

Propriedades antibacterianas de materiais restauradores: resina composta nanohíbrida, selantes de fissura e ionómero de vidro em estudo *in vitro*

Antibacterial properties of restorative materials: nanohybrid composite resin, fissure sealants and glass ionomer *in vitro* study

Ana Francisca Ribeiro^{1*} , Marie Mazière² , Célia Fortuna Rodrigues^{3,4,5} , Lígia Lopes-Rocha² , António Rajão^{3,4} , Orlanda Torres² 

¹Instituto Universitário de Ciências da Saúde (IUCS), CESPU, Gandra, Portugal.

²UNIPRO – Unidade de Investigação em Patologia e Reabilitação Oral, Instituto Universitário de Ciências da Saúde (IUCS), CESPU, Gandra, Portugal.

³Associate Laboratory i4HB- Institute for Health and Bioeconomy, University Institute of Health Sciences- CESPU, Gandra, Portugal.

⁴2UCIBIO- Applied Molecular Biosciences Unit, Translational Toxicology Research Laboratory, University Institute of Health Sciences (1H-TOXRUN, IUCS-CESPU), Gandra, Portugal.

⁵LEPABE—Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, ALiCE—Associate Laboratory in Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, Porto, Portugal

*Autor correspondente/Corresponding author: afranciscacribeiro@gmail.com

Recebido/Received: 17-02-2025; Revisto/Revised: 26-05-2025; Aceite/Accepted: 05-06-2025

Resumo

Introdução: A seleção criteriosa de materiais restauradores, como resina composta, selante de fissura à base de resina e ionómero de vidro, desempenha um papel crucial no sucesso do tratamento da cárie dentária, destacando-se as propriedades antibacterianas desses materiais. **Objetivos:** Este estudo teve com objetivo avaliar e comparar as propriedades antibacterianas da resina composta nanohíbrida, selante de fissura à base de resina e de ionómero de vidro contra a bactéria *Streptococcus mutans* DSM 2523. **Materiais e Métodos:** Doze discos de cada um dos materiais em estudo, foram confeccionados e desinfetados com álcool isopropílico a 70 %. A suspensão bacteriana de *Streptococcus mutans* DSM 2523 preparada a 0,5 na escala McFarland foi inoculada no MS agar. Em cada placa, foram colocados discos dos materiais avaliados, bem como do grupo controlo contendo clorexidina. O diâmetro do halo antimicrobiano (mm) foi avaliado após 1, 7, 15 e 30 dias. **Resultados:** Em cada um dos períodos de avaliação, nenhum dos materiais restauradores apresentou formação de halo antimicrobiano. **Conclusão:** Os três materiais restauradores testados não demonstraram atividade antibacterianas contra a bactéria *Streptococcus mutans* DSM 2523, sendo que a ausência de condições que reproduzam a humidade oral pode ter tido influência, principalmente em relação ao selante à base de resina e ao ionómero de vidro.

Palavras-chave: Selante de fissura, ionómero de vidro, resina composta nanohíbrida, antimicrobiano, antibacteriano.

Abstract

Introduction: The careful selection of restorative materials, such as resin-matrix composite, resin-based fissure sealants and glass ionomer, plays a crucial role in the successful treatment of dental caries, especially the antibacterial properties of these materials. **Objectives:** To evaluate and compare the antibacterial properties of resin-matrix composite, resin-based fissure sealants and glass ionomer in relation to *Streptococcus mutans* DSM 2523. **Materials and Methods:** Twelve discs of each of the materials under study were prepared and disinfected with 70 % isopropyl alcohol. The bacterial suspension of *Streptococcus mutans* DSM 2523 prepared at 0.5 on the McFarland scale was inoculated on MS agar. Disks of the materials evaluated and the control group containing chlorhexidine were placed in each plate. The diameter of the antimicrobial halo (mm) was assessed after 1, 7, 15 and 30 days. **Results:** In each evaluation period, none of the restorative materials showed antimicrobial halo formation. **Conclusion:** The three restorative materials tested did not demonstrate antibacterial activity against the bacterium *Streptococcus mutans* DSM 2523, and the absence of conditions that reproduce oral humidity may have had an influence, mainly in relation to the resin-based fissure sealants and the glass ionomer.

Keywords: Fissure sealant, glass ionomer cement, resin-matrix composite, antimicrobial, antibacterial.

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença crônica prevalente em todo o mundo, afetando três em cada quatro indivíduos conforme estatísticas da Organização Mundial de Saúde. A prevenção é fundamental, especialmente em crianças, através de campanhas de higiene oral e aplicação de materiais preventivos nos sulcos e fissuras dos dentes. No entanto, quando a doença já se encontra instalada, é necessária intervenção adequada (Savas-Sagmak *et al.*, 2020, Khan-Mohammad *et al.*, 2023).

Com o avanço da evidência científica, foram desenvolvidas técnicas minimamente invasivas, que consiste na remoção do tecido infetado e na permanência do tecido afetado com sua posterior remineralização (Ayse-Gunay *et al.*, 2022). Apesar dos esforços preventivos, estudos demonstram uma alta taxa de falha das restaurações após 10 anos devido ao desenvolvimento de lesões de cárie secundária. A atuação da *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), principal agente cariogênico, proveniente da acumulação de placa bacteriana, com a formação de ácido láctico, induzindo a desmineralização do tecido dentário, leva à formação de lesões de cárie, podendo estes agentes ter persistido durante a primeira intervenção médica na lesão de cárie, afetando sobretudo a interface do dente com o material restaurador (Chhaya-Khere *et al.*, 2019). Outro fator que pode afetar é a xerostomia. Cerca de 12 % da população idosa, especialmente aquela que é polimedicada, apresenta redução do fluxo salivar e da capacidade tampão, tornando-se mais suscetível ao desenvolvimento de lesões de cárie, devido à microinfiltração e contração do material restaurador (Hemalatha-Hiremath *et al.*, 2021). Sendo assim, a seleção do material adequado é crucial, uma vez que as suas propriedades antibacterianas podem influenciar diariamente o sucesso do tratamento (Ayse-Gunay *et al.*, 2022, Yong-Chen *et al.*, 2020).

