



“Sapienza” Università di Roma

Dottorato di Ricerca in Malattie dello Scheletro e del
Distretto Oro-Cranio-Facciale.

Tesi Finale XXIX Ciclo

“UTILIZZO DEI NANO MATERIALI, CON PROPRIETÀ
ANTIMICROBICHE, COME FILLER NEGLI ADESIVI
SMALTO-DENTINALI”

Relatore:
Prof. M. Bossù

Dottorando:
Dott. G. Di Giorgio

A Mamma, Papà e Danilo
punti Cardine della mia Vita

Ad Antonio Casavecchia,
Maestro di Vita e di Sport

A Bruno Romanelli,
per avermi Insegnato cosa significhi realmente
indossare un “semplice” Camice Bianco

INTRODUZIONE.....	5
CAPITOLO 1. LA CARIE.....	7
1.1 CENNI EPIDEMIOLOGICI.....	7
1.2 EZIOPATOGENESI DELLA CARIE	10
1.3 ASPETTI MICROBIOLOGICI	13
1.3.1 <i>Placca Dentale</i>	13
1.3.2 <i>Microbiologia della carie</i>	16
CAPITOLO 2. ADESIVI SMALTO-DENTINALI	19
2.1 MATERIALI IN ODONTOIATRIA CONSERVATIVA	19
2.2 MECCANISMO DI ADESIONE	22
2.3 ADESIONE ALLE STRUTTURE DENTALI	25
2.4 SVILUPPO DEI SISTEMI ADESIVI	29
2.5 NANOTECNOLOGIE APPLICATE AGLI ADESIVI DENTALI	33
2.5.1 <i>Grafene: Tecniche di produzione</i>	35
2.5.2 <i>Biocompatibilità e proprietà antimicrobiche del grafene</i>	39
CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI.....	42
3.1 PRODUZIONE DELL'ADESIVO	42
3.2 TEST ANTIMICROBICI.....	43
3.3 TEST DI ADESIONE.....	45
3.4 PREPARATIVA SEM	49
CAPITOLO 4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI OTTENUTI	50
4.1 TEST ANTIMICROBICI.....	50
4.1.1 <i>Analisi delle dimensioni medie dei GNP prodotti</i>	50
4.1.2 <i>Test di vitalità batterica su adesivo</i>	52
4.2 TEST MECCANICI.....	61
4.2.1 <i>Analisi della forza di legame dell'adesivo</i>	61
4.2.2 <i>Qualità dell'interfaccia filler-matrice</i>	66
CONCLUSIONI.....	69
BIBLIOGRAFIA	72

Introduzione

Il cavo orale è normalmente colonizzato da numerosi microrganismi anche coloro i quali strettamente correlati alla Patologia Cariosa.

La Carie è una Patologia multifattoriale che presenta come aspetto clinico la perdita di tessuto duro, dovuta alla de-mineralizzazione dello smalto.

Il trattamento prevede l'eliminazione del tessuto affetto e la sua sostituzione con materiali che possano restituire la forma e la funzione adeguata.

Ad oggi, indubbiamente i materiali più utilizzati per effettuare la ricostruzione di un elemento dentario colpito da carie sono le resine composite, materiali formati dalla combinazione di una matrice polimerica resinosa metacrilica con riempitivi nanometrici che conferiscono resistenza al materiale. Dalla polimerizzazione della matrice resinosa si ottiene la formazione di un prodotto esteticamente e strutturalmente.

Il processo di polimerizzazione di tali materiali porta ad una riduzione volumetrica compresa tra 1,5% e 6%, definito *shrinkage*. La contrazione comporta uno stress interno al composito che causa la perdita di legame nell'interfaccia dente-composito, con formazione di micro lacune marginali che vanno a costituire un ottimo substrato per la crescita batterica, con formazione quindi di carie secondarie in grado di minare l'integrità del restauro. A tal proposito studi recenti sono incentrati sullo sviluppo di materiali dentali antimicrobici utilizzando nano particelle inorganiche, soprattutto metalliche, come riempitivi.

