

U. PORTO



Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica
do
Mestrado integrado em Medicina Dentária

Adesivos Dentários com propriedades bioativas e antimicrobianas

Revisão Bibliográfica

João Pedro Aguiar Gonçalves

Porto, 18 de Julho de 2014

Adesivos Dentários com propriedades bio-activas e anti-microbianas

Revisão Bibliográfica

João Pedro Aguiar Gonçalves *

João Cardoso Ferreira **

*Estudante 5º ano Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Porto

**Orientador: Assistente Convidado na Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade do Porto

Goncalves.joaopedro@gmail.com

Porto, 18 de Julho de 2014

Agradecimentos

Agradeço há minha família por todo o apoio e conforto que me oferecem todos os dias

Agradeço ao Professor João Cardoso Ferreira por aceitar acompanhar supervisionar e na elaboração desta monografia

Agradeço à faculdade e a todos os meus amigos que contribuem indiretamente mas de forma continua para o meu bem-estar e felicidade

Resumo:

Objetivos: A presente revisão bibliográfica tem o objetivo de rever toda a literatura acerca dos novos sistemas adesivos com propriedades bioativas ou anti-microbianas bem como descrever as suas principais características e propriedades.

Materiais e Métodos: Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados digitais: *PubMed*, *Science Direct* dos últimos dez anos, na língua portuguesa e inglesa. Posteriormente os artigos encontrados foram revistos de forma a encontrar artigos relevantes adicionais.

Desenvolvimento: A adesão desempenha um papel fulcral para o sucesso e longevidade das restaurações, contudo, e apesar de uma evolução notável nos anos recentes, a interface de adesão continua a ser o componente mais frágil e suscetível. A introdução de agentes com propriedades antimicrobianas e bioativas vem responder às várias limitações encontradas nos adesivos possuindo a habilidade para eliminar bactérias residuais presentes nas cavidades bem como capacidade remineralizante inédita até ao momento. Os derivados de sais de amónio quaternário (QAS) exibem excelentes propriedades bactericidas *in vitro* e bacteriostática *in vivo* e por serem monómeros resinosos conseguem ser facilmente incorporados e copolimerizados em sistemas de adesivos atuais sem comprometer as propriedades mecânicas dos mesmos. A evolução no campo da nanotecnologia traz ao ramo da medicina dentária estratégias alternativas adicionais no combate antibacteriano com as nanopartículas de prata a exercerem um efeito inibitório adicional quando associadas a sais de amónio. As nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo exibem um grande potencial remineralizante por saturação de iões cálcio e o fosfato na dentina.

Conclusões: A evolução científica no campo dos biomateriais traz consigo novos tipos de estratégias no combate antibacteriano. A eficácia comprovada e evolução demarcada dos compostos derivados de sais quaternários de amónio já culminou com a comercialização de um novo adesivo e abre portas para o aparecimento de materiais mais recentes com propriedades melhoradas. Com a introdução das nanopartículas e sua utilização simultânea com os QAS

referidos parece aumentar ainda mais o efeito antibacteriano assim como criar novas alternativas bioativas com capacidades de remineralizar lesões dos tecidos dentários.

Palavras-chave: “adhesive”, “antibacterial”, “bioactive”, “bactericide”, “quaternary ammonium salts”, “MDPB”, “DMAE-CB”, “QADM”, “nanoparticles”, “NACP”

Abstract:

Objective: This review aims to review all the literature on new adhesives with bioactive and anti-bacterial proprieties and describe their main characteristics and properties.

Materials and Methods: The search was performed in digital databases: PubMed, Science Direct in the last ten years, in Portuguese and English languages. Later the articles were reviewed to find additional relevant articles in their references.

Development: The adhesion plays a crucial role in the success and longevity of restorations, however, and despite remarkable progress in recent years, the interface adhesion remains the most fragile and susceptible component in the restoration. In response to several limitations found in adhesives the introduction of bioactive agents with antimicrobial properties unfolds the ability to eliminate residual bacteria left in the cavities as well as remineralize decayed tooth structure. Quaternary ammonium salts exhibit excellent bactericidal properties *in vitro* and bacteriostatic *in vivo* and being resin monomers they can be easily incorporated and copolymerized into current adhesive systems without compromising the mechanical properties of the host material. Developments in the field of nanotechnology brings to the dentistry field alternative strategies to combat microorganism. Silver nanoparticles exert an additional inhibitory effect when combined with ammonium salts. Nanoparticles of amorphous calcium phosphate can exhibit great potential to remineralize decayed tooth structures.

Conclusion: The scientific developments in the field of biomaterials brings new types of antibacterial strategies in to play. The proven efficacy and demarcated evolution of compounds derived from quaternary ammonium salts has led to the marketing of a new adhesive and opens doors to the emergence of newer materials with improved properties. With the introduction of nanoparticles and their simultaneous use with QAS appears to

further increase the antibacterial effect as well as create new alternatives dental materials with bioactive capabilities to remineralize tooth lesions.

Key-words: “adhesive”, “primer”, “antibacterial”, “bioactive”, “bactericide”, “quaternary ammonium salts”, “MDPB”, “DMAE-CB”, “QADM”, “nanoparticles”, “NACP”

Índice

Introdução:.....	1
Material e Métodos:.....	4
1. Limitações dos Sistemas Adesivos Atuais.....	5
2. Derivados de sais de Amónio Quaternário.....	8
2.1 MDPB.....	9
2.2 DMAE-CB.....	13
2.3 QADM.....	14
3. Nano partículas.....	18
4. Biomimetização.....	22
Discussão.....	24
Conclusão.....	26
Bibliografia.....	27
ANEXOS.....	30

Introdução:

O ramo da medicina dentária dirigido ao tratamento da cárie dentária e respetiva restauração estética e funcional é denominado dentisteria restauradora e está, atualmente, conquistado pelas resinas compostas. Este material restaurador inicialmente utilizado apenas por razões estéticas tem sofrido uma grande evolução nos últimos anos sendo atualmente o material restaurador de eleição para maior parte das restaurações diretas realizadas pelo médico-dentista na sua atividade profissional. [1] Todavia, este material possui algumas limitações como a contração/polimerização residual, acumulação substancial de biofilme bacteriano e relativa baixa longevidade por perda de adesão. [2] Estas limitações juntamente com outras variáveis podem culminar no aparecimento de cáries secundárias que continuam a ser a principal causa de fracasso da restauração. [3]

A adesão desempenha um papel fulcral para o sucesso e longevidade das restaurações, contudo e, apesar de uma evolução notável nos anos recentes, a interface de adesão continua a ser o componente mais frágil e suscetível. Os dois tipos de sistemas adesivos atuais atuam de forma a envolver a *smear-layer* no processo adesivo (*self-etch*) ou remove-la por completo (*etch-and-rinse*), sendo que nos dois casos o sucesso da restauração traduz-se pela formação de uma camada híbrida de boa qualidade. Adesão ao esmalte está bem documentada e considerada segura, contudo o mesmo não se verifica para a dentina, sendo esta um substrato bastante mais complexo e com humidade presente. Não é do âmbito deste artigo comparar os tipos de adesivos atuais, contudo está devidamente documentada a relevância da otimização deste material restaurador. Os insucessos das restaurações por microinfiltração marginal devido a exposição da interface dentina/adesivo são bastante frequentes (cárie secundária).[4, 5] Contudo, o bom selamento marginal não é a única variável em jogo uma vez que a incompleta infiltração

dos monómeros adesivos nos nanoespaços interfibrilares vai deixar as fibras de colagénio expostas para serem degradadas hidroliticamente por metaloproteinases da matriz (MMP's), comprometendo adicionalmente o sucesso da restauração.[6]