Dentre os materiais restauradores disponíveis, destacam-se a resina composta nanohíbrida, selantes de fissura à base de resina e o ionômero de vidro. Enquanto a resina composta nanohíbrida composta por metacrilatos e por partículas de carga que conferem propriedades estéticas e mecânicas, por outro lado, também é associada a desafios como contração de polimerização e sensibilidade à contaminação, sendo fundamental um meio totalmente seco, sendo assegurado com o recurso ao isolamento absoluto (Giulio-Conti *et al.*, 2023, Lígia Lopes-Rocha *et al.*, 2021). Os selantes de fissura à base de resina são eficazes na prevenção de cáries, pela sua concentração de flúor, mas a sua durabilidade é comprometida pela abrasão e perda de adesão ao longo do tempo (Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021). Os ionômeros de vidro têm como vantagens a biocompatibilidade, são hidrofílicos e libertadores de flúor, porém a resistência mecânica é limitada, tornando-os mais adequados para áreas de baixa tensão (Savas-Sagmak *et al.*, 2020, Yong-Chen *et al.*, 2020).

É de referir que até à data nenhum estudo avaliou as propriedades antibacterianas dos materiais referidos, tendo sido feita a comparação com materiais do mesmo grupo, mas com variabilidade em certos componentes e diferentes fabricantes, daí este artigo ser pioneiro na investigação antibacteriana destes materiais bastante utilizados na prática da Medicina Dentária.

Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar a

1. INTRODUCTION

Dental Carie is a prevalent chronic disease worldwide, affecting three out of every four individuals according to statistics from the World Health Organisation. Prevention is fundamental, especially in children, through oral hygiene campaigns and the application of preventive materials in the grooves and fissures of the teeth. However, when the disease has already set in, appropriate intervention is required (Savas-Sagmak *et al.*, 2020, Khan-Mohammad *et al.*, 2023).

With the advancement of scientific evidence, minimally invasive techniques have been developed, which consist of removing the infected tissue and making the affected tissue permanent and then remineralising it (Ayse-Gunay *et al.*, 2022). Despite preventive efforts, studies show a high rate of restoration failure after 10 years due to the development of secondary caries lesions. The action of *Streptococcus mutans*, the main cariogenic agent, from the accumulation of bacterial plaque, with the formation of lactic acid, inducing the demineralisation of dental tissue, leads to the formation of caries lesions. And these agents may have persisted during the first medical intervention on the caries lesion, mainly affecting the interface of the tooth with the restorative material (Chhaya-Khere *et al.*, 2019). Another factor that can affect is xerostomia. Around 12 % of the elderly population, especially those who are polymedicated, have reduced salivary flow and buffer capacity, making them more susceptible to the development of caries lesions due to microleakage and contraction of the restorative material (Hemalatha-Hiremath *et al.*, 2021). Therefore, choosing the right material is crucial, as its antibacterial properties can influence the success of the treatment daily (Ayse-Gunay *et al.*, 2022, Yong-Chen *et al.*, 2020).

Among the restorative materials available are nanohybrid composite resin, resin-based fissure sealants and glass ionomer. While nanohybrid composite resin is composed of methacrylates and filler particles that confer aesthetic and mechanical properties, it is also associated with challenges such as polymerisation contraction and sensitivity to contamination, and a completely dry environment is essential, which is ensured by using absolute isolation (Giulio-Conti *et al.*, 2023, Lígia Lopes-Rocha *et al.*, 2021). Resin-based fissure sealants are effective in preventing caries due to their fluoride concentration, but their durability is compromised by abrasion and loss of adhesion over time (Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021).

The advantages of glass ionomers are that they are biocompatible, hydrophilic and fluoride-releasing, but their mechanical strength is limited, making them more suitable for low-stress areas (Savas-Sagmak *et al.*, 2020, Yong-Chen *et al.*, 2020).

It should be noted that, to date, no study has evaluated the antibacterial properties of these materials, and comparisons have been made with materials from the same group, but with variability in certain components and different manufacturers, which is why this article is a pioneer in antibacterial research into these materials that are widely used in dental practice.

Therefore, this study aims to evaluate the antibacterial properties of nanohybrid composite resin, fissure sealants and glass ionomer in relation to *Streptococcus mutans*.

existência de propriedades antibacterianas da resina composta nanohíbrida, selantes de fissura e ionômero de vidro em relação à *S. mutans*.

A hipótese nula e a hipótese de trabalho foram:

- *Nenhum dos três materiais apresenta efeito antibacteriano contra a bactéria Streptococcus mutans;*
- *Pelo menos um dos três materiais apresenta efeito antibacteriano contra a Streptococcus mutans.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo visou avaliar as propriedades antibacterianas de três materiais: resina composta nanohíbrida (Ceram.x Spectra™ ST, Dentsply Sirona, Alemanha), selante de fissura à base de resina (Fissurit® F, VOCO, Alemanha) e o ionômero de vidro (Ketac™ Fil Plus Aplicap™, 3M ESPE, Alemanha) em contacto com a bactéria *S. mutans* DSM 2523, em quatro intervalos de tempo: 1, 7, 15 e 30 dias.

2.1. CONFEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram confeccionados doze discos de resina composta nanohíbrida, doze discos de selante de fissura à base de resina e doze discos de ionômero de vidro (Tabela 1) com o aparelho Smile Line #7015, Suíça (Fig.1). Cada amostra possuía 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.



Figura/Figure 1: Aparelho Smile Line #7015, Suíça- Ajuste do equipamento para que todos os discos confeccionados, apresentassem 2mm de espessura, sendo que o diâmetro do equipamento é sempre constante - 10mm. Assim avalia-se equitativamente os três materiais em estudo tendo em conta a espessura e o diâmetro, sendo fatores condicionantes/ Smile Line #7015, Switzerland - Adjustment of the equipment so that all the discs made were 2mm thick, with the diameter of the equipment always constant - 10mm. In this way, the three materials under study were evaluated equally, taking thickness and diameter into account as conditioning factors.

Para a resina composta nanohíbrida (Figura 2A), o material armazenado em compules foi aplicado no aparelho por meio de uma pistola Centrix (Figura 2B) e condensado com uma espátula de ação lateral. Uma placa de vidro foi utilizada para nivelar o material dos discos e eliminar possíveis bolhas de ar. Em seguida a fotopolimerização foi realizada utilizando polimerização LED (Bluephase, Ivoclar Vivadent AG, Áustria) durante 20 segundos, à temperatura ambiente em ambas as superfícies do disco. Este procedimento foi repetido doze vezes.

No caso do selante à base de resina, o material foi inserido diretamente no aparelho, por meio de uma seringa, garantindo o completo preenchimento (Figura 2C). Novamente, a placa

The null hypotheses considered for this study were:

- None of the three materials have antibacterial properties in relation to *Streptococcus mutans*.
- Only resin-based fissure sealant and glass ionomer have antibacterial properties in relation to *Streptococcus mutans*.