Lo scopo dello studio è stato quello di studiare e produrre un adesivo dentale con proprietà antibatteriche attraverso l'impiego di filler micro e nanometrici a base di grafene.

La parte sperimentale del lavoro è stata eseguita nei laboratori del Centro di Ricerca per le Nanotecnologie applicate all'Ingegneria dell'Università La Sapienza di Roma (CNIS). Durante il periodo di studio siamo stati supportati dalla collaborazione del gruppo del Professor Claudio Palleschi del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie e della Professoressa Maria Sabrina Sarto del Dipartimento di Ingegneria Astronautica, Elettrica ed Energetica dell'Università La Sapienza di Roma.

Frutto di tale ricerca è stato un prototipo di adesivo che, rispetto al suo analogo commerciale, possiede buoni requisiti antibatterici innovativi mantenendo discrete proprietà meccaniche. Qui di seguito verranno espone in dettaglio le indagini sperimentali ed i risultati ottenuti.

Capitolo 1. La Carie

1.1 Cenni epidemiologici

La Carie ad oggi è sicuramente la patologia dentaria più diffusa in tutto il mondo (fig.1-2), che colpisce differenti fasce d'età, con un significativo impatto sulla spesa sanitaria pubblica e sulla qualità della vita di ogni individuo¹. Nel 1986 Walter Loesche la descrisse come l'infezione più costosa, insieme alla malattia parodontale, con cui la maggior parte degli individui deve lottare nel corso della propria vita². Nei paesi industrializzati, ancora oggi, rappresenta uno dei maggiori problemi sanitari, con un interessamento tra il 60 e 90 % dei bambini in età scolare. Il rischio di carie comprende fattori genetici, comportamentali, sociali e ambientali [Petersen et al., 2005; Dittmyer et al., 2010]. Importanti fattori di rischio come elevate concentrazioni di batteri cariogeni, abitudini dietetiche errate, una scarsa igiene orale associata a una insufficiente esposizione al fluoro ed un basso stato socio-economico sono ormai riconosciuti come responsabili della lesione cariosa; inoltre anche fattori come gli attributi socio-demografici del bambino (età, sesso, educazione ed età dei genitori), le abitudini potenzialmente rilevanti per l'esperienza della carie (uso di integratori di fluoro, numero di snack fuori pasto, frequenza di spazzolamento, motivazione del bambino, abitudini respiratorie), parto prematuro, allattamento al seno e fattori di rischio direttamente connessi all'ambiente orale del paziente (funzionalità delle ghiandole salivari, capacità tampone della saliva, pH della placca)³, giocano un ruolo di

fondamentale importanza per delineare i soggetti maggiormente suscettibili a sviluppare lesione cariosa.

L'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) incanala molte delle proprie risorse per attuare campagne Preventive finalizzate a ridurre l'incidenza della lesione cariosa; ai fini epidemiologici l'indice più frequentemente utilizzato è il DMFT (Decayed, Missing, Filled Theet), il quale registra il numero di elementi dentari mancanti per lesione cariosa, elementi cariati ed elementi otturati in cinque fasce d'età, ovvero, 6 anni per valutare la dentizione decidua, 12 anni per la dentizione permanente, 15-18 anni, qualche decennio fa era molto semplice reperire questa fascia d'età perché i giovani effettuavano la leva militare, ad oggi risultano anche molto importanti i 15 anni perché con lo sviluppo inizia uno stravolgimento ormonale che ha ripercussioni anche nel cavo orale, 35-44 anni per l'età adulta ed infine 65-74 per l'età geriatrica.

Nel 1981 l'Organizzazione Mondiale della Sanità e la FDI World Dental Federation formularono degli obiettivi da raggiungere entro il 2000 per la salute orale.

