDMA	Camphorquinone	DMAEMA	Multi-walled carbon nanotubes
$C_{29}H_{36}O_8$	$C_{14}H_{22}O_6$	$C_{10}H_{14}O_2$	$C_{11}H_{15}NO_2$	C
512.59 g/mol	286.32 g/mol	166.22 g/mol	193.24 g/mol	12.01 g/mol

Bis-GMA = A glycidyl methacrylate; TEGDMA= triethylene glycol dimethacrylate;
DMAEMA = dimethylamino ethyl methacrylate co-initiator.

Preparation of specimens

Specimens were prepared according to each assay performed. For disc-shaped specimens, the material was inserted in a single increment in a 15.0 mm \pm 0.1 mm diameter and 1.0 mm \pm 0.1 mm of thickness mold. Next, samples were covered with a glass coverslip to create a smooth surface. The specimens were light-cured through the glass coverslips for 40 seconds with Light Emitting Diode source (LED, Bluephase, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Germany) - 470 nm and 800 mW/cm².

Thermogravimetry

A pool of disc-shaped specimens per group was ground using porcelain mortar and pestle 24 h after photoactivation. Approximately 5 mg of the powder was placed in a thermogravimetric analyzer (DTG - 60H, Shimadzu, Kyoto, Japan) in synthetic air, at a 50 mL/min flow rate, a heating rate of 10 °C/min, and a temperature rise to 900 °C. During the analysis, the mass variation of the sample was recorded as a function of temperature.

Scanning electron microscopy (SEM)

Two disc-shaped specimens per group were analyzed under scanning electron microscopy (SEM – Quanta 200, FEI Company, Hillsboro, OR). Samples were sputter-coated with carbon before observation (Denton Vacuum Desk II – Denton Vacuum Inc., Moorestown, NJ, USA).

Antibacterial Activity

Bacterial growth and inoculum

A strain of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) was used in the study and was kept frozen (-80 °C) in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) medium supplemented with 10% glycerol until use and cultivated in BHI broth overnight in an anaerobic jar placed at an incubator at 37 °C. Bacteria present in the

inoculum were quantified as optical density (OD) values at a concentration of 0.05 at 660 nm (MQX200, BioTek, Winooski, VT, USA). The amount of inoculum used corresponded to approximately 1×10^8 CFU/mL.

Antibiofilm activity on the disc's surfaces

Bacterial cells (1×10^8 CFU/mL of *S. mutans*) were seeded on the surface of each disc-shaped polymer (n=4). Before incubation, the specimens were sterilized by gamma-ray irradiation (25 kGy). The specimens were placed in 24-well microplates containing the inoculum in BHI broth supplemented with 5% sucrose [24]. The microplate was placed in an anaerobic jar and incubated at 37 °C for 24 h. After culture, the specimens were transferred to a new plate and washed with Phosphate Buffer Saline (PBS). The solution was aspirated, and the biofilm was scraped with a sterile cell scraper. Next, the biofilm was placed in contact with 100 μ L of PBS solution and serially diluted (10^{-2} to 10^{-6}). Three micro drops (10 μ L) from each dilution were placed in a Petri dish containing BHI agar (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil). One plate was divided equally to each dilution for each specimen studied. Subsequently, the microplates were incubated in an anaerobic jar at 37 °C for 24 h. UFC values obtained for each micro drop were multiplied by 100 to correct the values and obtain CFU/mL.

The antimicrobial activity of MWCNT powders at concentrations of 0.01% and 0.001% were also evaluated solely, i.e., without incorporation into the methyl-methacrylate polymers. Each concentration of CNT (100 μ L or 10 μ L of a stock solution of 0.1% for 0.01% and 0.001% MWCNT, respectively) was placed in tubes in triplicate containing 1×10^8 CFU/mL of *S. mutans* in 1 mL of BHI broth. Control tubes filled with 1 mL of culture medium with and without the inoculum were used for reference. The tubes were kept in an anaerobic jar and placed in a shaker incubator (TE-420, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) overnight, at 92 r.p.m., at 36.4 °C. A total of 100 μ L from each tube was removed and placed in a 96 well-plate. The reading was also performed in triplicates in a microplate reader (MQX200, BioTek, Winooski, VT, USA). The OD of 660 nm was used to measure the concentration of bacteria present in the tubes.

Cell tests

Cell culture

A commercially available rat pre-osteoblastic cell line (MC3T3) was expanded in regular DMEM: F12 culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium: F12), supplemented with 20% fetal serum bovine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (all from Gibco, New York, NY, USA). The cells were incubated in a humid atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C.

Obtaining conditioned media

Each group of polymers was prepared in units measuring approximately 25 mm x 2 mm x 2 mm and photoactivated, as aforementioned. A polymer-conditioned media was performed for each experimental group by keeping samples in contact with supplemented culture medium (adjusting polymer: medium 1% w/v) in a humid atmosphere containing 5% CO₂, at 37 °C for 24 hours [25]. The conditioned medium was placed in contact with the cells according to the assays and experimental times described below.

Cell survival

For cytotoxicity tests, cells were plated in quadruplicate at a density of 1×10^3 cells/well in 96-well plates. Control groups grown under ideal conditions were used as a reference for the other treatments and considered 100% viable. The membrane integrity assay was performed using the CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. The reading was performed at 24, 48, and 72 h at 540 nm in a UV-Visible spectrophotometer (SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Mineralization

For the osteodifferentiation assay, MC3T3 cells were seeded in triplicate at a density of 5×10^4 cells/well in 24-well microplates. The cells received regular or inductive medium (DMEM: F12, supplemented with 20% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (All Gibco), KH₂PO₄ at 1.8 mM, and dexamethasone at 10 µM (Sigma-Aldrich) for 14 days. Inductive media conditioning with the materials was performed as described elsewhere. The conditioned media were changed every 2 days.

Controls grown in ideal conditions cultivated either in regular or inductive media with no conditioning were used as references.

For quantitative and qualitative analysis of the formation of mineralization deposits, the Alizarin Red S (ARS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) staining was used. After the period of contact with the biomaterials, the media were aspirated, the wells fixed with 75% isopropyl alcohol for 10 min and rehydrated with distilled water. Then, 1% ARS solution, pH 4.2, was left in contact with the cells for 15 min, under agitation. The wells were then washed with PBS until no more dye was released. The microplates were left dry and then photographed (Cytation Multimode Reader, Biotek; Winooski, VT, USA). Quantitative analysis was obtained by solubilizing the mineralized nodules with a 10% acetic acid methanol solution 4:1. The wells were read at 490 nm (Cytation Multimode Reader).