2. MATERIAL AND METHODS

This study aimed to evaluate the antibacterial properties of three materials: nanohybrid composite resin (Ceram.x Spectra™ ST, Dentsply Sirona, Germany), resin-based fissure sealant (Fissurit® F, VOCO, Germany) and glass ionomer (Ketac™ Fil Plus Aplicap™, 3M ESPE, Germany) in contact with the bacterium *Streptococcus mutans* DSM 2523 at four time intervals: 1, 7, 15 and 30 days.

2.1 MAKING THE SAMPLES

Twelve nanohybrid composite resin discs, twelve resin-based fissure sealant discs and twelve glass ionomer discs (Table 1) were made using the Smile Line #7015, Switzerland (Fig.1). Each sample was 10 mm in diameter and 2 mm thick.

For the nanohybrid composite resin (Figure 2A), the material stored in compules was applied to the device using a Centrix gun (Figure 2B) and condensed with a side-action spatula. A glass plate was used to level the material on the discs and eliminate possible air bubbles. Photopolymerization was then carried out using LED polymerization (Bluephase, Ivoclar Vivadent AG, Austria) for 20 seconds at room temperature on both disc surfaces. This procedure was repeated twelve times.

In the case of the resin-based sealant, the material was inserted directly into the appliance using a syringe, ensuring complete filling (Figure 2C). Again, the glass plate was used to level the material, and polymerization took place for 40 seconds,

de vidro foi utilizada para nivelar o material, e a polimerização ocorreu durante 40 segundos, sendo os primeiros 20 segundos com a placa de vidro e os restantes 20 segundos no lado oposto do disco, à temperatura ambiente. Este processo foi repetido doze vezes.

the first 20 seconds with the glass plate and the remaining 20 seconds on the opposite side of the disc, at room temperature. This process was repeated twelve times.

Tabela/Table 1: Ficha Técnica dos materiais utilizados: 1- Resina composta nanohíbrida, 2- Resina composta fluída, 3- Ionómero de vidro/Technical data sheet of the materials used: 1- Nanohybrid composite resin, 2- Flowable composite resin, 3- Glass ionomer.

Material	Tipo/ Type	Fabricante/ Manufacturer	Composição/ Composition	Indicações/ Indications
1 Ceram.x Spectra TM ST LOT 2211000143	Resina composta nanohíbrida/ Nanohybrid composite resin	Dentsply Sirona, Konstanz, Alemanha/ Dentsply Sirona, Konstanz, Germany	Matriz: Nanopartículas de polissiloxano modificadas metacrílicas, resina de dimetacrilato Partículas de carga: Cargas SphereTEC esféricas e pré-polimerizadas (tamanho de partícula <0,1 µm), vidro de bário não aglomerado, fluoreto de itérbio; Fotoiniciador: Canforquinona, Fotoacelerador de etil-4(dimetilamino) benzoato/Matriz: Methacrylic modified polysiloxane nanoparticles, dimethacrylate resin Fillers: Spherical and pre-cured SphereTEC fillers (particle size <0.1 µm), non-agglomerated barium glass, ytterbium fluoride; Photoinitiator: Camphorquinone, Ethyl-4(dimethylamino)benzoate photoaccelerator	Restaurações diretas para todas as cavidades em dentes anteriores e posteriores; Fabrico indireto de onlays, inlays e facetas/Direct restorations for all cavities in the anterior and posterior teeth; Indirect fabrication of onlays, inlays and veneers;
2 Fissurit® F LOT 2132339	Selante de fissura à base de resina/Resin-based crack sealant	VOCO, Cuxhaven Alemanha/VOCO, Cuxhaven Germany	Bisfenol-A-glicidil-dimetacrilato; Dimetacrilato de Uretano; Dimetacrilato de 1,6-exanodiol; Dimetacrilato de Trietilenoglicol; Sílica pirogénica, Fluoreto de sódio, Dióxido de titânio;/Bisphenol-A-glycidyl dimethacrylate; Urethane dimethacrylate; 1,6-exanediol dimethacrylate; Triethylene glycol dimethacrylate; Pyrogenic silica, Sodium fluoride, Titanium dioxide	Selamento de fissuras e superfícies oclusais na profilaxia da cárie dentária; Selamento/preenchimento de lesões superficiais em esmalte; Selamento de restaurações em compósito ou cimento (proteção contra a humidade); Restauração de pequenas lesões de cárie; Reparação de pequenos defeitos em restaurações em compósito ou amálgama;/Sealing of fissures and occlusal surfaces in dental caries prophylaxis. Sealing/filling of superficial enamel lesions. Sealing of composite or cement restorations (protection against moisture); Restoration of small caries lesions. Repair of small defects in composite or amalgam restorations.
3 Ketac™ Fil Plus Aplicap™ LOT 7360364	Ionómero de vidro/Glass ionomer	3M ESPE, Seefeld, Alemanha/ 3M ESPE, Seefeld, Germany	Vidro de cálcio-alumino-fluoro-silicato, copolímero de Ácido Acrílico e Ácido Maleico, Ácido Tartárico, água/Calcium-alumino-fluoro-silicate glass, acrylic acid and Maleic acid copolymer, Tartaric acid, water	Restaurações permanentes de classe III e V; Pequenas restaurações permanentes classe I; Restaurações de dentes decíduos; Selante de fissuras; Restauração de erosões cervical; Restauração antes da preparação da coroa;/Class III and V permanent restorations; Class I small permanent restorations; Restorations of deciduous teeth; Fissure sealant; Restoration of cervical erosions; Restoration before crown preparation;

Já para as cápsulas de ionómero de vidro (Figura 2D), estas foram inicialmente ativadas e misturadas durante 7 segundos, antes de serem inseridas no aparelho com o aplicador apropriado (Figura 2E). A placa de vidro foi empregue novamente para nivelar o material, e nenhuma polimerização física foi realizada. Este procedimento foi repetido doze vezes.