Questi riguardavano:

- il 50% dei soggetti di 5/6 anni liberi da carie;
- la media globale doveva avere un DMFT non oltre 3 a 12 anni di età;
- l'85% della popolazione doveva mantenere tutti i denti fino all'età di 18 anni;
- una riduzione del 50% dell'edentulia tra i 35-44 rispetto al livello del 1982;

- una riduzione del 25% dell'edentulia all'età di 65 anni e più, rispetto al livello del 1982;
- stabilire un database per il monitoraggio dei cambiamenti della salute orale.

Ad oggi è stato ulteriormente ridotto il DMFT limite che non deve superare l'1; in quanto in questi 30 anni è stata stravolta l'idea di salute ed anche di prevenzione, mirata ad eliminare i fattori di rischio.

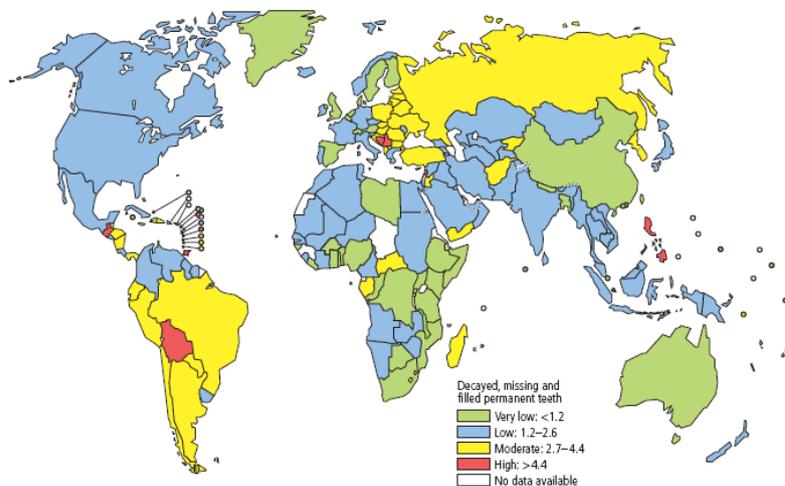


Figura 1. Livello mondiale di carie (dmft) in individui di 12 anni (Dicembre 2004, WHO).

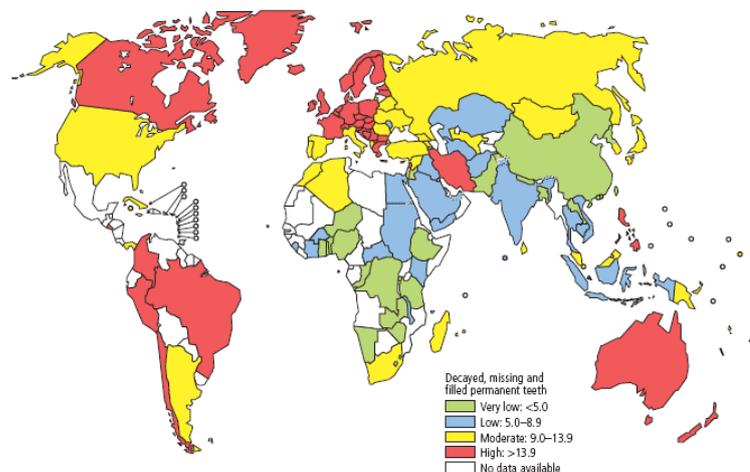


Figura 2. Livello mondiale di carie (DMFT) in individui tra 35 e 44 anni (Dicembre 2004, WHO).

Negli ultimi quarant'anni studi epidemiologici hanno dimostrato una forte diminuzione della patologia cariosa nei paesi occidentali a livello pediatrico. In Italia dagli anni '70 si è riscontrata una riduzione del 90% del DMFT in bambini di 12 anni, passando da un punteggio di 6.9 [Vogel et al.,1979] a 1.09 [Campus et al., 2006], trend riscontrabile anche nella dentizione decidua con un indice dmft di 0.8 in individui di 4 anni [Castiglia et al.,2006]⁴.