Color stability

Five disc-shaped specimens were placed in dark boxes and kept dry in an incubator at 36 °C for 7 days [26]. Color measurements were conducted with spectrophotometer Vita Easyshade™ (Advance 4.0, Bad Säckingen, Germany) at three different experimental times: 7 days (baseline), 14 days, and 21 days. The specimens were stored in distilled water inside an incubator at 36 °C during all experimental time. For the readings, the spectrophotometer was calibrated with the ceramic base provided by the manufacturer. The specimens were removed from the distilled water and dried out with absorbent paper. Then, the probe of the device was placed perpendicularly at the center of each specimen for all measurements.

Data were obtained in the CIE-Lab scale [27]. The color stability was measured through the ΔE formula: $\Delta E_{ab} = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$, considering the three different times: baseline-7 days; baseline-14 days and baseline-21 days.

Statistical analysis

Adherence tests were applied to assess normal distribution and homogeneity of variance. Data were subjected to Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison test or Mann-Whitney test. Data is expressed as means \pm standard deviation. A 5% significance level was adopted.

Results

Thermogravimetry

The thermogravimetric analysis showed that the polymer resisted heating up to approximately 600 °C. The incorporation of MWCNT shifted the polymer curves to the right of the graph and showed numerically higher mass conservation throughout heating than the control (Fig. 1A). Up to around 55 °C, mass conservation among groups with MWCNT occurred similarly; up to 100 °C, the 0.001% concentration group presented a weight mass curve above the 0.01%, meaning numerically less mass loss (Fig. 1B).

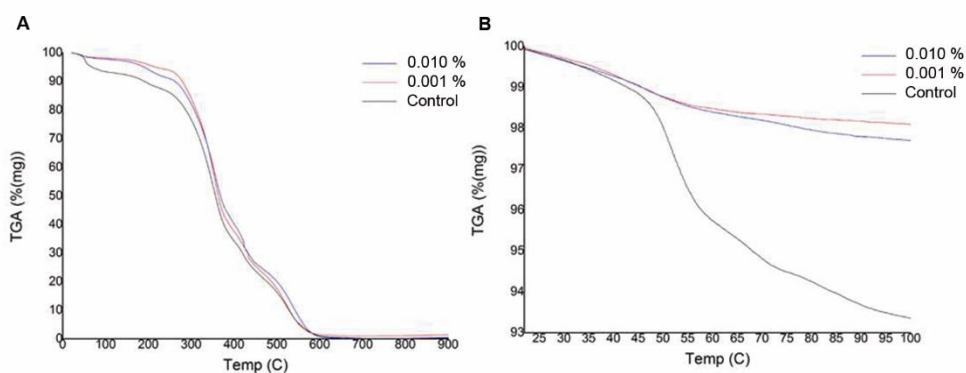


Fig. 1 Mass loss rate as a function of temperature increase up to 900 ° C (A) and image “A” enlarged up to 100 ° C (B). Note the right shift of MWCNT-incorporated polymers’ curves upon temperature increase.

Scanning electron microscopy (SEM)

The surface morphology of MWCNT-incorporated polymers is shown in Figure 2A. Small and high magnification images show that 0.01% MWCNT present superficial agglomeration of carbon nanotubes (Fig. 2A). The 0.001% group showed an even distribution of CNT on the polymer surface (Fig. 2D and E). MWCNT as growth morphology is depicted in Figure 2B.

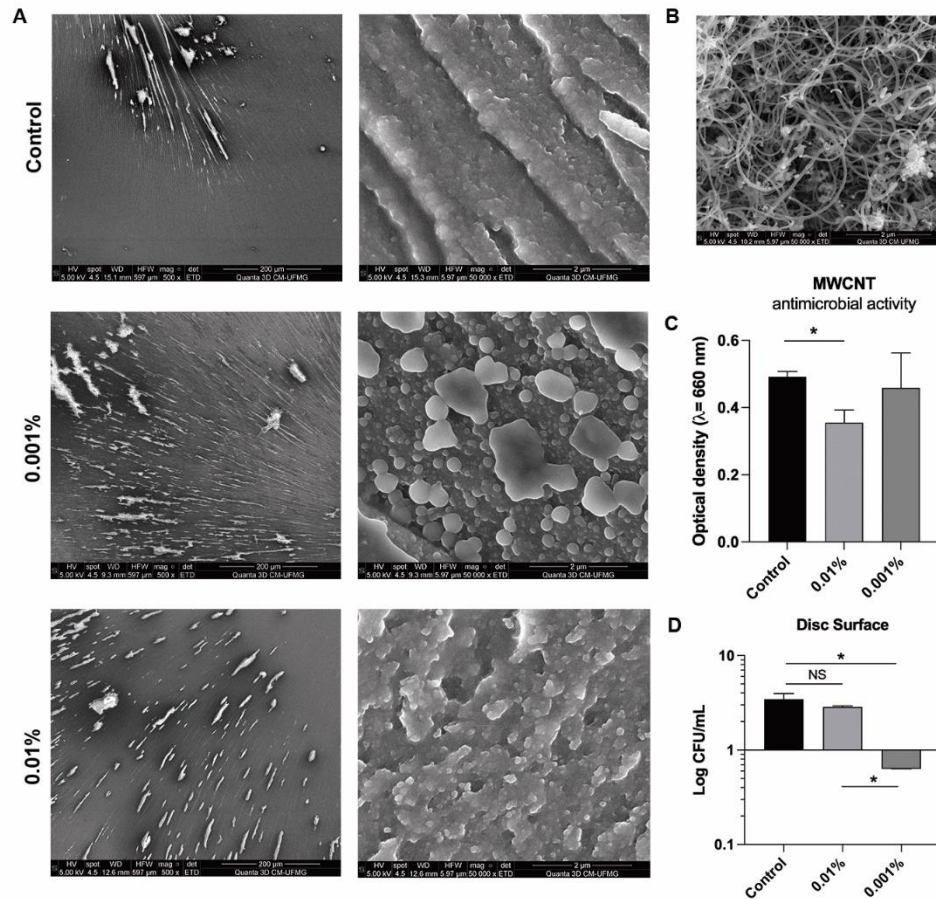


Fig. 2 Surface morphology and antibiofilm activity of MWCNT-incorporated methyl-methacrylate polymers. Representative electronic photomicrographs of the surface morphology of the experimental polymers (control, 0.001% and 0.01% MWCNT) at magnifications of 500x and 50,000x (A). Representative electronic photomicrograph of MWCNT (as growth) at 50,000x before incorporation (B). Bar graphs showing pure MWCNT evaluated in *S. mutans* suspensions at 0.01 and 0.001% (C) or on disc-shaped polymers' surface (D). Data are expressed by mean \pm standard deviation. Asterisks represent the statistical difference between groups ($p < 0.05$). NS = not significant