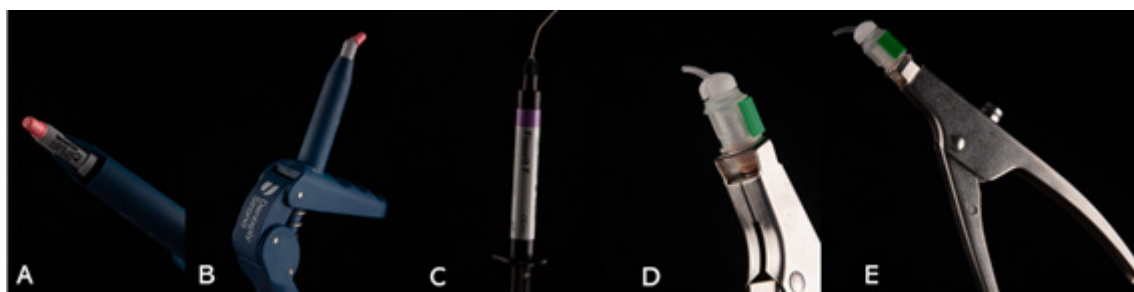
As for the glass ionomer capsules (Figure 2D), they were first activated and mixed for 7 seconds before being inserted into the appliance with the appropriate applicator (Figure 2E). The glass plate was used again to level the material, and no physical polymerization was carried out. This procedure was repeated twelve times.

Antes da inoculação com *S. mutans* DSM 2523, todos os discos foram descontaminados com álcool isopropílico a 70 %

Before inoculation with *Streptococcus mutans* DSM 2523, all discs were decontaminated with 70 % isopropyl alcohol for

durante 60 segundos (Samar Al-Saleh *et al.*, 2022). Em seguida, os discos foram secos em ambiente estéril.

60 seconds (Samar Al-Saleh *et al.*, 2022). The discs were then dried in a sterile environment.



Figura/Figure 2: (A) Compule de resina composta nanohíbrida A2; (B) Pistola Centrix para aplicação no aparelho; (C) Resina fluída com seringa de aplicação incorporada; (D) Cápsula de ionómero de vidro; (E) Cápsula incorporada no aplicador. Estes equipamentos permitem a aplicação correta dos materiais no aparelho ilustrado na Figura 1/(A) A2 nanohybrid composite resin compule; (B) Centrix gun for application in the appliance; (C) Fluidised resin with built-in application syringe; (D) Glass ionomer capsule; (E) Capsule built into the applicator. This equipment enables the correct application of the materials in the appliance illustrated in Figure 1.

2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A bactéria *S. mutans* DSM 2523 foi inoculada, em placas Mitis Salivarius Agar. Após 24 horas de incubação a 37° C com 5 % CO₂, duas colônias foram transferidas com uma ansa estéril para 3 mL de PBS no qual a densidade da suspensão foi ajustada a 0,5 na escala McFarland, correspondendo a ~1.5 × 10⁸.células/mL. Foram inoculados com uma zaragatoa estéril 300 µL da suspensão bacteriana.

Como controlo foi utilizado, 20 µL de clorexidina (CHX) 0,12 % + 0,05 % de cloreto de cetilpiridínio (CPC) em discos de papel. Em cada placa foram colocados um disco de cada material (Tabela 2) incluindo o grupo de controlo. As placas foram então incubadas por 24h a 37° C com 5 % de CO₂. O ensaio foi feito em duplicado em três ensaios independentes. Utilizando uma régua calibrada, os diâmetros dos halos de inibição formados foram avaliados e medidos em milímetros ao final de quatro intervalos de tempo: 1, 7, 15 e 30 dias, tal como retrata a Figura 3.

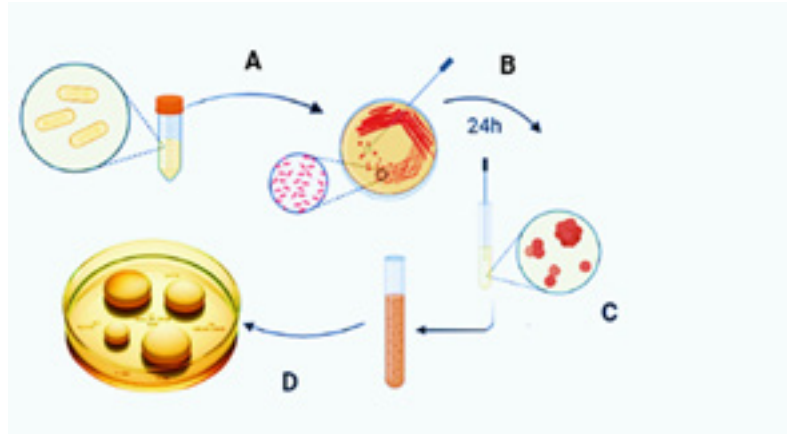
2.2 EXPERIMENTAL PROCEDURE

The bacterium *Streptococcus mutans* DSM 2523 was inoculated onto Mitis Salivarius Agar plates. After 24 hours of incubation at 37° C with 5 % CO₂, two colonies were transferred with a sterile loop to 3 mL of PBS in which the density of the suspension was adjusted to 0.5 on the McFarland scale, corresponding to ~1.5 × 10⁸.cells/mL. 300 µL of the bacterial suspension was inoculated with a sterile swab.

As a control, 20 µL of 0.12 % chlorhexidine (CHX) + 0.05 % cetylpyridinium chloride (CPC) was used on paper discs. One disc of each material (Table 2) was placed on each plate, including the control group. The plates were then incubated for 24 hours at 37° C with 5 % CO₂. The test was carried out in duplicate in three independent tests. Using a calibrated ruler, the diameters of the inhibition halos formed were assessed and measured in millimetres at the end of four-time intervals: 1, 7, 15 and 30 days, as shown in Figure 3.

Tabela/Table 2: Caracterização dos grupos de estudo/Characterization of the study groups.

Grupos/Groups	n	Material	Polimerização/ Polymerization
RC	12	Resina composta nanohíbrida/ Nanohybrid composite	20 segundos/ 20 seconds
RF	12	Selante à base de resina/ Resin-based sealant	40 segundos/ 40 seconds
IO	12	Ionómero de vidro/ Glass ionomer	Autopolimerizável/ Self curing
GC	12	Grupo controlo/ Control Group	Sem Polimerização/ No curing