É então de grande importância desenvolver adesivos que contenham agentes antibacterianos de forma a combater estes fenómenos. Sobre estes novos tipos de adesivos, a literatura científica atual revela novos agentes à base de sais quaternários de amónio (Quaternary ammonium salts, QAS) com alta atividade antimicrobiana. Entre os mais conhecidos destes monómeros e pioneiro neste ramo, o brometo de 12-metacrilóiloxidocecilpridinium, mais conhecido por MDPB, demonstrou alta eficácia antibacteriana. Desde então diversos novos monómeros têm aparecido com características melhoradas quer a nível de atividade antibacteriana quer a nível de propriedades relacionadas com adesão, de referenciar o cloreto de metacrilóxiethyl cetil dimetilamonio (DMAE-CB), metacrilato de dimetilaminodecil (DMADDM) e dimetacrilato de dimetilamonioetil (DMAEDM).

Um grande benefício destes agentes comparativamente a estratégias antigas antimicrobianas é o facto de estes agentes serem bactericidas-fixos (incorporados no sistema adesivo e polimerizados simultaneamente). Ao não serem libertados/secretados do material hospedeiro durante função o que podia comprometer a longevidade da restauração assim como limitar o tempo de ação do agente, estes materiais demonstram ser promissores na possibilidade de desenvolver uma dentisteria cada vez menos invasiva e mais conservadora assim como assegurar uma proteção mais adequada do complexo pulpar resultando numa maior durabilidade da restauração. Até à data da redação deste artigo o único adesivo disponível comercialmente é o *ClearFill Protect Bond*[®], Kurakay

Medical contendo na sua composição o MDPB, monómero mais estudado e com propriedades devidamente documentadas. [7, 8]

Recentemente e com a evolução no campo da nanotecnologia começa a surgir na literatura o relato de vários laboratórios a sintetizar nanopartículas com grande capacidade bactericida. A prata, o óxido de titânio (TiO₂) têm demonstrado bons resultados quanto à inibição do crescimento bacteriano quando incorporados em adesivos dentários. Para além disso, nanopartículas de fosfato de cálcio (CaP) também foram desenvolvidas com o objetivo de, além de inibir atividade bacteriana, também possuir capacidade de remineralizar cáries residuais deixadas voluntária ou involuntariamente na preparação dentária. [9, 10]

Uma outra via de abordagem na procura de materiais bioativos e antibacterianos advém da mimetização da remineralização realizada continuamente pela natureza durante toda a vida de um indivíduo. Este modelo de remineralização vai contra a estratégia convencional de remineralização da dentina, pois esta última não é capaz de remineralizar dentina desmineralizada. Assim e através de nanopartículas amorfas de fosfato de cálcio estabilizadas por análogos biomiméticos de proteínas não colágenas, vários autores confirmam o potencial remineralizador, eficaz em camadas híbridas defeituosas e até em dentina cariada.[11]

O objetivo deste artigo será rever toda a literatura existente sobre agentes bioativos e antimicrobianos capazes de serem incorporadas em adesivos dentários e o futuro da investigação no sentido de colmatar problemas associados com uma adesão inadequada.

Material e Métodos:

A pesquisa da literatura foi realizada através das bases de dados digitais *Pubmed*, *Science Direct*, *Scopus* e *Thomson Reuters (ISI) Web of Science*.

Foram utilizadas diferentes combinações das palavras-chave: ‘dental adhesive’, ‘adhesive’, ‘bio-active’, ‘bonding’, ‘antibacterial’, ‘monomer’ e ‘nanoparticles’. Mesh-Terms: ‘Dental adhesive’, ‘tooth remineralization’.

Nos critérios de inclusão foi aceite qualquer tipo de artigo desde casos clínicos a revisões bibliográficas, escritos em português, espanhol e inglês, dentro dos últimos 10 anos. O ranking de Jounarls da *SCImago Journal and Country Ranking* foi consultado de forma a seleção ser dirigida para revistas de maior prestígio científico.

Os artigos selecionados foram revistos assim como a sua bibliografia na procura adicional de artigos. Primeiramente, estudou-se o estado de arte dos sistemas de adesivos utilizados atualmente em Medicina Dentária e suas principais limitações e só depois se realizou a revisão da literatura sobre adesivos atuais com propriedades bioactivas e antimicrobianas.

45 artigos

• Pesquisa Inicial com *keywords e preferencias referidas*

71 artigos

• Depois de realizada revisão das referencias de artigos relevantes

53 artigos

• Artigos selecionados

1. Limitações dos Sistemas Adesivos Atuais

O objetivo na obtenção de uma boa adesão nos sistemas adesivos atuais traduz-se numa eficaz infiltração dos monómeros resinosos no substrato dentário de forma a obter uma camada híbrida (*hybrid layer*), homogênea e de boa qualidade pelo encapsulamento correto das fibrilas de colagénio e nano espaços interfibrilares. A formação desta camada no esmalte (que não possui colagénio) é segura e previsível, contudo é na dentina que se encontram os grandes obstáculos na adesão dos materiais adesivos. [1]

No início do processo adesivo, através de sistemas *etch-and-rinse*, a dentina é constituída essencialmente por 50 vol.% mineral, 30 vol.% colagénio e 20 vol.% água. Após condicionamento ácido (Ácido Fosfórico 37%), os 50% da fase mineral vão ser solubilizados e dissolvidos e substituídos por água (*rinse*) ficando a dentina desmineralizada com 30 vol.% de fibrilas de colagénio ainda ancoradas a dentina mineralizada envolvidas por 70 vol.% de água.[4] Esta água seria idealmente substituída por completo por co-monómeros resinosos do adesivo que juntamente com o colagénio exposto formariam a camada híbrida, contudo a remoção da água e infiltração eficaz nem sempre é conseguida conforme afirmam diversos autores. [5, 6, 12]

Um efeito secundário notável do condicionamento ácido é também a ativação de metaloproteinases (MMP's) presentes na dentina, nomeadamente MMP-2 e MMP-9. Esta família de proteínas proteolíticas têm como função degradar hidroliticamente a matriz orgânica da dentina desmineralizada (colagénio). A sua secreção por odontoblastos na forma de proenzimas não lhes permite entrar em função requerendo a presença de ácido para sua verdadeira ativação. Infelizmente os sistemas adesivos modernos de ambos os tipos (*Self e Etch-and-Rinse*) demonstram capacidade ativadora. Infiltração inadequada e incompleta por parte dos comoneros resinosos vai deixar caminho livre para a atividade

hidrolítica por parte das MMP's tornando-se outra grande limitação que inevitavelmente influencia o sucesso final e longevidade de qualquer restauração. Esta atividade foi confirmada mesmo na ausência de atividade de collagenases bacterianas e é comprovada pelo adelgaçamento e desaparecimento de fibrilas de colagénio ineficazmente infiltradas. [3, 5, 12, 13]