Antibacterial activity test

The antibacterial activity of carbon nanotubes was tested at both concentrations of MWCNT against an *S. mutans* strain in suspension (Fig. 2C). A significant decrease in the bacterial load was observed when the cultures were maintained in 0.01% MWCNT broth ($p < 0.05$) compared to the less concentrated group (Fig. 2C). The addition of low concentration of MWCNT (0.001%) showed no bacterial load reduction compared to the 0.01% MWCNT ($p > 0.05$) (Fig. 2C).

Next, we verified the antibiofilm activity of *S. mutans* biofilm grown on top of the disc-shaped polymers with the incorporation or not of MWCNT (Fig. 2D). A significant decrease in bacterial load was not observed for the 0.01% MWCNT group compared to the control ($p > 0.05$) (Fig. 2D). However, the less concentrated MWCNT polymer showed the lowest \log_{10} values compared to all the other groups ($p < 0.05$) (Fig. 2D).

Cell tests

The conditioned medium with dental polymers showed little or no cytotoxicity (viability above 80%) up to 72 h of culture pre-osteoblasts (MC3T3) (Fig. 3A). No differences among the experimental groups were observed ($p > 0.05$) (Fig. 3A).

Concerning osteodifferentiation of MC3T3 cells, the ability to spontaneously induce mineralization was verified for all tested polymers (Fig. 3B). After 14 days of culturing, cellular density was significantly reduced (data not shown), and mineral matrix production was minimal for all groups (Fig. 3B). The 0.001% group showed the greatest quantification of mineral nodules among the polymers, whereas the 0.01% MWCNT the lowest ($p < 0.05$) (Fig. 3B).

Upon osteodifferentiation, all experimental groups showed greater mineralization than the same materials in regular conditions ($p < 0.05$). Moreover, the MWCNT incorporated methyl-methacrylate polymers showed similar mineral matrix production, but both were superior in promoting mineralization of MC3T3 cells compared to the control ($p < 0.05$) (Fig. 3C). ARS staining of MC3T3 cultures upon induction is shown in Figure 3C.

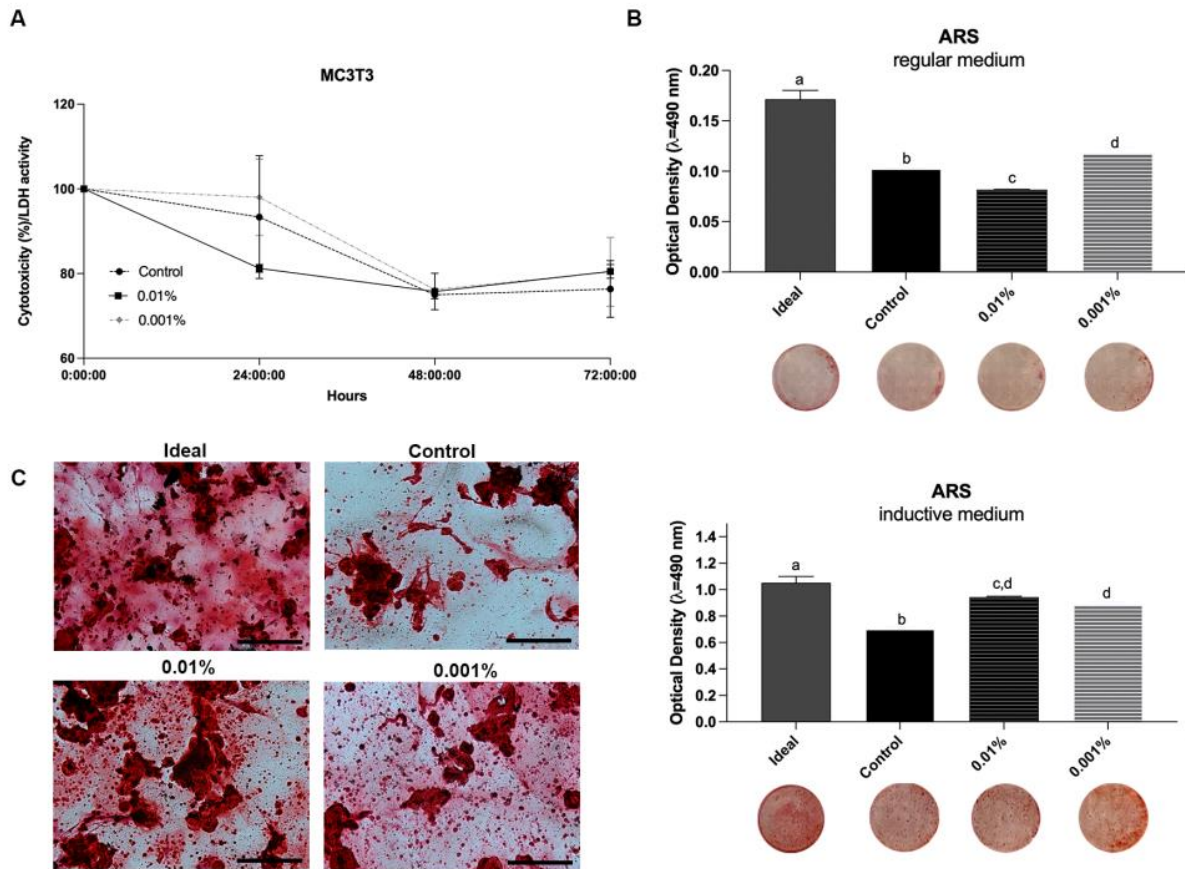


Fig. 3 Cytotoxicity of different resin polymers with incorporation (0.01% or 0.001%) or not (control) of MWCNT on pre-osteoblast cells (MC3T3). Viability test at 24 h, 48 h, and 72 h (lactate dehydrogenase/LDH activity) (A). Analysis of the mineralization capacity of MC3T3 grown in regular or induction medium (B-D). Data are expressed by mean \pm standard deviation. Different letters mean significant differences among groups

Color stability analysis

The evaluation of color stability is reported in Table 2 and Online Resource 1 (Table 1). Along 21 days, no differences were found regarding ΔE , ΔL , and Δb among all groups. Concerning Δa , the 0.001% MWCNT showed reduced values at 14 days and 21 days compared to the control at 7 days. The 0.01% MWCNT group showed reduced Δa values only at 14 days compared to the control at 7 days.