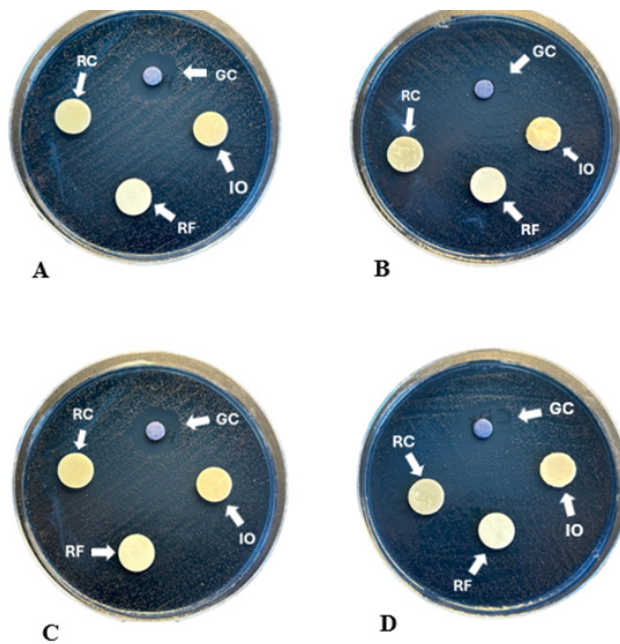
Figura/Figure 3: Esquema representativo do procedimento laboratorial: (A) transferência do cryovial para o Agar Mitis Salivarius; (B) colheita com uma ansa estéril de duas colônias bacterianas puras cultivadas no meio; (C) suspensão bacteriana preparada a 0,5 escala McFarland, diluídas em PBS; (D) inoculação em placa Petri e colocação dos discos preparados. Avaliação do diâmetro do halo antimicrobiano formado após 1, 7, 15 e 30 dias, criado no BioRender./Representative diagram of the laboratory procedure: (A) transfer of the cryovial to Mitis Salivarius Agar; (B) collection with a sterile loop of two pure bacterial colonies grown on the medium; (C) bacterial suspension prepared at 0.5 on the McFarland scale, diluted in PBS; (D) inoculation in Petri dishes and placement of the prepared discs. Evaluation of the diameter of the antimicrobial halo formed after 1, 7, 15 and 30 days, created in BioRender.

3. RESULTADOS

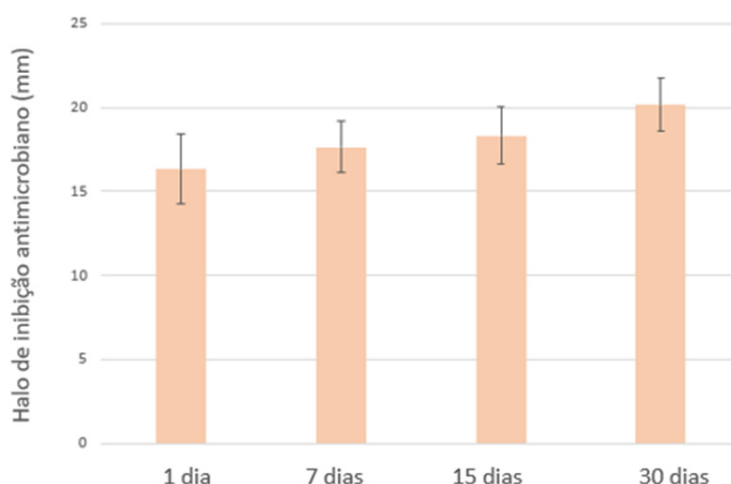
Nos quatro intervalos de tempo analisados não houve a formação de halo antimicrobiano em nenhum dos três materiais avaliados (Fig. 4). O halo do controlo positivo apresentou um crescimento ao longo do tempo, registando um valor máximo de 20,17 mm ao fim de 30 dias (Fig.5)

3. RESULTS

In the four-time intervals analyzed, no antimicrobial halo was formed on any of the three materials evaluated (Fig. 4). The halo of the positive control grew over time, registering a maximum value of 20.17 mm after 30 days (Fig.5).



Figura/Figure 4: Halos antimicrobianos formados ao longo dos quatro períodos de tempo (A) 1 dia, (B) 7 dias, (C) 15 dias, (D) 30 dias. (GC)- Grupo controlo, (RC)- Resina composta nanohíbrida, (RF)- Selante à base de resina, (IO)- Ionómero de vidro/Antimicrobial halos formed over the four time periods (A) 1 day, (B) 7 days, (C) 15 days, (D) 30 days. (CG)- Control group, (CR)- Nanohybrid composite resin, (RF)- Resin-based sealant, (IO)- Glass ionomer.



Gráfico/Graphic 1: Diâmetro dos halos antimicrobianos formados no Grupo Controlo, ao longo dos quatro tempos de estudo/Diameter of the antimicrobial halos formed in the Control Group over the four study times.

Tabela/Table 3: Tamanho dos halos antimicrobianos (em mm) formados ao longo dos quatro intervalos de tempo/Size of the antimicrobial halos (in mm) formed over the four-time intervals

Grupos/Groups	1 dias/days	7 dias/days	15 dias/days	30 dias/days
RC	00,00±0,00	00,00±0,00	00,00±0,00	00,00±0,00
RF	00,00±0,00	00,00±0,00	00,00±0,00	00,00±0,00
IO	00,00±0,00	00,00±0,00	00,00±0,00	00,00±0,00
GC	16,33±2,07	17,66±1,50	18,33±1,70	20,16±1,60

3.1. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Relativamente à resina composta nanohíbrida, esperava-se a ausência de propriedades antibacterianas, já em relação ao selante à base de resina e ao ionómero de vidro, pela presença de flúor seria esperado ter obtido resultados antibacterianos. Avaliou-se em 4 tempos diferentes, para assim estudar o efeito do flúor ao longo do tempo, sendo que no ionómero de vidro esperava-se resultados significativos nas primeiras horas, apresentando um decréscimo com o tempo. Já no selante à base de resina, sendo um material preventivo, o esperado era que a libertação de flúor fosse aumentando com o tempo e o halo antimicrobiano regista-se o valor máximo ao final de 30 dias.

Pelos resultados apresentados não houve manifestação de propriedades antibacterianas de nenhum dos materiais restauradores estudados ao final de 1, 7, 15 e 30 dias de análise.

O desvio padrão obtido do grupo controlo foi baixo, demonstrando uma uniformidade e reprodutibilidade relativa ao conjunto de dados colhidos em todos os ensaios realizados.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a atividade antibacteriana de três materiais restauradores: resina composta nanohíbrida, selante à base de resina e ionómero de vidro, ao longo de quatro intervalos distintos: 1, 7, 15 e 30 dias, respetivamente. Esta avaliação foi conduzida, contra a bactéria *S. mutans* DSM 2523, reconhecida como um dos principais agentes causadores de lesões cárie dentária (Ayse- Gunay *et al.*, 2022).

3.1 ANALYSING THE RESULTS

The nanohybrid composite resin was expected to have no antibacterial properties, while the resin-based sealant and glass ionomer were expected to have antibacterial results due to the presence of fluoride. The effect of fluoride over time was analyzed at four different times. With glass ionomer, significant results were expected in the first few hours, with a decrease over time. As for the resin-based sealant, since it is a preventive material, it was expected that the release of fluoride would increase over time and the antimicrobial halo would peak after 30 days.