Este ataque hidrolítico não acontece a apenas no colagénio, os próprios monómeros resinosos podem sofrer da mesma ação. Este problema é mais sério em adesivos com monómeros resinosos hidrofílicos, pois este fenómeno (hidrofilia) acontece exclusivamente na presença de água. Os adesivos com maior componente hidrofílica, independentemente do tipo de sistema utilizado, apresentam maior permeabilidade permitindo fluxos de água dentro da camada híbrida mesmo após a sua polimerização – fenómeno de nanoinfiltração. [4, 5]

A força combinada destas duas degradações aumenta substancialmente o volume de água dentro da camada híbrida enfraquecendo as características da adesão. Esta perda de qualidade é verificada por perda de resina nos espaços interfibrilares e desorganização das fibrilas de colagénio. [5]

Evaporação de alguns solventes do adesivo também pode trazer consigo água adicional criando zonas dentro da camada híbrida pobres em resina e ricas em água. Está descrito que o tempo discriminado pelos fabricantes não é suficiente para evaporar sequer metade do volume total solvente. Estas zonas ricas em água parecem evoluir de tamanho com o tempo provocando o 'envelhecimento' precoce da camada híbrida e consequente adesão. [4, 14]

Atualmente e com a ajuda da evolução tecnológica contemporânea já é possível observar e até manipular à escala nanométrica (10^{-9}). Um estudo encontra vários obstáculos e

paradigmas no conceito de adesão atual a nível molecular. A água parece desempenhar um papel crucial na manutenção da estrutura e conformação normal do colagénio tipo I pela formação de cilindros de hidratação que configuram a sua forma de tripla hélice. Referem ainda que o arranjo microfibrilar do colagénio tipo I é constituído por um espaço intermolecular de 1,3nm que é pequeno demais para acomodar a mais pequena molécula de monómero resinoso atual. O espaço intermolecular não só é demasiado pequeno como é ocupado intrinsecamente por moléculas de água com fortes ligações que podem ser um fator major na contribuição para a degradação hidrolítica do colagénio e da resina. Este estudo demonstra ainda que a zona de ligação ao colagénio pelas MMP's está, em condições normais, protegido. Isto levanta a questão de um suposto dano à estrutura do colagénio aquando da sua desmineralização para a tornar suscetível de ser degradada. [14]

A contribuição dos proteoglicanos, estruturas responsáveis pela manutenção da rede de colagénio, e o seu papel na adesão dentária, também não está bem definido. Estes espaços interfibrilares são zonas onde a difusão de moléculas de água é facilitada dado a natureza hidrofílica destas proteínas. Estas moléculas encontram-se ligadas as fibras de colagénio havendo um certo envolvimento das duas moléculas constituindo outra barreira à difusão dos monómeros para o espaço extra e intra-fibrilar do colagénio. [4, 14]

Todas as dificuldades dos adesivos atuais mencionadas vão comprometer seriamente o sucesso de uma restauração adesiva implicando maior facilidade de difusão e infeção bacteriana por cárie secundária.

2. Derivados de sais de Amónio Quaternário

Os derivados de sais de amónio quaternário surgem inicialmente em 1993 como uma alternativa aos métodos convencionais antimicrobianos de adição de agentes solúveis ao material e sua posterior libertação. Clinicamente, esta abordagem possui certas implicações como seja a deterioração do material por alteração dimensional e período de ação limitado. A criação do 12-metacrioiloxidecáilpirido (MDPB), 1º monómero antibacteriano – análogo de cloreto de cetilpiridínio (bactericida comprovado utilizado em dentífricos e colutórios), surge como inovação por introduzir o conceito de imobilização do bactericida, isto é, o agente antibacteriano está polimerizado na resina e não é libertado em função. Isto traduz-se em ligações mais forte dos componentes antibacterianos ao adesivo e inibição por contacto direto sem libertação de material. [7, 10]

A sua capacidade antibacteriana reside em dois aspetos importantes: no carácter anfipático (hidrofílicos e lipofílicos) destes monómeros possibilitando a fácil interação com a membrana e a sua carga positiva (catião) também confere características bactericidas permitindo romper a membrana celular bacteriana rápida e eficazmente resultando na morte da bactéria com extravasamento dos componentes intracelulares. [7]

Componentes quaternários de amónio (QAC) são um grupo de catiões derivado dos sais de amónia, estruturalmente possuem dois grupos ativos: o grupo QAC possui atividade antibacteriana enquanto o grupo metacrilato possibilita a sua copolimerização com monómeros atuais utilizados nos sistemas adesivos.[10]

Desde o MDPB várias investigações surgiram de forma a comprovar a sua eficácia assim como uma notável expansão na procura de novos monómeros com propriedades melhoradas.

2.1 MDPB

Desde a sua criação o 12-metacrioiloxydecacilpirido (MDPB) suscitou bastante interesse pela comunidade científica e devido aos seus efeitos antibacterianos promissores têm sido alvo de diversos estudos.

Atualmente é o monómero com mais literatura e a sua atividade antimicrobiana e incorporação num agente adesivo está bem comprovada, existindo disponível no mercado um adesivo (Cleafill Protect Bond™) com 5% MDPB na sua composição. O MDPB é eficaz na inibição da grande parte dos microrganismos presentes na cavidade oral, até mesmo bactérias ácido tolerantes como os *Lactobacilli*, devido à sua natureza antimicrobiana intrínseca. [15] A sua ação contra bactérias planctónicas (livres, que não agregaram na forma de placa bacteriana) na sua forma não polimerizada está bem comprovada sendo o MDPB capaz de matar espécies de *S.mutans* em cerca de 60s, atuando assim como um bactericida bastante eficaz. [16-18] Todavia, na sua forma polimerizada a sua ação reduz-se a bacteriostático, não eliminando bactérias mas inibindo a sua função. A imobilização das moléculas de monómero presas na rede adesiva e a sua falta de densidade na superfície de contato são razões válidas de assumir para a perda de qualidade do MPDB depois de polimerizado.[19]

A avaliação da eficácia a nível microbiológico é realizada através de testes de difusão em placas de agar e respectivo calculo da: MIC (*Minimun inhibitoy concentration*) e MBC (*Minimun Bacteriological Concentration*). Um consiste na concentração mínima inibitória de agente antimicrobiano capaz de mostrar efeitos inibitórios num dado organismo (MIC), o outro a concentração mínima de agente capaz de matar um organismo, sendo considerada a redução como a redução em 99,9% da inoculação bacteriana (MBC). Os valores MBC para diversos microrganismos da cavidade oral varia substancialmente dado a resistência de cada microrganismo à ação do monómero

possuindo valores entre 15,6 a 125µg/mL. Os valores para os principais microrganismos envolvidos de iniciar a cárie são: *S.mutans*: 50µg/mL , *S. Sanguinis*: 31.3µg/mL, *S.Sobrinus*: 62.5µg/mL, *Lactobacillus acidophilus*: 62.5µg/mL [16, 20] Mesmo em doses mais baixas que a concentração mínima de inibição (MIC), o MDPB consegue demonstrar atividade antimicrobiana sugerindo uma interferência a nível da mecânica enzimática da bactéria especialmente na atividade da lactato desidrogenase. O MDPB em concentrações mais elevadas consegue ser capaz de matar *S.mutans* mesmo na forma de biofilme. [18, 21]