1.2 Eziopatogenesi della carie

L'OMS definisce la carie dentaria come “un processo patologico localizzato, d'origine esterna, che compare dopo l'eruzione del dente e che si accompagna ad un rammollimento dei tessuti duri ed evolve verso la formazione di una cavità”. Secondo la definizione di Roccia si tratta di un “processo distruttivo progressivo irreversibile dei tessuti duri del dente (smalto, dentina, cemento) che si estende dalla superficie in profondità ed è caratterizzata da una decalcificazione progressiva del dente con successiva dissoluzione della componente organica”⁵.

Come ripetuto più volte la patologia cariosa ha un'origine multifattoriale, dovuta ovvero ad uno squilibrio che si viene a creare tra microrganismi commensali che normalmente colonizzano il cavo orale ed il cavo orale stesso (Fig.3).

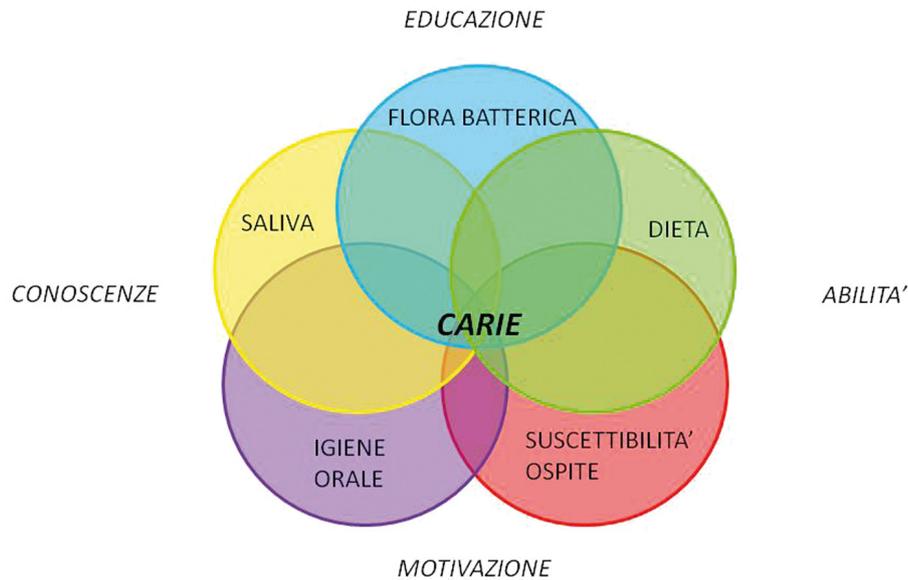


Figura 3. Fattori coinvolti nello sviluppo della carie: fattori direttamente implicati, fattori ambiente orale e fattori personali

Per avere un'adeguata salute orale tutti questi elementi devono essere in equilibrio; nella suscettibilità dell'ospite è inclusa la Saliva, in quanto svolge la Buffering Capacity⁶, ovvero è capace di ripristinare il pH fisiologico nell'arco di 45 minuti in seguito all'assunzione di zucchero, ovviamente soggetti che presentano un pH salivare acido hanno una maggior suscettibilità nello sviluppare la lesione cariosa, inoltre deterge e lubrifica comportando così un minor accumulo di placca sulle superfici dentali⁷. All'interno della saliva sono presenti numerosi elementi che svolgono un ruolo antibatterico importantissimo, tra questi ricordiamo il lisozima, la lactoferrina, lactoperossidasi e le IgA secretorie⁷.

La “Effective Diet” è di fondamentale importanza nel prevenire l’insorgenza delle lesioni cariose, perché, gli zuccheri ingeriti vengono fermentati dai microrganismi presenti nel cavo orale producendo acidi che abbassano notevolmente il pH⁸; raggiunto il pH critico, che per l’idrossiapatite è di 5,5⁹ (Fig. 4), avviene uno scambio di ioni calcio e fosforo tra smalto ed ambiente orale portando così la demineralizzazione della superficie dentale e l’iniziale lesione cariosa chiamata White Spot⁷.