Table 2 Color stability comparison of mean \pm standard deviation (SD) among groups after 7, 14 and 21 days of immersion in distilled water

	ΔE_{ab} Mean			ΔL_{ab} Mean			Δa_{ab} Mean			Δb_{ab} Mean		
	(SD)			(SD)			(SD)			(SD)		
	Control	0.01%	0.001%	Control	0.01%	0.001%	Control	0.01%	0.001%	Control	0.01%	0.001%
7 days	3.56 (1.46)	2.93 (0.81)	3.58 (1.57)	-0.72 (3.44)	-1.54 (2.58)	2.87 (0.96)	0.66 (0.15)	0.46 (0.24)	0.2 (0.28)	-1.5 (1.46)	-1 (0.44)	-1.9 (0.65)
14 days	4.61 (1.37)	3.40 (1.84)	4.49 (1.28)	-1.60 (4.63)	-2.84 (2.38)	2.5 (3.13)	0.26 (0.16)	0.2 (0.2)	0 (0.18)	-1.3 (1.34)	-1.16 (0.56)	-2.5 (0.84)
21 days	3.61 (2.28)	3.03 (2.28)	3.77 (0.64)	-0.4 (3.86)	-1.34 (3.43)	1.7 (1.17)	0.3 (0.17)	0.1 (0.29)	0.04 (0.36)	-2.12 (0.71)	-1.34 (0.54)	-2.74 (0.84)

ΔE_{ab} = color change in CIELab scale for composite specimens; ΔL_{ab} = variation in lightness coordinate; Δa_{ab} = change in green-red coordinate; Δb_{ab} = change in blue-yellow coordinate. Numbers in bold mean statistical difference between group and the control at 7 days.

Discussion

The improvement of polymeric bases of dental materials by associating them with carbon nanotubes is still little investigated in the literature. In the dental field, the application of CNT has privileged the improvement of synthetic biomaterials for bone neoformation [20, 21, 28]. The use of CNT biotechnologies capable of improving the mechanical and biological properties of polymeric filling materials, in turn, could expand their clinical applications. Interactive materials with antimicrobial properties, and in the meantime, capable of stimulating intrinsic mechanisms of repair are of great relevance in preserving the dental structures. Herein, we observed that the incorporation of 0.001% of MWCNT combines *S. mutans* antibiofilm activity and osteoinductive and osteodifferentiation properties on MC3T3 cells. Although presenting black color, the incorporation of MWCNT did not significantly impair the polymers' color properties and color stability. Moreover, our data indicate that the experimental polymer at low concentration presents an even distribution and less agglomeration of MWCNT in the methyl-methacrylate matrix than the more concentrated one.

Incorporating CNT into polymeric matrices is a challenge since they are insoluble biomaterials and clump together in packages [29]. In this study, manual homogenization and sonication were chosen to incorporate the nanotubes into the base polymer matrix. Although these techniques have limitations regarding state-of-art technologies for CNT homogenization, their use was considered in this study to minimize costs. Accordingly, the thermogravimetric test was performed to assess the dispersion of CNTs in the resin matrix [8]. The thermogravimetric results showed that the control group started marked degradation at around 240 °C, having its total decomposition at 530 °C, corroborating with previous literature data for BisGMA/TEGDMA-based polymers [30]. On the other hand, in the groups with the addition of MWCNT, the thermal degradation of the samples started later. The expansion of the thermogravimetric curves at temperatures below 100 °C showed that the conservation of mass was numerically higher for the 0.001% MWCNT group. However, both concentrations of MWCNT-incorporated polymers showed curves above the control. In this sense, data obtained may suggest that incorporating carbon

nanotubes, particularly at low concentrations of MWCNT, increases the samples' thermal stability, as reported previously [8].

We verified that MWCNT present antimicrobial activity when evaluated in *S. mutans* suspensions when purely tested at 0.01% (no polymer incorporation). Conversely, an antibiofilm activity of the polymer groups was evidenced only when the *S. mutans* were seeded on the disc surfaces of the 0.001% MWCNT groups. Interestingly, SEM data showed qualitatively less agglomeration in the 0.001% MWCNT group than the 0.01% one. Moreover, 0.001% MWCNT showed even dispersion of nanotubes or nanotubes particles on the methyl-methacrylate polymer surface, thus corroborating the thermogravimetric findings. Accordingly, the pronounced antibiofilm activity of the 0.001% MWCNT is possibly due to the greater available contact area of carbon nanotubes dispersed on the surface of the methyl-methacrylate matrix. Previous studies have also shown an anti-adhesion, and antimicrobial ability effect of CNT incorporated poly-methyl methacrylate (CNT-PMMA) in biofilms formed by *S. mutans*, *Staphylococcus aureus*, or *Candida albicans* [6]. However, from the 0.25~2% tested concentrations, the 1% CNT-PMMA showed better results in reducing microbial adhesion.

Despite the advantages of polymers based on methyl-methacrylate and their consolidated use in the dental field, both composite resins and adhesive systems have undesirable in vitro cytotoxic effects or even genotoxicity [14]. These effects are mainly due to residual monomers leached from methyl-methacrylate composites [13, 14, 30]. The present study showed that, in a short-term analysis, the contact of MC3T3 cells with the MWCNT-incorporated polymers-conditioned culture medium promoted slight cytotoxicity. Twenty-four hours studies also shown high viability of epithelial cells upon contact within a range of concentrations (6.25~25%) of CNT-PMMA extracts at a specimen surface-solution ratio of 3cm²/mL [6]. However, after 14 days of culture, the cellular density in any methyl-methacrylate group was significantly reduced regarding the control, which aligns with previous reports [30, 31]. Still, the 0.001% MWCNT polymer induced more mineral matrix production on MC3T3 cells than the other groups in regular conditions.

Upon osteodifferentiation induction, all methyl-methacrylate groups – regardless of the addition of MWCNT – could promote mineral matrix production on pre-osteoblast cells.