Testes *in vitro* comprovam este poder antibacteriano em blocos de dentina humanos infectados por dentina. Esta dentina foi impregnada em suspensão bacteriana (*S mutans*, *L.Casei* e *A.viscosus*), de modo a reproduzir dentina contaminada artificial. Foi reportado que um *primer* contendo MDPB conseguia matar todas as bactérias quando aplicado por 20s. [22]

O MDPB foi testado *in vivo* em cães Beagle onde o mostrou grande sucesso na desinfecção da cavidade e manutenção da viabilidade das células odontoblásticas e vitalidade pulpar. Quando incorporado no *primer* mostrou capaz de eliminar bactérias presentes na cavidade. [23, 24] Estes estudos confirmam a relevância clinica do uso de MDPB como agente capaz de erradicar bactérias residuais deixadas na cavidade assim como preservar a vitalidade pulpar.

Métodos para examinar a correta formação de prolongamentos de resina (*resin tags*) dependem da observação através do microscópio eletrônico de varrimento (SEM) e microscópio eletrônico de transmissão (TEM). Um autor testa a incorporação de MDPB em *primer* e *bonding* revelando que este consegue efetivamente não interferir de forma negativa na adesão. A produção de 1-2µm de camada hibrida foi uniforme em todos os

adesivos experimentais testados, e apesar da formação mais curta de *tags* resinosos quando incorporado no *bonding*, não houve diferenças significativas em testes de resistência adesiva à microtração após 24h de armazenamento em água entre os adesivos.[25]

Este teste de resistência, *Microtensil Bond Strength*, serve para aferir sobre a qualidade da adesão dentária aplicando a amostra forças gradualmente maiores até a restauração fracassar. A técnica consiste no corte de dentes restaurados em lajes de 0.5-1mm contendo a interface adesiva, elas posteriormente serão formatadas de forma a que durante o teste a força seja preferencialmente concentrada neste local. O MDPB, parece não influenciar negativamente a adesão dentária sendo a sua resistência muito semelhante a adesivos atuais disponíveis no mercado, normalmente utilizados como controle. [26]

A sua penetração nos substratos dentários mostrou-se semelhante a adesivos convencionais, conseguindo num estudo o adesivo comercial, *Clearfil Protect Bond™*, penetrar cerca de 150µm em blocos de dentina.[27]

Um estudo testou a biodegradação durante o período de 3 meses da interface dentina/adesivo em dentina afetada por cárie (*S.mutans*). O mesmo refere que o MDPB não consegue prevenir a biodegradação da adesão, mostrado pela diminuição da força de resistência adesiva à microtração, apesar da formação de uma camada híbrida mais homogénea comparativamente ao controle. O controle (SBMP) mostrou a mesma perda de adesão não havendo diferenças estatisticamente significativas entre eles.v[28] Isto é confirmado por outros estudos que comparam resultados *in vitro/in vivo* na perda de resistência e degradação da interface adesiva. Os mesmos demonstram que o mecanismo de degradação é igual nos dois adesivos testados, sendo a formação de canais de água (*water trees*) no interior e próximo da camada híbrida um contribuidor major para a perda

de adesão. Apesar de o Clearfill Protect Bond™ ter mostrado formação de canais de água de maior dimensão que percorrem toda a camada adesiva, mostrou estabilidade na adesão mesmo após 1 ano na cavidade oral.[29]

Outra questão bastante importante na incorporação de qualquer monómero, como sendo o MDPB, a um agente resinoso pode ter consequências, pois monómeros com estruturas diferentes possuem taxas de polimerização diferentes. Isto pode levar a polimerizações deficitárias que condicionam a viabilidade da adesão. O MDPB, apesar de tudo, parece não interferir na polimerização quando adicionado numa percentagem até 5%. [17]

Certos estudos associam ainda o MDPB à inibição das Metaloproteinases (MMP's) através de testes em matrizes artificiais. O efeito inibitório do MDPB foi aproximadamente de 88% comparável ao kit inibitório providenciado contra a rhMMP-9, uma das MMP's presentes na dentina e a proteína testada neste estudo.[29] Esta atividade inibitória contribui e pode parcialmente explicar a criação de uma ligação mais duradoura entre o adesivo e o substrato dentinário quando comparado a adesivos convencionais. [30]

A biocompatibilidade destes monómeros foi também testada por parte da comunidade científica, pois muitos dos monómeros atuais mostram alguma toxicidade a nível celular, especialmente viabilidade odontoblástica e sua participação na mineralização. O MDPB foi reportado como aceitável para uso dentário, não apresentado maior toxicidade do que o TEGDMA e mais baixa do que o Bis-GMA, os principais monómeros usados nas resinas compostas atuais. Apesar da sua maior inibição de diferenciação de células odontoblásticas quando comparadas com outros monómeros, a influência negativa do MDPB na mineralização pelos odontoblastos foi mais baixa do que os restantes monómeros. [16, 31]

2.2 DMAE-CB

No seguimento do MDPB, vários outros estudos surgiram utilizando compostos à base de sais quarternários de amónio. Um desses estudos acabou por sintetizar um novo monómero promissor para incorporação em materiais dentários: DMAE-CB, cloreto de metacrioloxetil cetil dimetil de amónio, que foi adicionado a um adesivo comercial *etch and rinse* e tem demonstrado boas capacidades antibacterinas sem afectar negativamente a adesão. [7, 10] O conceito de atividade é em todo igual à do catião precursor com a sua carga negativa e propriedades da sua superfície ativa a exercer o efeito antibacteriano. DMAE-CB difere do MDPB por possuir uma cadeia hidrofóbica mais longa de 16 carbonos comparativamente aos 12 do MDPB. Como se irá observar posteriormente, o comprimento da cadeia hidrofóbica tem influência na atividade antimicrobiana.