From the results presented, none of the restorative materials studied showed antibacterial properties after 1, 7, 15 and 30 days of analysis.

The standard deviation obtained from the control group was low, demonstrating the uniformity and reproducibility of all the data collected in all the tests carried out.

4. DISCUSSION

In this study, we investigated the antibacterial activity of three restorative materials: nanohybrid composite resin, resin-based sealant and glass ionomer, over four different intervals: 1, 7, 15 and 30 days, respectively. This evaluation was conducted against the bacterium *Streptococcus mutans* DSM 2523, recognised as one of the main causative agents of dental caries lesions (Ayse-Gunay *et al.*, 2022).

Prevention in dentistry is crucial, especially through the application of resin-based sealants. However, studies show that after 5 years, approximately 73 per cent of sealants lose

A prevenção na medicina dentária é crucial, especialmente por meio da aplicação de selantes à base de resina. No entanto, estudos demonstram que após 5 anos, aproximadamente 73 % dos selantes perdem a sua integridade, comprometendo a sua eficácia protetora. A nanotecnologia tem sido empregue para melhorar a eficácia dos selantes à base de resina, incorporando agentes antibacterianos para evitar a formação de biofilme (Sedighe- Kamangar *et al.*, 2021).

Quando a prevenção falha, a seleção do material restaurador é crucial para evitar o surgimento de lesões de cárie secundária. Propriedades mecânicas inadequadas podem contribuir para esse problema tais como, a baixa resistência de união e microinfiltração (Giulio- Conti *et al.*, 2023). Para minimizar esse risco, é fundamental que os materiais utilizados contenham componentes antibacterianos, capazes de reduzir a disseminação de microorganismos, principalmente de *S. mutans* que é o principal agente cariogénico (Chhaya- Khare *et al.*, 2019, Neda- Hakimiha *et al.*, 2013).

Para avaliar as propriedades antibacterianas dos materiais em estudo foi realizado um ensaio de difusão em MS agar. Nos diferentes intervalos de tempo analisados, observamos que nenhum dos três materiais formou qualquer halo antimicrobiano, sendo que não era o expectável quer no selante à base de resina quer no ionómero de vidro. O grupo controlo foi o único que apresentou um halo de inibição, cujo tamanho aumentou ao longo do tempo, atingindo um valor máximo aos 30 dias, com um valor médio de $20,16 \pm 1,6$ mm.

Em relação à resina composta nanohíbrida, os nossos resultados estão em concordância com estudos anteriores. Nada-Mohamed *et al.*, 2020 revelaram ausência da formação de halo antimicrobiano na resina composta nanohíbrida, enquanto observaram um halo significativo na resina composta com partículas alcalinas, tanto fotopolimerizável ($10,60 \pm 1,67$) mm quanto autopolimerizável ($11 \pm 2,74$) mm. Segundo o autor, a ausência de halo antimicrobiano na resina composta nanohíbrida convencional pode ser atribuída à ausência de substâncias antibacterianas na composição, conforme corroborado pelas instruções do fabricante.

Para o selante à base de resina, caracterizado pela presença de sílica pirogénica e fluoreto de sódio, não encontramos estudos prévios que tenham realizado o ensaio de difusão em ágar com este material. No entanto, estudos anteriores analisados, revelaram resultados variáveis, devido às diferentes composições químicas dos selantes à base de resina utilizados. Muhammad-Khan *et al.*, 2023 não detetaram propriedades antibacterianas num material restaurador similar, já que a sua constituição continha apenas dimetacrilato de uretano (UDMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEDGMA), enquanto, Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021, observaram atividade antibacteriana num selante de resina à base de metacrilato contendo sílica amorfa. Este estudo demonstrou que a incorporação de 1 % de quitosano, que foi o suficiente para permitir aumentar significativamente o halo antimicrobiano, visto que o grupo controlo já pela presença da sílica amorfa tinha desenvolvido propriedades antibacterianas. Pelos resultados apresentados, o Fissurit® F deveria ter desenvolvido um halo antibacteriano não só pela presença de sílica como também pela libertação dos iões de flúor. Contudo, pelo facto de não haver estudos

their integrity, compromising their protective effectiveness. Nanotechnology has been used to improve the effectiveness of resin-based sealants by incorporating antibacterial agents to prevent biofilm formation (Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021).

When prevention fails, the selection of the restorative material is crucial to avoid the emergence of secondary caries lesions. Inadequate mechanical properties can contribute to this problem, such as low bond strength and microleakage (Giulio-Conti *et al.*, 2023). To minimise this risk, it is essential that the materials used contain antibacterial components capable of reducing the spread of microorganisms, especially *Streptococcus mutans*, which is the main cariogenic agent (Chhaya- Khare *et al.*, 2019, Neda- Hakimiha *et al.*, 2013).

To assess the antibacterial properties of the materials under study, a diffusion test was carried out on MS agar. In the different time intervals analyzed, we observed that none of the three materials formed any antimicrobial halo, which was not expected for either the resin-based sealant or the glass ionomer. The control group was the only one to show an inhibition halo, the size of which increased over time, reaching a maximum value at 30 days, with an average value of 20.16 ± 1.6 mm.

Regarding nanohybrid composite resin, our results agree with previous studies. Nada-Mohamed *et al.*, 2020 revealed the absence of antimicrobial halo formation in nanohybrid composite resin, while they observed a significant halo in composite resin with alkaline particles, both light-cured (10.60 ± 1.67) mm and self-cured (11 ± 2.74) mm. According to the author, the absence of an antimicrobial halo in conventional nanohybrid composite resin can be attributed to the absence of antibacterial substances in the composition, as corroborated by the manufacturer's instructions.

For the resin-based sealant, characterised by the presence of fumed silica and sodium fluoride, we found no previous studies that carried out the agar diffusion test with this material. However, previous studies analysed revealed variable results due to the different chemical compositions of the resin-based sealants used. Muhammad-Khan *et al.*, 2023 did not detect antibacterial properties in a similar restorative material, as its constitution contained only urethane dimethacrylate (UDMA) and triethylene glycol dimethacrylate (TEDGMA), while Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021, observed antibacterial activity in a methacrylate-based resin sealant containing amorphous silica. This study showed that the incorporation of 1 % chitosan was enough to significantly increase the antimicrobial halo, since the control group had already developed antibacterial properties due to the presence of amorphous silica. From the results presented, Fissurit® F should have developed an antibacterial halo not only due to the presence of silica but also due to the release of fluoride ions. However, because there were no previous studies, comparisons with other materials, which despite having common components, ended up making the results vary, as each resin-based sealant has its own characteristics.