Surprisingly, the incorporation of MWCNT at any concentration favored mineralization over control. In this sense, it is possible that, even at low concentrations, MWCNT have bioactivity. It is also reasonable that MWCNT stimulate desirable tissue responses towards repair by clamping cytotoxic monomers within the polymer, thus minimizing the leaching of undesirable components. Experiments on the degree of conversion or cross-linking density of the polymers could partially elucidate whether MWCNT may reduce composites cytotoxicity. Heretofore, no previous studies have comprehensively investigated the biological features of MWCNT incorporation into composites, impairing further comparisons in the current literature.

Finally, color stability was acquired for both MWCNT-incorporated and control polymers in almost all parameters. The color change was similar among all groups, indicating that the use of carbon nanotubes in the experimental methyl-methacrylate base has little interference with its optical properties.

Conclusion

Herein, the physicochemical and biological properties of methyl-methacrylate polymers were improved with the addition of MWCNT, particularly at low concentrations (0.001%). To date, the micro-addition of 0.001% MWCNT appears to be promising for incorporation in dental composites.

Conflict of Interest: The author declare that they have no conflict of interest.

References

1. Zivković S, Bojović S, Pavlica D (2001) Bacterial penetration of restored cavities. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 91:353–358. <https://doi.org/10.1067/moe.2001.113345>
2. Sarret D (2005) Clinical challenges and the relevance of materials testing for posterior composite restorations. *Dent Mater* 21:9–20. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.10.001>
3. Valverde TM, Castro EG, Cardoso MHS, *et al* (2016) A novel 3D bone-mimetic scaffold composed of collagen/MTA/MWCNT modulates cell migration and osteogenesis. *Life Sci* 162:115–124. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.003>
4. Zhang K, Zhang N, Weir MD, *et al* (2017) Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. *Dent Clin North Am* 61:669–687. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.05.002>
5. Makvandi P, Gu JT, Zare EN, *et al* (2020) Polymeric and inorganic nanoscopical antimicrobial fillers in dentistry. *Acta Biomater* 101:69–101. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.025>
6. Kim KI, Kim DA, Patel KD, *et al* (2019) Carbon nanotube incorporation in PMMA to prevent microbial adhesion. *Sci Rep* 9:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41381-0>
7. Turagam N, Prasad Mudrakola D (2013) Effect of Micro-Additions of Carbon Nanotubes to Polymethylmethacrylate on Reduction in Polymerization Shrinkage. *J Prosthodont* 22:105–111. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2012.00917.x>
8. Wang R, Tao J, Yu B, Dai L (2014) Characterization of multiwalled carbon nanotube-polymethyl methacrylate composite resins as denture base materials. *J Prosthet Dent* 111:318–326. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.07.017>
9. Borges ALS, Münchow EA, de Oliveira Souza AC, *et al* (2015) Effect of random/aligned nylon-6/MWCNT fibers on dental resin composite reinforcement. *J*

- Mech Behav Biomed Mater 48:134–144.
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.03.019>
10. Cao W, Zhang Y, Wang X, *et al* (2018) Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. *J Mater Sci Mater Med* 29:.
<https://doi.org/10.1007/s10856-018-6172-z>
 11. Sauro S, Watson T, Moscardó AP, *et al* (2018) The effect of dentine pre-treatment using bioglass and/or polyacrylic acid on the interfacial characteristics of resin-modified glass ionomer cements. *J Dent* 73:32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.03.014>
 12. Blum IR, Özcan M (2018) Reparative Dentistry: Possibilities and Limitations. *Curr Oral Heal Reports* 5:264–269. <https://doi.org/10.1007/s40496-018-0191-1>
 13. Kwon JH, Park HC, Zhu T, Yang HC (2015) Inhibition of odontogenic differentiation of human dental pulp cells by dental resin monomers. *Biomater Res* 19:1–7.
<https://doi.org/10.1186/s40824-015-0030-6>
 14. Davydenko V, Starchenko I, Davydenko A, *et al* (2018) The impact of the acrylic monomer on the morphological structure of rat lingual mucosa. *Georg Med News* 278:146–151
 15. Pagano S, Coniglio M, Valenti C, *et al* (2019) Biological effects of resin monomers on oral cell populations: descriptive analysis of literature. *Eur J Paediatr Dent* 20:224–232. <https://doi.org/10.23804/ejpd.2019.20.03.11>.
 16. Schmalz G, Widbiller M, Galler KM (2017) Signaling Molecules and Pulp Regeneration. *J Endod* 43:S7–S11. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.003>
 17. Dursun E, Fron-Chabouis H, Attal J-P, Raskin A (2016) Bisphenol A Release: Survey of the Composition of Dental Composite Resins. *Open Dent J* 10:446–453.
<https://doi.org/10.2174/1874210601610010446>
 18. Tavengwa NT, Hintsho N, Durbach S, *et al* (2016) Extraction of explosive

compounds from aqueous solutions by solid phase extraction using β -cyclodextrin functionalized carbon nanofibers as sorbents. *J Environ Chem Eng* 4:2450–2457. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.04.024>

19. Liu F, Yang X, Wu X, *et al* (2018) A dispersive magnetic solid phase microextraction based on ionic liquid-coated and cyclodextrin-functionalized magnetic core dendrimer nanocomposites for the determination of pyrethroids in juice samples. *Food Chem* 268:485–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.105>
20. Kang S, Herzberg M, Rodrigues DF, Elimelech M (2008) Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! *Langmuir* 24:6409–6413. <https://doi.org/10.1021/la800951v>
21. Al-Jumaili A, Alancherry S, Bazaka K, Jacob M (2017) Review on the Antimicrobial Properties of Carbon Nanostructures. *Materials (Basel)* 10:1066. <https://doi.org/10.3390/ma10091066>
22. Weiss P, Layrolle P, Clergeau LP, *et al* (2007) The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. *Biomaterials* 28:3295–3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.006>
23. Lee H-H, Sang Shin U, Lee J-H, Kim H-W (2011) Biomedical nanocomposites of poly(lactic acid) and calcium phosphate hybridized with modified carbon nanotubes for hard tissue implants. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 98B:246–254. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31846>
24. Gonçalves N de L, Borges VM, de Arruda JAA, *et al* (2020) Antimicrobial effects of photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* biofilm grown on a specific acrylic resin surface for ocular prostheses. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 32:. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102042>
25. Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM (2009) Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass® conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials* 30:3542–3550. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.019>