O seu efeito bactericida foi testado *in vitro* através da sua diluição em suspensões bacterianas contendo diversos agentes, ou seja, na sua forma não polimerizada. O DMAE-CB conseguiu os melhores resultados dos resultados dos monómeros testados conseguindo MIC's entre 1.2-4.8µg/ml e MBC na região dos 2.4-9.6µg/ml para as bactérias testadas. Estes valores foram muito semelhantes aos valores de clorhexidina (CHX) utilizado como controlo neste estudo e mais baixos relativamente a outros estudos semelhantes utilizando o MDPB. [32] Na sua forma polimerizada, DMAE-CB parece exibir boa capacidade antibacteriana conferindo ao adesivo controlo, propriedades bacteriostáticas. O número de colónias de bactérias contadas (CFU) foi menor comparativamente ao controlo demonstrando atividade mesmo após 6 meses de armazenamento. [33]

Outro estudo *in vitro* testou a hipótese de o DMAE-CB diminuir a produção de biofilme bacteriano e interferir com a regulação do gene *gtf* em bactérias *Streptococcus mutans*. Este gene é relevante pois mostrou associação com a síntese de monómeros de glucose importante para formação de biofilme. Os resultados foram bastante satisfatórios tendo o

DMAE-CB atingindo valores estatisticamente significativos quer na inibição de biofilme bacteriano quer na supressão do gene *gff*. Neste estudo DMAE-CB mostrou novamente ser mais eficaz que o seu precursor MDPB. [34]

A sua influência na polimerização do material que podia repercutir-se nos estudos de resistência adesiva à microtração (*Microtensile bond strength*) parece ser inexistente. Todos os estudos encontrados, apesar de constatarem ligeiras diferenças nas médias da força de adesão comparativamente ao controlo, esta diferença não é estatisticamente significativa indicando a possível incorporação do DMAE-CB em adesivos sem compromisso de resistência. As forças de resistência adesiva com o monómero em causa originam uma média de 30 MPa em dentina humana preparada a partir de molares extraídos. [33, 35]

De acordo com a sua maior potência bactericida o DMAE-CB possui valores de toxicidades mais elevados. De facto quando incorporado no adesivo dentário parece não possuir virtualmente nenhuma toxicidade, contudo à medida que se aumenta a concentração esta consegue interferir negativamente na taxa de crescimento de celular. A dose letal₅₀ para o DMAE-CB compreende-se no intervalo entre 2-5µg/ml. [35] Assim como o MDPB estes valores de toxicidades apresentam-se muito semelhantes ao Bis-GMA podendo afirmar que o monómero antibacteriano não irá prejudicar a saúde se incorporado em materiais dentários.

2.3 QADM

Com a entrada do DMAE-CB a literatura sobre sais de quaternários de amónio parece ter suscitado interesse por parte de diversos investigadores na tentativa de sintetizarem novos monómeros com propriedades melhoradas.

Um problema do *QAM* (*Quaternary Amonium Metacrilatos*), como o MDPB e DMAE-CB, são estes possuírem apenas um grupo metacrilato, o que às vezes pode influenciar a sua interação com os restantes dimetacrilatos utilizados em Medicina Dentária (Bis-GMA, TEGDMA, UDMA) afetando propriedades como a viscosidade e sua correta incorporação. Com este conceito um grupo de investigadores decidiu sintetizar um monómero com a presença de dois grupos metracrilatos assim aumentando a densidade de grupos ativos na superfície de um adesivo ou resina e consequentemente melhorando o seu desempenho. A rede de polímero criado vai ter ligações mais fortes melhorando a sua resistência e taxa de degradação. Este novo QADM (*Quaternary Amonium Dimetacrylate*) obteve efeitos antibacterianos notáveis no seu estudo pioneiro. [36]

Vários dimetacrilatos experimentais surgiram desde o estudo pioneiro supra-citado onde o DMADDM (metacrilato dimetilaminododecil) ganhou maior destaque. Este dimetacrilato surge muitas vezes associado e comparado a DMAEDM, outro dimetacrilato que surge na literatura, mas talvez por este possuir um número menor de carbonos, exibe menor potencial antibacteriano. O DMADDM conseguiu MIC a variar entre 1.2-9.8µg/ml contra 8 espécies diferentes bacterianas em estudos *in vitro* de dissolução, ou seja, na forma não polimerizada. O DMADDM conseguia erradicar eficazmente todas as bactérias em 30 minutos numa concentração de 4 vezes o seu MBC. [37]

Nas forças de resistência adesiva à microtração (Microtensile bond strenght) em dentina humana a incorporação de 10% de QADM não originou diferenças estaticamente comparativamente ao do adesivo controlo. Os resultados demonstram que a utilização de QADM não compromete a adesão e a formação de prolongamentos resinosos, comprovada por observação a microscópio electrónico de transmissão (TEM). [38]

Um novo QADM foi também testado na sua capacidade antibacteriana, contacto por inibição e supressão da expressão de genes *gtf* (glucotransferases). O QADM reduziu bastante o número de colónias e a produção de ácido láctico comparativamente ao controlo; contudo este efeito apenas se notou na área próxima da superfície resinosa. O mesmo se verificou na supressão génica, em que os microorganismos longe da superfície não mostravam problemas na função enzimática. [38]

Atualmente sabe-se que os monómeros derivados de sais quaternários de amónio ligam-se às bactérias e provocam lise com extravasamento dos componentes celulares. As cargas elétricas possuem um papel importante na desregulação elétrica da membrana bacteriana e quando existe contacto, as cadeias catiónicas podem perfurar e penetrar a membrana bacteriana. Desta forma, quanto mais longa for esta cadeia maior será a potência antibacteriana do sal quaternário de amónio. [39, 40] Um estudo testou a eficácia de vários monómeros com diferente número de carbonos na cadeia catiónica e comprovou efetivamente que quanto maior a cadeia hidrofóbica, maior a potencia antibacteriana até um máximo de 16 carbonos; com menos de 5 carbonos os monómeros não possuem qualquer efeito e com 18 carbonos a eficácia já diminuía. [41]

Um estudo semelhante e mais recente testou essa mesma hipótese em monómeros dimetacrilatos (QADM). Os resultados foram de acordo com o estudo prévio onde o adesivo experimental com uma cadeia de 16 carbonos foi o que obteve melhores resultados a nível antibacteriano. Este estudo também demonstra que uma incorporação de fração de massa de 10% é a percentagem ideal reduzindo em cerca de 4 vezes a formação de placa bacteriana. [40]

De acordo com o seu alto efeito bactericida, a sua dose letal é significativamente maior do que outros sais contudo continua menor do que o Bis-GMA ou outros adesivos testados

como controlo.[37, 38] Numa concentração de 20 μ g/mL a viabilidade celular de fibroblastos gengivais era de 70-80% enquanto o Bis-GMA era apenas de 10%. A dose letal de concentração (LC₅₀) foi estabelecida na ordem dos 20-40 μ g/mL.[38]

3. Nano partículas

A recente evolução da microscopia e da capacidade do ser humano manipular à escala nano refletiu-se no aumento da quantidade de literatura que aborda a utilização de nanopartículas incorporadas em materiais dentários. As partículas mais incorporadas no campo da medicina dentária são o de fosfato de cálcio(CaP), na tentativa de remineralização da área afetada,[9] ou agentes bactericidas potentes como seja a prata (Ag)[42] o oxido de titânio (TiO₂).[43]

A incorporações de iões de prata não é rara se pesquisarmos a literatura sobre este tema, contudo só recentemente se observa a sua utilização sob a forma de nanopartículas. As partículas têm um diâmetro aproximado de 2,7 nm (variável entre estudos) e quando incorporado na resina deve-se evitar formar aglomerados, ou seja, as partículas devem estar bem espaçadas. [8] Quase todos os estudos encontrados testam a utilização de nano partículas em associação com monómeros resinosos antibacterianos (capítulo anterior). Contrariamente aos monómeros, a prata é libertada do material para exercer o seu efeito, alargando o campo de ação do material antibacteriano. O seu pequeno tamanho vai contribuir para que o material original não sofra transformações dimensionais comprometedoras após libertação do agente e simultaneamente habilita o material hospedeiro a poder carregar mais quantidade de partículas. [10] O efeito sinérgico de inibição por contacto realizado pelos sais quaternários de amónio (agentes imobilizados na resina) juntamente com o efeito a ‘longa-distância’ das nano partículas (agente libertado da resina) é constatado em diversos estudos onde o agente resinoso contendo ambos os agentes demonstra maior acção antibacteriana quando comparado com os agentes isolados. [44-47] A potência antibacteriana aumenta substancialmente quanto

maior a percentagem de NAg, contudo a partir de 0,25% a prata começa a interferir com a cor da resina. [48]