In addition, the concentration of fluoride and silica in these materials may not be adequate to manifest their antibacterial effect (Ayse-Gunay *et al.*, 2022, Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021, Ana- Diniz *et al.*, 2023).

anteriores, a comparação com outros materiais, que apesar de apresentarem componentes em comum, acaba por fazer os resultados variar, visto que cada selante à base de resina apresenta as suas próprias características. Para além disso, nestes materiais a concentração de flúor e sílica podem não apresentar uma concentração adequada para a manifestação do seu efeito antibacteriano (Ayse- Gunay *et al.*, 2022, Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021, Ana- Diniz *et al.*, 2023).

Quanto ao ionómero de vidro, esperava-se atividade antibacteriana devido à presença de flúor e cálcio, principalmente nas primeiras horas de avaliação. Estudos conduzidos por Ayse- Gunay *et al.*, 2023 e Savas-Sagmak *et al.*, 2019 registaram valores mais elevados ao final do segundo dia de avaliação, (8.52 ± 0.48) mm e (12.84 ± 0.40) mm respetivamente, e um valor mais baixo no sexto dia de avaliação, (7.10 ± 0.12) mm e (10.48 ± 0.78) mm, respetivamente. Este efeito de “explosão inicial” do flúor ajuda a eliminar as bactérias presentes na cavidade oral, tendo um efeito remineralizante no esmalte e na dentina (Savas-Sagmak *et al.*, 2020). No entanto, em nenhum momento do nosso estudo observamos formação de um halo antimicrobiano. É também de realçar que algum parâmetro no desenho experimental (meio, horas, inóculo) também pode influenciar negativamente e ser uma fonte de falta de resultados no nosso estudo.

A atividade antimicrobiana dos ionómeros de vidro pode estar associada a diversos fatores, incluindo, a composição química exata/concentração de iões fluoreto libertados, bem como a sensibilidade das bactérias (Alicja-Porenczuk *et al.*, 2019). Estudos anteriores demonstraram que os ionómeros de vidro convencionais em comparação com os modificados ou reforçados, apresentaram baixa atividade antibacteriana (Ayse- Gunay *et al.*, 2022). Por exemplo, Arass- Noori *et al.*, 2019, constataram que a adição de uma concentração de 10 % de óxido de magnésio resultou em um halo de inibição de 3,5 mm, enquanto, que o ionómero convencional, bem como uma percentagem de 1 % não mostraram formação de halos antimicrobianos.

No presente estudo, realizamos comparações entre materiais restauradores de diferentes grupos e com características diferentes entre si. Além disso, os materiais foram avaliados ao longo de um período significativo permitindo a análise das variações no halo antimicrobiano formado numa primeira estância e depois com a progressão do tempo. Pela literatura analisada, a concentração de flúor é um fator crucial, tendo a análise das instruções dos fabricantes quer no ionómero de vidro quer no selante à base de resina revelado a ausência dos seus valores de concentração, pelo que pode ter sido um fator limitativo. Contudo é importante ressaltar que, por ser um estudo *in vitro*, existem variações tendo em comparação as variáveis da cavidade oral, pelo que a própria diferença de humidade pode ter influenciado os resultados.

No entanto, são necessários mais estudos para avaliar esses materiais, em diferentes contextos incluindo análises *in vitro* e *in vivo* levando em consideração outras propriedades como mecânicas/físicas, capacidade de polimerização adequada, selamento marginal e microinfiltração. Essa abordagem mais abrangente permitirá um entendimento completo das

As for glass ionomer, antibacterial activity was expected due to the presence of fluoride and calcium, especially in the first few hours of evaluation. Studies conducted by Ayse-Gunay *et al.*, 2023 and Savas-Sagmak *et al.*, 2019 recorded higher values at the end of the second day of assessment, (8.52±0.48) mm and (12.84 ± 0.40) mm respectively, and a lower value on the sixth day of assessment, (7.10±0.12) mm and (10.48 ± 0.78) mm respectively. This ‘initial burst’ effect of fluoride helps to eliminate the bacteria present in the oral cavity, having a remineralising effect on enamel and dentin (Savas-Sagmak *et al.*, 2020). However, at no point in our study did we observe the formation of an antimicrobial halo. It should also be noted that some parameters in the experimental design (medium, hours, inoculum) could also have a negative influence and be a source of missing results in our study.

The antimicrobial activity of glass ionomers can be associated with several factors, including the exact chemical composition/concentration of fluoride ions released, as well as the sensitivity of the bacteria (Alicja-Porenczuk *et al.*, 2019). Previous studies have shown that conventional glass ionomers, compared to modified or reinforced glass ionomers, have low antibacterial activity (Ayse-Gunay *et al.*, 2022). For example, Arass-Noori *et al.*, 2019, found that the addition of a 10 % concentration of magnesium oxide resulted in an inhibition halo of 3.5mm, while conventional ionomer as well as a 1 % percentage showed no antimicrobial halos.

In this study, we made comparisons between restorative materials from different groups and with different characteristics. In addition, the materials were evaluated over a significant period of time, allowing us to analyze the variations in the antimicrobial halo formed initially and then as time progressed. According to the literature analyzed, fluoride concentration is a crucial factor, and analysis of the manufacturers' instructions for both the glass ionomer and the resin-based sealant revealed the absence of concentration values, which may have been a limiting factor. However, it is important to emphasize that, as this is an *in vitro* study, there are variations when comparing the variables of the oral cavity, so the difference in humidity itself may have influenced the results.

However, more studies are needed to evaluate these materials in different contexts including *in vitro* and *in vivo* analyses, considering other properties such as mechanical/physical, adequate polymerization capacity, marginal sealing and microleakage. This more comprehensive approach will allow a complete understanding of the advantages of these restorative materials (Ayse-Gunay *et al.*, 2022), (Sedighe-Kamangar *et al.*, 2021).

5. CONCLUSIONS

It can be concluded that the three restorative materials evaluated do not have antimicrobial activity against the bacterium *Streptococcus mutans* DSM 2523, and at none of the times evaluated was there any change in the values. This research has some limitations in the sense that the absence of conditions that reproduce oral humidity may have influenced the results, particularly in the case of glass ionomer and resin-based sealant.

vantagens desses materiais restauradores (Ayse- Gunay *et al.*, 2022), (Sedighe- Kamangar *et al.*, 2021).