26. International Organization for Standardization TC (2009) Dentistry polymer-based restorative materials. Geneva
27. Commission Internationale de l'Eclairage (1978) Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Paris
28. Hernadi K, Fonseca A, Nagy JB, *et al* (1996) Fe-catalyzed carbon nanotube formation. *Carbon* N Y 34:1249–1257. [https://doi.org/10.1016/0008-6223\(96\)00074-7](https://doi.org/10.1016/0008-6223(96)00074-7)
29. Satishkumar BC, Govindaraj A, Rao CNR (1999) Bundles of aligned carbon nanotubes obtained by the pyrolysis of ferrocene–hydrocarbon mixtures: role of the metal nanoparticles produced in situ. *Chem Phys Lett* 307:158–162. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(99\)00521-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(99)00521-7)
30. Mahdhaoui K, Fournier B, Derbanne MA (2017) Unbound monomers do diffuse through the dentin barrier. *Dent Mater* 33:743–751. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.04.007>
31. Vining KH, Scherba JC, Bever AM, *et al* (2018) Synthetic Light-Curable Polymeric Materials Provide a Supportive Niche for Dental Pulp Stem Cells. *Adv Mater* 30:1704486. <https://doi.org/10.1002/adma.201704486>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo experimental *in vitro* foi delineado para responder à seguinte questão: a incorporação de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em baixas concentrações pode melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas de um polímero odontológico?

A partir dos resultados encontrados, pode se observar que em concentrações baixas, o nanotubo de carbono de paredes múltiplas melhorou as propriedades mecânicas do polímero.

O fato de o polímero ter apresentado atividade antimicrobiana e ter promovido mineralização celular, nos mostra um achado muito interessante, pois materiais odontológicos com essa propriedade tem um papel promissor, uma vez que a odontologia tem se tornado cada vez mais conservadora e esta estimulação do reparo tecidual pode prevenir tratamentos mais invasivos, ainda mais se tratando de um material adesivo.

Diante disso, aumenta o interesse por novos estudos, como no aprimoramento de primers e adesivos dentinários com nanotubos de carbono, para tentar extrair todo potencial que esse tipo de material pode apresentar.

REFERÊNCIAS

4^a (ED.). **International Organization for Standardization, Technical Committee. ISO/TC 106/SC 1. Dentistry polymer-based restorative materials (ISO 4049).** Geneva: [s.n.].

AL-JUMAILI, A. *et al.* Review on the antimicrobial properties of Carbon nanostructures. **Materials**, v. 10, n. 9, p. 1–26, 2017.

ABARRATEGI A.; GUTIÉRREZ M.C.; MORENO-VICENTE C.; HORTIGÜELA M.J.; RAMOS V.; LÓPEZ-LACOMBA J.L.; FERRER M.L.; DEL MONTE F. Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes. **Biomaterials**, v. 29, n. 1, p. 94-102, 2008.

ARAÚJO, R. G. Compósitos PVC/Nanotubos de carbono: Preparação e caracterização de propriedades elétricas, térmicas e mecânicas. Tese – Engenharia e Ciências dos Materiais – UFSC, 103p, Florianópolis, set. 2010.

ATAI M.; WATTS, D. C. A new kinetic model for the photopolymerization shrinkage-strain of dental composites and resin-monomers. **Dent Mater**, v. 22, n. 8, p. 785-91, 2006.

BEUN, S.; GLORIEUX, T.; DEVAUX, J.; VREVEN, J.; LELOUP, G. Characterization of nanofilled compared to universal and microfilled composites. **Dental Materials**, v. 23, n.1, p. 51-9, 2007.

BLUM, I. R.; ÖZCAN, M. Reparative Dentistry: Possibilities and Limitations. **Current Oral Health Reports**, v. 5, n. 4, p. 264–269, 2018.

BORGES, A. L. S. *et al.* Effect of random/aligned nylon-6/MWCNT fibers on dental resin composite reinforcement. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 48, p. 134–144, 2015.

BOWEN, R.L. Use of epoxy resins in restorative materials. **J Dent Res**, n. 35, v. 3, p. 360-9, 1956.

BRIEN, E. O.; DOLINOY, D. C.; MANCUSO, P. Perinatal Bisphenol A Exposures Increase Production of Pro-inflammatory Mediators in Bone Marrow-derived Mast Cells of Adult Mice. **J Immunotoxicol**, v. 11, n. 3, p. 205–212, 2015.

BUONOCORE, M.G. A simple method for increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. **J Dent Res**, v. 34, n.6, p.849-53, 1955.

CAO, W. *et al.* Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 11, 2018.

DAUVILLIER, B. S. *et al.* Visco-elastic parameters of dental restorative materials during setting. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 3, p. 818–823, 2000.

DAVYDENKO V, STARCHENKO I, DAVYDENKO A, TRUFANOVA V, K. V. THE IMPACT OF THE ACRYLIC MONOMER ON THE MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF RAT LINGUAL MUCOSA. **Georgian Med News**, v. 278, p. 146–151, 2018.

DE OLIVEIRA, D. C. R. S. *et al.* Evaluation of phenyl-propanedione on yellowing and chemical-mechanical properties of experimental dental resin-based materials. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 6, p. 555–560, 2016.

DEWAELE, M.; TRUFFIER-BOUTRY, D.; DEVAUX, J.; LELOUP, G. Volume contraction in photocured dental resins: the shrinkage-conversion relationship revisited. **Dent Mater**, v. 22, n. 4, p. 359-65, 2006.

DICKENS, S.; STANSBURY J.; CHOI K.; FLOYD C. Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. **Macromolecules**, v. 36, n. 16, p. 6043-53, 2003.

FERRACANE, J. L. Resin composite - State of the art. **Dental Materials**, v. 27, n. 1, p. 29–38, 2011.

DURSUN, E. *et al.* Bisphenol A Release: Survey of the Composition of Dental Composite Resins. **The Open Dentistry Journal**, v. 10, n. 1, p. 446–453, 2016.

EBBESEN, T.W., AJAYAN, P.M. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. **Nature**, v. 358, n. 6383 p. 220-222, 1992.

FLOYD, C. J.; DICKENS, S. H. Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. **Dent Mater**, v. 22, n. 12, p. 1143-9, 2006.

FREITAS, P. H. *et al.* Physicochemical properties, metalloproteinases inhibition, and antibiofilm activity of doxycycline-doped dental adhesive. **Journal of Dentistry**, v. 104, n. December 2020, p. 1–10, 2021.