A comercialização de nano partículas de prata já é uma realidade e estas partículas são, numa primeira instância, misturadas normalmente junto de um composto metacrilato com grupos reativos de forma a estabelecerem ligações covalentes e desta forma facilitar a dissolução da prata na solução resinosa. Só depois é que este composto é incorporado no adesivo ou *primer* a ser testado. Um estudo associando nano partículas de Ag e um recente dimetacrilato (QADM) comprovou a maior inibição bacteriana por parte do novo adesivo contendo 10% fração de massa de QADM + 0.05% Ag comparativamente ao adesivo comercial (controlo) e adesivos preparados com QADM e Ag isoladamente. [45] O novo adesivo demonstrou áreas maiores de inibição, estatisticamente diferentes aos adesivos testados, sem comprometer a força de adesão (não revelou diferenças entre os adesivos – *Dentin Shear Bond Strength*). Estudos de absorvência (*MTT metabolic Assay*) também revelaram que o *primers* contendo ambos os agentes eram mais eficazes na diminuição da atividade metabólica microbiana. [44] Isto corrobora outros estudos que comprovam a eficácia antibacteriana na diminuição de unidades formadoras de colónias e na produção de ácido láctico [45, 46, 49] mesmo quando o substrato era revestido uma película de saliva. Todavia, este estudo constata que a potência antibacteriana enfraquece consideravelmente na presença de saliva quando cultivado em BHI (*Brain Heart Infusion*). [49] A adição de NAg (nano partículas de prata) a um *primer* ou adesivo com monómero à base de sais quaternário de amónio parece não interferir com a força de adesão à dentina, pois as diferenças no teste de resistência adesiva ao cisalhamento (*dentin shear bond strength*) não são estatisticamente significativas quando comparadas ao adesivo comercial (controlo). [45, 46] Os efeitos em dentina humana impregnada com *S.mutans* também

foram avaliados por outro estudo onde mais uma vez a incorporação de NAg demonstrou eficácia no combate antibacteriano sem comprometer a adesão.[42]

De forma a criar um material resinoso com propriedades remineralizantes, o fosfato de cálcio amorfo em nanopartículas (ACP) foi incorporado nos compostos à base de sais quaternários de amónio com as propriedades antibacterianas já referidas. Este agente tal com a prata é libertado do material resinoso e vai saturar a cavidade dentária com iões cálcio e fosfato (Ca e P) e a sua precipitação irá dar origem a hidroxiapatite (principal mineral estrutural dos dentes). Este mecanismo já foi evidenciado por estudos em resinas compostas mas apenas recentemente foi aplicado aos sistemas adesivos. [10] De referenciar adicionalmente que praticamente todos os estudos encontrados testam a eficácia destas nanopartículas em resinas à base de sais de amónio e muitas vezes juntamente com nanopartículas de Ag.

A síntese das nanopartículas de fosfato de cálcio (NACP) é realizada através de uma técnica de *spray-drying*, que utiliza gás quente para produção de pó seco a partir de soluções líquidas ou viscosas. Esta técnica é importante para obter partículas de tamanho uniforme com um rácio molar de cálcio/fosfato (Ca/P) de 1.5, idêntico ao do fosfato de cálcio amorfo – precursor de hidroxiapatite. [44] Um estudo recente incorporou NACP no adesivo com o objetivo de observar em microscopia eletrónica (SEM) a infiltração da resina contendo estas partículas com potencial remineralizante. Este estudo demonstra efetivamente a capacidade do NACP infiltrar com sucesso os túbulos dentinários, mesmo os mais irregulares, comprovando desta forma que consegue penetrar na dentina e libertar-se em locais profundos. Apesar de neste estudo, NACP não demonstrar atividade antibacteriana quando adicionado ao material – o acrescento de NACP não influenciou o efeito antibacteriano em testes de absorvância e *live/dead staining* -, este demonstrou redução significativa da produção de ácido láctico [50] e não interferiu negativamente nas

forças de adesão quando adicionada até 40% fracção de massa. (*Dentin Shear Bond Strength*) [50, 51]

A formação de prolongamentos resinosos parece ser idêntica ao adesivo controlo nos estudos realizados [50, 51] e parece ter um tempo de ação bastante elevado conseguindo exibir propriedades antibacterianas quando associado a um sal de amónio e prata mesmo após 6 meses de incubação em água. (redução das contagens CFU, diminuição de produção de placa bacteriana e ácido láctico). [51] Os estudos encontrados apesar de referirem que existe efectivamente penetração e que esta não influencia as propriedades mecânicas do adesivo, o autor não encontrou nenhum estudo que provasse inquestionavelmente a capacidade remineralizante deste material.

Outra nano partícula com propriedades bioativas é o óxido de titânio (TiO_2) apesar de a literatura ser muito escassa. Estudos demonstram o seu potencial de inibição bacteriana pela sua atividade catalítica mas apenas quando as partículas de titânio (NP) são irradiadas por doses baixas de ultra-violeta (UV-A) [43, 52] O óxido de titânio é responsável pela formação espontânea de hidroxiapatite na superfície do material sendo este umas das grandes vantagens e principais características deste agente bioactivo. As propriedades mecânicas do material hospedeiro não modificam quando as partículas de titânio são adicionadas até 30% de fracção de massa. As doses de radiação ultravioleta utilizadas são muito abaixo das doses perigosas para o ser humano, tornando este agente muito promissor devido ao efeito combinado antibacteriano e bioativo. [52]

4. Biomimetização

Biomimetização é o termo geral aqui aplicado para definir uma diferente estratégia de remineralização que procura copiar ou utilizar a ação da natureza de a restaurar estrutura dentária perdida.

A desmineralização da dentina pode ser provocada por cáries e, como já foi referido, por zonas com falhas de infiltração pela resina e formação de camada híbrida qualitativamente fraca, zonas essas mais suscetíveis à hidrolização. A remineralização é assim um fator chave ao qual se deve dar extrema importância se queremos salvaguardar a durabilidade de qualquer adesão.