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que os três materiais restauradores avaliados não apresentam atividade antimicrobiana contra a bactéria *Streptococcus mutans* DSM 2523, sendo que em nenhum dos momentos avaliados houve alteração dos valores. Esta investigação possui algumas limitações no sentido que a ausência de condições que reproduzam a humidade oral pode ter influenciado os resultados, particularmente no caso do ionómero de vidro e no selante à base de resina.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto Universitário de Ciências da Saúde IUCS- CESPU, sendo a componente laboratorial realizada no laboratório 1H-TOXRUN.

CONTRIBUIÇÕES AUTORAIS

Para artigos de investigação com vários autores, deve ser fornecido um curto parágrafo especificando as suas contribuições individuais. Devem ser utilizadas as seguintes declarações Conceptualização, Ana.R e Orlanda.T.; metodologia, Ana.R e Orlanda.T.; António R, Marie. M, Célia. R e Lígia. R validação, Orlanda.T, António.R. e Marie.M.; investigação, Célia.R António.R e Marie.M.; estatística, Célia.R; curadoria de dados, Ana.R.; redação - preparação do draft original, Ana.R e Orlanda.T.; redação - revisão e edição, Ana.R, Orlanda.T, António.R e Marie.M.; Lígia. R e Célia. R visualização, Célia.R António.R, Marie.M e Lígia. R; supervisão, Orlanda.T; coordenação do projeto, Orlanda.T. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Instituto Universitário de Ciências da Saúde IUCS- CESPU, and the laboratory component was carried out in the 1H-TOXRUN laboratory.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualisation, Ana.R and Orlanda. T; methodology, Ana.R and Orlanda. T; António R, Marie. M, Célia. R and Lígia. R validation, Orlanda.T, António.R. and Marie.M.; research, Célia.R António.R and Marie.M.; statistics, Célia.R; data curation, Ana.R; writing - preparation of original draft, Ana.R and Orlanda.T.; writing - revision and editing, Ana.R, Orlanda.T, António.R and Marie.M.; Lígia. R and Célia. R visualisation, Célia.R António.R, Marie.M and Lígia. R; supervision, Orlanda.T; project coordination, Orlanda.T. All the authors have read and agreed with the published version of the manuscript.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- Sagmak S, Bahsi E, Ozcan N, Satici O, Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy and Fluoride Release of Seven Different Glass-Ionomer-Based Restorative Materials, In: Oral Health Prev Dent 18/2020, Sagmak S (ed). Diyarbakir, Turkey, 521-528: 2019
- Khan MA, Muhammad N, Liaqat S, Ejaz M, Fayyaz S, Ali H, Khan T, Mechanical and antibacterial properties of conventional pit and fissure sealants with addition of miswak fibers, In: Biomaterial Investigations in Dentistry 2023 VOL. 10, NO. 1, 2271972, Khan MA (ed), Institute of Basic Medical Sciences, Khyber Medical University, Peshawar, Khyber Pakhtunkhwa, 25100, Pakistan: 2023
- Gunay A, Celenk S, Adiguzel O, Cangul S, Ozcan N, Cakmakoglu EE. Comparison of Antibacterial Activity, Cytotoxicity, and Fluoride Release of Glass Ionomer Restorative Dental Cements in Dentistry. Medical Science Monitor, 29, 2023
- Chen Y, Caneli G, Almousa R, Hill K, Na S, Anderson GG, Xie D, A self-cured glass-ionomer cement with improved antibacterial function and hardness. Polym Adv Techno, Chen Y (ed). Polym Adv Technol, England, 3048-3058: 2020
- Conti G, Veneri F, Amadori F, Garzoni A, Majorana A, Bardellini E. Evaluation of Antibacterial Activity of a Bioactive Restorative Material Versus a Glass-Ionomer Cement on Streptococcus Mutans: In-Vitro Study, Dental Research Journal Dent J, 2021
- Mendes M, Garcez J, Góis Sá A, Pinho T, M Souza JC, Torres O, The effect of different dietary and therapeutic solutions on the color stability of 2 resin-matrix composites used in dentistry: an in vitro study, Materials 14, 2021
- Kamangar S, Zareian H, Bahador A, Pourhajibagher M, Bashareh Z, Valizadeh S. Evaluation of Antibacterial Effects of Fissure Sealants Containing Chitosan Nanoparticles. Int J Dent, Boonlert Kukiattrakoon (ed), 2021
- Al-Saleh S, Alshahrani A, Albaqawi AH, Alqarawi FK, Alzahrani KM, Tanveer SA, et al. Use of Photosensitizer, Glutaraldehyde, alcohol and Ultrasonics in disinfection of polished and rough surfaces of self-curing polymethyl methacrylate denture base material. Photodiagnosis Photodyn, 2021
- Khere CH, Hiremath H, Sandesh N, Misar P, Gorie N. Evaluation of antibacterial activity of three different glass ionomer cements on streptococcus mutans: An in-vitro antimicrobial study, Med Pharm Rep, Khere C (ed), College of Dentistry, Indore, India:288-93, 2019
- Hakiminha N, Khoel F, Bahador A, Fekrazad R, The susceptibility of Streptococcus mutans to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. European Journal of Dentistry, 2020

- Mohamed NI, Safy RK, Elezz AFA. Microtensile Bond Strength, Marginal Leakage, and Antibacterial Effect of Bulk Fill Resin Composite with Alkaline Fillers versus Incremental Nanohybrid Composite Resin, In Eur J Dent, Mohamed NI (ed): 425–32, 2021
- Diniz, A.C.; Bauer, J.; Veloso, S.d.A.R.; Abreu-Pereira, C.A.; Carvalho, C.N.; Leitão, T.J.; Firoozmand, L.M.; Maia-Filho, E.M. Effect of Bioactive Filler Addition on the Mechanical and Biological Properties of Resin-Modified Glass Ionomer. *Materials* 2023, 16, 1765
- Porenczuk A, Grzeczkowicz A, Maciejewska I, Gołaś M, Piskorska K, Kolenda A, Gozdowski D, Kopeć-Swoboda E, Ludomira Granicka L, Olczak-Kowalczyk D. An initial evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a disinfection liquid containing silver nanoparticles alone and combined with a glass-ionomer cement and dentin bonding systems, In Adv Clin Exp Med, Porenczuk A (ed), Poland, 75–83: 2019
- Noori AJ, Kareem FA, The effect of magnesium oxide nanoparticles on the antibacterial and antibiofilm properties of glass-ionomer cement. *Heliyon*, 2019
- Hiremath H, Harinkhere C, Misar P, Sabley K, Bajpai T, Mechanical and antimicrobial property of different surface treated glass ionomer cements under desiccated condition, In Dental Research Journal Vol 1, 2021