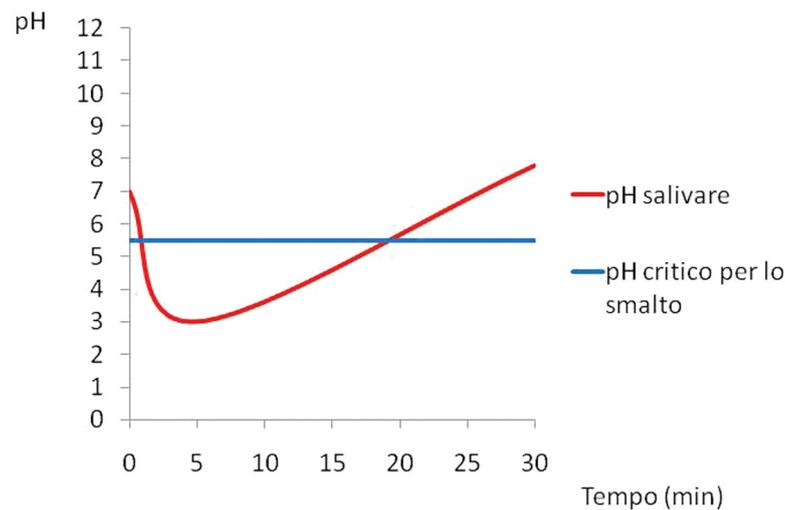


Figura 4. Tipica curva di Stephan raffigurante l’andamento del pH della placca dopo ingestione di carboidrati fermentabili [9].

Successivamente all’iniziale demineralizzazione i microrganismi presenti tendono ad accumularsi nelle nicchie ecologiche e permanere per lunghi periodi di tempo, essendo queste superfici più ritentive; questo determina una crescita esponenziale dei microrganismi con progressione della lesione cariosa dallo smalto al tessuto dentinale¹⁰.

1.3 Aspetti microbiologici

Nel trattato di Fourchard del 1679 fu data la prima definizione della carie, indicandola come una “malattia dei denti che porta alla loro distruzione”.

Sono numerose le teorie che vedono come causa della lesione cariosa l'infezione e quindi l'attività di microrganismi patogeni, ad oggi è ancora accreditata la Teoria Chimica-Parassitaria o della “decalcificazione acida” di Miller (1890, Miller), nella quale la demineralizzazione e la dissoluzione della matrice inorganica si verifica per la produzione di acidi da parte delle numerose specie batteriche presenti nel cavo orale, in presenza di zuccheri alimentari¹¹.

1.3.1 Placca Dentale

Possiamo definire biofilm un conglomerato di microrganismi che si circondano di una matrice polimerica complessa, definita anche *slime*, contenente principalmente proteine, polisaccaridi e materiale genetico. La ricerca, nel corso degli anni, ha messo in luce il fatto che moltissime specie microbiche, in particolare batteriche, tendono a organizzarsi come biofilm al fine di aumentare la propria resistenza agli agenti antibatterici e garantirsi, così, una maggiore sopravvivenza. Il film microbico gioca un ruolo fondamentale nelle due principali patologie di competenza odontoiatrica. Comprendere al meglio la struttura e la biologia dello stesso è fondamentale ai fini della comprensione dei processi

eziopatogenetici che stanno dietro alla patologia cariosa ed alla malattia parodontale. La placca dentale è un importante esempio di biofilm (fig. 5); le fasi principali della formazione sono:

1. vengono adsorbite sulla superficie del dente alcune sostanze idrofobe e macromolecole: si forma la pellicola acquisita, formata da mucine e anticorpi;
2. si verificano alterazioni della carica elettrica e dell'energia libera della superficie, aumentando l'aderenza batterica. Alcuni batteri aderiscono tramite fimbrie, altri necessitano di una prolungata esposizione per aderire saldamente. Per primi aderiscono i gram +, in seguito i gram – anaerobi;
3. i batteri adesi possono passare da uno stato di quiescenza ad uno di intensa attività replicativa e secretiva (vengono infatti prodotte nuove componenti di membrana);
4. i batteri si replicano, aumentando il volume del film e favorendo ulteriormente l'adesione;
5. gli strati profondi della pellicola vengono a trovarsi in condizione di anaerobiosi; i batteri presenti in tali zone producono sostanze in grado di aggredire i tessuti parodontali.