Enquanto vias convencionais de remineralização adotam uma abordagem *top-down*, isto é, a remineralização de dentina parcialmente desmineralizada era obtida através da aplicação de iões cálcio e fosfato sobre os cristais de apatite existentes, esta contudo não se obtinha resultados se estes cristais estivessem ausentes. Contrariamente, a biomimetização representa uma via diferente tentando preencher o colagénio da dentina desmineralizada com nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo (ACP) estabilizadas por análogos de proteínas colagenosas. Este preenchimento intrafibrilar confere melhores propriedades mecânicas assim como protege o colagénio de factores externos como a temperatura, enzimas e ácido. [11] Estudos piloto em cáries artificiais demonstram esta capacidade remineralizadora por observação a microtomografia computadorizada e a microscópio eletrónico de transmissão (TEM) onde os adesivos experimentais contendo nanopercursos de fosfato de cálcio amorfo revelam uma taxa de mineralização mais elevada do que os de controlo. Um desses estudos testou a adesão em dentina desmineralizada e observou a mesma após um período de 4 meses. O artigo refere que em ambos os adesivos houve uma degradação de colagénio após um período de incubação

em fluido corporal estimulado, atribuído à actividade das metaloproteinases (MMP's).
[53]

Esta via *bottom-up* mostra-se promissora em restaurar as propriedades mecânicas das fibras de colagénio da dentina desmineralizada e pode atuar na ausência de cristais. Este mecanismo remineralizador ajuda no prolongamento da longevidade de uma restauração. Esta estratégia recente trouxe consigo o aparecimento de matrizes de colagénio artificiais, novos agentes com potencial remineralizador como o PILP (Polymer induced liquid precursor), agente com nanopartículas de ACP (fosfato de cálcio amorfo) mas com propriedades viscosas melhoradas –e análogos de proteínas não colagenosas que se pensam ser responsáveis pela correta formação de minerais (deposição intrafribilar das nanopartículas). [11, 54]

Esta nova estratégia traz consigo mudanças de conceito a nível de mineralização que devem ser cuidadosamente revistas e testadas para uma aplicação mais clinica. A literatura sobre este assunto ainda estão numa fase inicial e carece de mais estudos para ser concretizável.

Discussão

O aparecimento de cárie secundária continua a ser um acontecimento relativamente comum e qualquer médico dentista na sua prática clínica consegue aperceber-se das limitações dos sistemas adesivos atuais que inevitavelmente comprometem qualquer restauração relacionadas ou surgimento de cárie. A comunidade científica tem demonstrado grande interesse na melhoria de qualidade de adesão criando vários agentes antimicrobianos, monómeros resinosos para co-polimerizarem com as resinas atuais e simultaneamente exercerem efeito bactericida. Com o aparecimento do MDPB e sua comercialização[17], novos monómeros sintetizados por outros grupos foram surgindo com propriedades alteradas e até mesmo novas estruturas que lhes conferiam maior potência bactericida.[46]

O MDPB é o primeiro dos derivados de sais quaternários de amónio a surgir e por isso tem uma literatura mais substancial. O seu efeito bactericida está bastante comprovado especialmente sob a forma não polimerizada, exercendo apenas efeitos bacteriostáticos depois da polimerização.[19] Quando incorporado não parece interferir diretamente na qualidade de adesão, contudo parece não prevenir a biodegradação da camada híbrida. Quando testado em dentina afetada por cárie mostra os mesmos valores de perda adesão semelhante a outros adesivos atuais.[28] O conceito de ação de novos derivados de sais quaternário de amónio parece em tudo ser idêntico aos monómeros da mesma família recentemente sintetizados variando apenas o comprimento da cadeia hidrofóbica do monómero (DMAE-CB) [33] ou a presença de dois grupos metacrilatos funcionais. [46] Isto vai conferir propriedades antibacterianas melhoradas e a sua eficácia antibacteriana foi comprovada, especialmente em testes *in vitro*. [40, 42, 46] Contudo estes monómeros por serem mais recentes não possuem tanta literatura sendo a maior parte dos estudos

ainda realizado em laboratório. Mais testes *in vivo* com maior intervalo de duração serão necessários para efetivamente avaliar a sua influência na adesão na prática dentária.

A adição das nano partículas em materiais dentários na ajuda ao combate antibacteriano também é recente. A prata sob a forma de nano partícula pode ser libertada do material sem consequências para as dimensões do material hospedeiro. Como potente bactericida a prata vem aumentar significativamente a capacidade inibitória de adesivos experimentais à base de sais quaternários de amónio. [38, 42, 48, 50] As partículas de fosfato de cálcio apesar de não apresentarem grande efeito inibitório são particularmente interessantes devido à seu potencial remineralizador. Até agora só foi demonstrado que as partículas conseguem ser incorporadas no material e infiltrar eficazmente junto do adesivo hospedeiro. [48, 50] Estas partículas, como já referido, vêm muitas vezes associadas a sais quaternário de amónio e devido à seu recente nascimento ainda carecem de pouca literatura sendo importante averiguar o ganho de remineralização em testes mais longos e, preferencialmente, *in vivo*.

Outra estratégia mais natural é a biomimetização com alguns autores a criar proteínas sintéticas análogas às encontradas na cavidade oral de forma a estabilizar nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo que permitiriam uma mineralização quer intra- quer extra-fibrilar do colagénio o que levaria a cristais mais regulares e resistentes. [11]

Conclusão

Os monómeros à base de sais quaternários de amónio parecem promissores para serem incorporados nos mais diversos materiais dentários. A sua alta capacidade antibacteriana é de grande relevo clínico de forma a evitar o aparecimento de cárie secundária e possível infiltração por bactérias residuais deixadas no preparo cavitário aquando da sua preparação. Apesar dos ótimos valores bactericidas encontrados em testes *in vitro* e na forma não polimerizada, quando incorporado no adesivo e após polimerização estes compostos perdem substancialmente capacidade inibitória. Vários monómeros vão sendo sintetizados com propriedades melhoradas e actualmente os estudos associam a capacidade inibitória por contacto dos sais com a inibição à distancia provocada libertação das nanopartículas de prata (Ag) e óxido de titânio (TiO₂). Esta sinergia traduz-se num aumento do efeito antibacteriano e especula-se também um efeito remineralizador de dentina desmineralizada quando se utiliza fosfato de cálcio amorfo (ACP). Estes materiais têm grande interesse clínico e são esperados mais estudos dentro desta área de biomateriais com características bioativas e antimicrobianas de maneira a colmatar as limitações dos sistemas adesivos atuais e a providenciar ao clínico uma maior confiança no trabalho restaurador.