GONÇALVES, N.L.; BORGES, V.M.; DE ARRUDA, J.A.A.; *et al.* Antimicrobial effects of photodynamic therapy on *Staphylococcus aureus* biofilm grown on a specific acrylic resin surface for ocular prostheses. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.32, 2020.

HERNADI, K. *et al.* Fe-catalyzed carbon nanotube formation. **Carbon**, v. 34, n. 10, p. 1249–1257, 1996.

HERNADI, K. *et al.* Fe-catalyzed carbon nanotube formation. **Carbon**, v. 34, n. 10, p. 1249–1257, 1996.

JABEEN, S. *et al.* A Review on Polymeric Nanocomposites of Nanodiamond, Carbon Nanotube, and Nanobifiller: Structure, Preparation and Properties. **Polymer - Plastics Technology and Engineering**, v. 54, n. 13, p. 1379–1409, 2015.

JAURIS, I. *et al.* Produção De Nanotubos De Carbono Via Técnica De Deposição Química De Vapor. **Disc. Scientia**, v. 12, n. 1, p. 125–137, 2011.

KANG, S. *et al.* Antibacterial effects of carbon nanotubes: Size does matter! **Langmuir**, v. 24, n. 13, p. 6409–6413, 2008.

KIM, K. I. *et al.* Carbon nanotube incorporation in PMMA to prevent microbial adhesion. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

KOOTTATHAPE, N. *et al.* Quantitative wear and wear damage analysis of composite resins in vitro. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 508–516, 2014.

KRUPKE R., HENNRICH FH., LOHNEYSEN V, KAPPES MM. Separations of metallic from semiconducting single-walled carbon nanotubes. **Science**, 2003.

KWON, J. H. *et al.* Inhibition of odontogenic differentiation of human dental pulp cells by dental resin monomers. p. 1–7, 2015.

LEE, H. H. *et al.* Biomedical nanocomposites of poly(lactic acid) and calcium phosphate hybridized with modified carbon nanotubes for hard tissue implants. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 98 B, n. 2, p. 246–254, 2011.

LI, X. *et al.* Resin composites reinforced by nanoscaled fibers or tubes for dental regeneration. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LIU, F. *et al.* A dispersive magnetic solid phase microextraction based on ionic liquid-coated and cyclodextrin-functionalized magnetic core dendrimer nanocomposites for the determination of pyrethroids in juice samples. **Food Chemistry**, v. 268, n. June, p. 485–491, 2018.

LOHBAUER, U.; BELLI, R.; FERRACANE, J. L. Factors involved in mechanical fatigue degradation of dental resin composites. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 584–591, 2013.

MAHDHAOUI, K.; FOURNIER, B.; DERBANNE, M. A. Unbound monomers do diffuse through the dentin barrier. **Dental Materials**, v. 33, n. 6, p. 743–751, 2017.

MAKAR, J.; BEAUDOIN, J. Carbon nanotubes and their application in the construction industry. **Roy Soc Chem**, v. 292 p. 331-342, 2003.

MAKVANDI, P. *et al.* Polymeric and inorganic nanoscopic antimicrobial fillers in dentistry. **Acta Biomaterialia**, v. 101, p. 69–101, 2020.

MARCONDES, C. G. N. *et al.* Revista ALCONPAT. p. 96–113, 2015.

MARTINS-JÚNIOR, P. A. *et al.* Carbon nanotubes: Directions and perspectives in oral regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 7, p. 575–583, 2013.

MUNK, M.; CAMARGO L. S. A.; QUINTÃO, C. C. R.; SILVA, S. R.; SOUZA, E. D.; RAPOSO, N. R. B.; MARCONCINI, J. M.; JORIO, A.; LADEIRA, L. O.; BRANDÃO, H. B. Biocompatibility assessment of fibrous nanomaterials in mammalian embryos. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, V. 12, P. 1151–1159, 2016.

New American Dental Association specification no. 27 for direct filling resins. Council on Dental Materials and Devices. **J Am Dent Assoc**, v. 94, n. 6, p. 1191–4, 1977.

NIESSEN, R.A.H. ; JONGE, J.; DE, NOTTEN, P.H.L. The electrochemistry of carbon nanotubes : I, aqueous electrolyte. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 153, n.8, p.1484-1491, 2006.

PAGANO, S. *et al.* Biological effects of resin monomers on oral cell populations: Descriptive analysis of literature. **European Journal of Paediatric Dentistry**, v. 20, n. 3, p. 224–232, 2019.

PEUTZFELT, A. Resin composite in dentistry; the monomer systems. **European Journal Oral Science**, v. 105, n.2, p. 97-116, 1997.

PIELICHOWSKI, K. *et al.* Thermal decomposition of the copolymers based on long-chained diol dimethacrylates and BIS-GMA/TEGDMA. **Thermochemica Acta**, v. 307, n. 2, p. 155–165, 1997.

PIENKOWSKI, D. A.; ANDREWS, R. J. Polymethylmethacrylate augmented with carbon nanotubes. **US Patent 6,872,403**, 2005.

PRASHANTHA, K.; BARALU, J.; RASHMI, Lee, J. H. Lee. Preparation and characterization of carbon nanotube filled poly (2-hydroxyethylmethacrylate) nanocomposites. **High Perform. Polym.**, v.25, p. 97-103, 2013.

RUEGGERBERG FA. From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. **J Prosthet Dent**, v. 87, n. 4, p. 364-79, 2002.

SAEB, M. R. *et al.* Cure kinetics of epoxy nanocomposites affected by MWCNTs functionalization: A review. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

SARRET, D. Clinical challenges and the relevance of materials testing for posterior composite restorations. **Dent Mater**, v. 21, p. 9–20, 2005.

SATISHKUMAR, B. C.; GOVINDARAJ, A.; RAO, C. N. R. Bundles of aligned carbon nanotubes obtained by the pyrolysis of ferrocene-hydrocarbon mixtures: Role of the metal nanoparticles produced in situ. **Chemical Physics Letters**, v. 307, n. 3–4, p. 158–162, 1999.

SAURO, S. *et al.* The effect of dentine pre-treatment using bioglass and/or polyacrylic acid on the interfacial characteristics of resin-modified glass ionomer cements. **Journal of Dentistry**, v. 73, p. 32–39, 2018.

SCHMALZ, G.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. **Biocompatibility of Dental Materials**. Springer; 2009.

SIDERIDOU I, TSERKI V, PAPANASTASIOU G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. **Biomaterials**, v.23. n.8, p. 1819-29, 2002.

TASIS, D. *et al.* Chemistry of Carbon Nanotubes. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 1105–1136, 2006.

TAVENGWA, N. T. *et al.* Extraction of explosive compounds from aqueous solutions by solid phase extraction using β -cyclodextrin functionalized carbon nanofibers as sorbents. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 2450–2457, 2016.

TONELLI, F. M. P.; GOULART, V. A. M.; GOMES, K. M.; LADEIRA, M. S.; SANTOS, A. K.; LORENÇON, E.; LADEIRA, L. O.; RESENDE, R. R. Graphene-based nanomaterials: biological and medical applications and toxicity. **Nanomedicine (Lond.)**, V. 10, N. 15, P. 2423–2450, 2015.

TSIGKOU, O. *et al.* Biomaterials Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass \bar{O} conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. **Biomaterials**, v. 30, n. 21, p. 3542–3550, 2009.

TURAGAM, N.; PRASAD MUDRAKOLA, D. Effect of Micro-Additions of Carbon Nanotubes to Polymethylmethacrylate on Reduction in Polymerization Shrinkage. **Journal of Prosthodontics**, v. 22, n. 2, p. 105–111, 2012.

VALVERDE, T. M. *et al.* A novel 3D bone-mimetic scaffold composed of collagen/MTA/MWCNT modulates cell migration and osteogenesis. **Life Sciences**, v. 162, p. 115–124, 2016.

VAN DE SANDE, F. H. *et al.* Patient Risk Factors– Influence on Survival of Posterior Composites. **Journal of Dental Research**, v. 92, p. S78–S83, 2013.

VINING, K. H. *et al.* Synthetic Light-Curable Polymeric Materials Provide a Supportive Niche for Dental Pulp Stem Cells. **Advanced Materials**, v. 30, n. 4, p. 1–9, 2018.

WANG, R. *et al.* Characterization of multiwalled carbon nanotube-polymethyl methacrylate composite resins as denture base materials. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 111, n. 4, p. 318–326, 2014.

WANG, W. *et al.* Effective reinforcement in carbon nanotube-polymer composites. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 366, n. 1870, p. 1613–1626, 2008.

WEISS, P. *et al.* The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in a human clinical trial. **Biomaterials**, v. 28, n. 22, p. 3295–3305, 2007.

YACAMAN, M., MIKI-YOSHIDA, M., RENDON, L. & Santiesteban, J. G. Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure, **Appl. Phys.** 1993.

YLI-URPO, H. *et al.* Compressive strength and surface characterization of glass ionomer cements modified by particles of bioactive glass. **Dental Materials**, v. 21, n. 3, p. 201–209, 2005.

ZENG, W.; LIU, F.; HE, J. Physicochemical Properties of Bis-GMA/TEGDMA Dental Resin Reinforced with Silanized Multi-Walled Carbon Nanotubes. **Silicon**, v. 11, n. 3, p. 1345–1353, 2018.

ZHANG, F. *et al.* Surface modification and microstructure of single-walled carbon nanotubes for dental resin-based composites. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 86, n. 1, p. 90–97, 2007.

ZHANG, K. *et al.* Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 4, p. 669–687, 2017.

ZIVKOVI'Ć S.; BOJOVI'Ć S.; PAVLICA D. Bacterial penetration of restored cavities. **Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology**, v. 91, p. 353–358 2001.

APÊNDICE A- Ensaio de Formação de halo de inibição

Metodologia

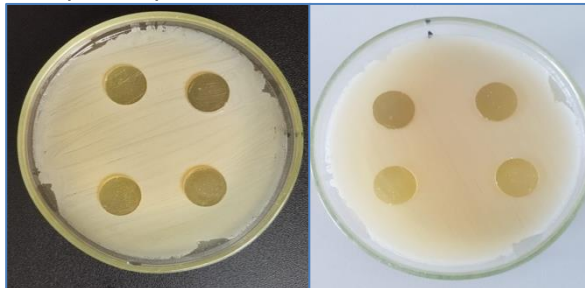
Para esta análise, oito corpos-de-prova de cada grupo foram confeccionados em forma de discos apresentando 15 mm de diâmetro por 1 mm de espessura. Previamente à incubação, os corpos de prova foram esterilizados com óxido de etileno.

O meio Muller-Hinton (Difco®) foi pesado e hidratado de acordo com as recomendações do fabricante, e submetido à esterilização pelo calor úmido em autoclave a 120°C por 20 min. Após esse processo, o meio foi resfriado em banho-maria até atingir a temperatura de 50°C. Aproximadamente 20 ml do meio de cultura foram distribuídos em oito placas de Petri (90 mm/15 mm). Estas placas ficaram em temperatura ambiente até que resfriassem, em seguida foram embaladas com plástico PVC transparente e mantidas em recipiente próprio durante 24 horas para verificar a esterilidade da placa. Decorrido esse prazo, foram preparadas as suspensões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25193) a serem testadas em solução. O inóculo bacteriano foi diluído em solução salina e ajustado na escala 0,5 de MacFarland e em seguida foram semeados nas placas com o auxílio de um Swab. Foram colocados quatro discos do compósito em cada placa, sendo um disco de cada grupo. Em seguida, as placas foram encubadas a 37°C por 24h de acordo com as instruções do CLSI 2017 (*Clinical & Laboratory Standards Institute*).

Resultado e discussão

Na análise antibacteriana não se observou a formação de halo de inibição para *S. aureus* em nenhum dos grupos estudados (Figura 3).

FIGURA 3 – Corpos de prova sobre o biofilme bacteriano de *S. aureus*



Fonte: Do autor, 2020.

Vários estudos tem mostrado a capacidade antimicrobiana dos nanotubos de carbono (KANG *et al.*, 2008; HUI *et al.*, 2014; AL-JUMAILI *et al.*, 2017). Apesar do *Staphylococcus aureus* não ter a cavidade oral como seu habitat normal, ele tem sido isolado a partir do biofilme dental, particularmente de pacientes com infecção respiratória. É comprovado que dadas as condições orais adequadas, o *Staphylococcus aureus* pode constituir parte da microbiota oral (THURNHEER; BELIBASAKIS, 2014). Neste estudo, nenhuma das amostras apresentaram a formação de halo inibitório. Este resultado talvez possa ser explicado pela dificuldade de lixiviação do material, sendo necessária assim, a realização de outros métodos para avaliação da sua atividade antibacteriana.