Bibliografia

1. Ferracane, J.L., *Resin composite—State of the art*. Dental Materials, 2011. **27**(1): p. 29-38.
2. Carvalho, R.M., et al., *Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations*. Dental Materials, 2012. **28**(1): p. 72-86.
3. Pallesen, U., et al., *Longevity of posterior resin composite restorations in permanent teeth in Public Dental Health Service: A prospective 8 years follow up*. Journal of Dentistry, 2013. **41**(4): p. 297-306.
4. Pashley, D.H., et al., *State of the art etch-and-rinse adhesives*. Dental Materials, 2011. **27**(1): p. 1-16.
5. Breschi, L., et al., *Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface*. Dent Mater, 2008. **24**(1): p. 90-101.
6. Carvalho, R.M., et al., *Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations*. Dent Mater, 2012. **28**(1): p. 72-86.
7. Imazato, S., et al., *Antibacterial resin monomers based on quaternary ammonium and their benefits in restorative dentistry*. Japanese Dental Science Review, 2012. **48**(2): p. 115-125.
8. Wang, Z., Y. Shen, and M. Haapasalo, *Dental materials with antibiofilm properties*. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, 2014. **30**(2): p. e1-e16.
9. Besinis, A., R. van Noort, and N. Martin, *Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles*. Dental Materials, 2014. **30**(3): p. 249-262.
10. Imazato, S., et al., *Therapeutic polymers for dental adhesives: Loading resins with bio-active components*. Dental Materials, 2014. **30**(1): p. 97-104.
11. Niu, L.-n., et al., *Biomimetic remineralization of dentin*. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, 2014. **30**(1): p. 77-96.
12. Tay, F.R., et al., *Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin*. J Dent Res, 2003. **82**(7): p. 537-41.
13. Zhang, S.C. and M. Kern, *The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives*. Int J Oral Sci, 2009. **1**(4): p. 163-76.
14. Bertassoni, L.E., et al., *The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(7): p. 2419-2433.
15. Imazato, S., *Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry*. Dent Mater J, 2009. **28**(1): p. 11-9.
16. Imazato, S., et al., *Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB*. Biomaterials, 1999. **20**(9): p. 899-903.
17. Imazato, S., et al., *Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB*. Dental Materials, 2003. **19**(4): p. 313-319.
18. Izutani, N., et al., *Effects of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) on bacterial viability and metabolism*. Eur J Oral Sci, 2011. **119**(2): p. 175-81.
19. Imazato, S., et al., *Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing*. Journal of Dentistry, 1998. **26**(3): p. 267-271.
20. Imazato, S., et al., *Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin*. J Oral Rehabil, 2001. **28**(4): p. 314-9.
21. Paradella, T.C., C.Y. Koga-Ito, and A.O. Jorge, *In vitro antibacterial activity of adhesive systems on Streptococcus mutans*. J Adhes Dent, 2009. **11**(2): p. 95-9.
22. Imazato, S., et al., *In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond*. Dent Mater, 2006. **22**(6): p. 527-32.

23. Imazato, S., et al., *In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB*. Oper Dent, 2004. **29**(4): p. 369-75.
24. Tziafas, D., et al., *Effects of a new antibacterial adhesive on the repair capacity of the pulp-dentine complex in infected teeth*. Int Endod J, 2007. **40**(1): p. 58-66.
25. Imazato, S., et al., *An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB*. Dental Materials, 2007. **23**(2): p. 170-176.
26. Pedrosa, V.O., et al., *Influence of pH cycling on the microtensile bond strength of self-etching adhesives containing MDPB and fluoride to dentin and microhardness of enamel and dentin adjacent to restorations*. J Adhes Dent, 2012. **14**(6): p. 525-34.
27. Imazato, S., et al., *Penetration of an antibacterial dentine-bonding system into demineralized human root dentine in vitro*. Eur J Oral Sci, 2002. **110**(2): p. 168-74.
28. Carvalho, F.G., et al., *Biodegradation of caries-affected dentin bonding interface of fluoride and MDPB-containing adhesive system*. International Journal of Adhesion and Adhesives, 2013. **47**(0): p. 134-140.
29. Donmez, N., et al., *Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives*. J Dent Res, 2005. **84**(4): p. 355-9.
30. Tezvergil-Mutluay, A., et al., *The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs*. J Dent Res, 2011. **90**(4): p. 535-40.
31. Nishida, M., et al., *The influence of the antibacterial monomer 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide on the proliferation, differentiation and mineralization of odontoblast-like cells*. Biomaterials, 2010. **31**(7): p. 1518-32.
32. Xiao, Y.H., et al., *Antibacterial effects of three experimental quaternary ammonium salt (QAS) monomers on bacteria associated with oral infections*. J Oral Sci, 2008. **50**(3): p. 323-7.
33. Xiao, Y.H., et al., *Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **90**(2): p. 813-7.
34. Li, F., et al., *Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer*. J Dent Res, 2009. **88**(4): p. 372-6.
35. Chai, Z., et al., *The bonding property and cytotoxicity of a dental adhesive incorporating a new antibacterial monomer*. J Oral Rehabil, 2011. **38**(11): p. 849-56.
36. Antonucci, J.M., et al., *Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications*. Dent Mater, 2012. **28**(2): p. 219-28.
37. Li, F., et al., *Time-kill behaviour against eight bacterial species and cytotoxicity of antibacterial monomers*. Journal of Dentistry, 2013. **41**(10): p. 881-891.
38. Li, F., et al., *Comparison of quaternary ammonium-containing with nano-silver-containing adhesive in antibacterial properties and cytotoxicity*. Dental Materials, 2013. **29**(4): p. 450-461.
39. Murata, H., et al., *Permanent, non-leaching antibacterial surface--2: how high density cationic surfaces kill bacterial cells*. Biomaterials, 2007. **28**(32): p. 4870-9.
40. Zhou, H., et al., *Dental plaque microcosm response to bonding agents containing quaternary ammonium methacrylates with different chain lengths and charge densities*. Journal of Dentistry, 2013. **41**(11): p. 1122-1131.
41. He, J., et al., *Synthesis of methacrylate monomers with antibacterial effects against S. mutans*. Molecules, 2011. **16**(11): p. 9755-63.
42. Cheng, L., et al., *Effects of antibacterial primers with quaternary ammonium and nano-silver on Streptococcus mutans impregnated in human dentin blocks*. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, 2013. **29**(4): p. 462-472.
43. Cai, Y., et al., *Photocatalytic inactivation of biofilms on bioactive dental adhesives*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2013.
44. Xu, H.H.K., et al., *Chapter 6 - Nanostructured Dental Composites and Adhesives with Antibacterial and Remineralizing Capabilities for Caries Inhibition*, in

- Nanobiomaterials in Clinical Dentistry*, K. Subramani, W. Ahmed, and J.K. Hartsfield, Editors. 2013, William Andrew Publishing. p. 109-129.
45. Zhang, K., et al., *Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms*. Dental Materials, 2012. **28**(8): p. 842-852.
 46. Cheng, L., et al., *Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate*. Journal of dentistry, 2013. **41**(4): p. 345-355.
 47. Zhang, K., et al., *Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties*. Journal of Dentistry, 2013. **41**(5): p. 464-474.
 48. Cheng, L., et al., *Effect of amorphous calcium phosphate and silver nanocomposites on dental plaque microcosm biofilms*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012. **100**(5): p. 1378-86.
 49. Li, F., et al., *Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial dental adhesives using a dental plaque microcosm biofilm model*. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, 2014. **30**(2): p. 182-191.
 50. Melo, M.A.S., et al., *Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate*. Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials, 2013. **29**(2): p. 199-210.
 51. Zhang, K., et al., *Effect of water-ageing on dentine bond strength and anti-biofilm activity of bonding agent containing new monomer dimethylaminododecyl methacrylate*. Journal of Dentistry, 2013. **41**(6): p. 504-513.
 52. Welch, K., et al., *Dental adhesives with bioactive and on-demand bactericidal properties*. Dent Mater, 2010. **26**(5): p. 491-9.
 53. Liu, Y., et al., *The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin*. Dent Mater, 2011. **27**(5): p. 465-77.
 54. Kim, J., et al., *Functional biomimetic analogs help remineralize apatite-depleted demineralized resin-infiltrated dentin via a bottom-up approach*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(7): p. 2740-2750.

ANEXOS