Dopo accurata pulizia dei denti lo smalto risulta ricoperto dalla pellicola acquisita. Aderiscono le specie pioniere che sono cocchi gram-positivi e gram-negativi aerobi: *S.sanguis*, *S.gordonii*, *Actinomyces naeslundii* e *Neisseria sicca* mediante fimbrie che si legano alla pellicola acquisita. Da 2 a 8 ore la colonizzazione diventa "dura" o per meglio dire consolidata. Si hanno quindi 16 ore di relativamente crescita rapida con formazione di colonie

che con l'aumentare del numero tendono a confluire. Risultano tutte immerse in polimeri batterici, che sono essenzialmente polisaccaridi extracellulari e glicoproteine salivari. Dopo 24 ore gli streptococchi, soprattutto *S.sanguis*, rappresentano il 95% dei microorganismi presenti. I bastoncini gram-positivi ammontano a pochi esemplari (ci si riferisce alle specie) che sono *Actinomyces viscosus* e *Rothia dentocariosa*. Gli anaerobi sono in questa fase pochissimi. I pochi bastoncini appaiono uniti in ammassi perpendicolari allo smalto, simili a palizzate.

Ogni nuova cellula batterica diventa un substrato iniziante così da creare co-aggregazioni tra specie differenti¹² (Fig.5).

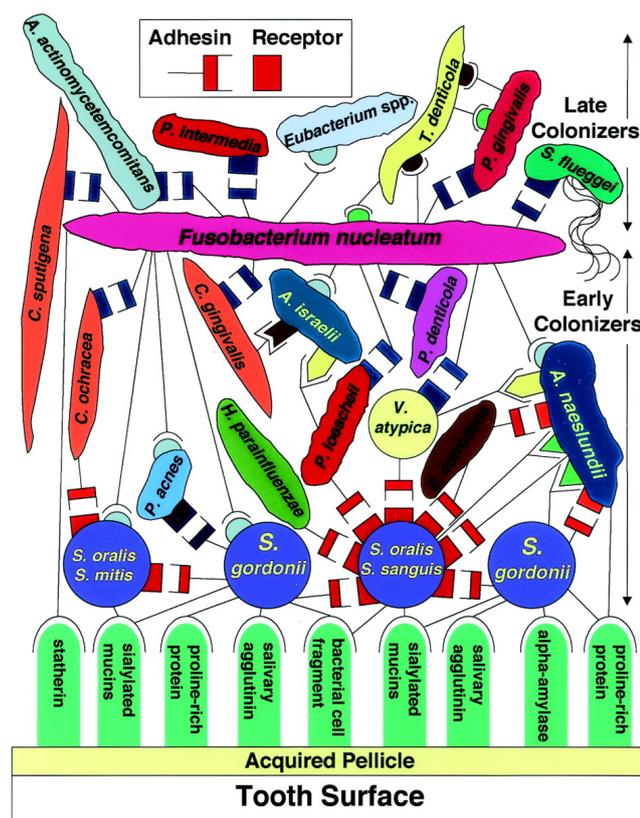


Figura 5 Rappresentazione della formazione della placca. Legame dei primi colonizzatori ai recettori della pellicola acquisita, coaggregazioni con altre specie.

La maturazione della placca avviene con il trascorrere dei giorni e si realizza senza un aumento consistente del numero dei batteri. Il metabolismo di quelli presenti, modifica l'ambiente, si abbassa la tensione di ossigeno e quindi si crea la situazione favorevole per la colonizzazione degli anaerobi. L'intera struttura che si è formata facilita l'adesione di altri microorganismi. Dopo 7 giorni gli streptococchi iniziano a calare mentre aumentano in modo considerevole i filamenti. Al microscopio risulta una struttura stratificata di cocci che si alternano ai bastoncini. Si ha un'ulteriore stratificazione di batteri *S.sanguis* un preformato costituito da una gran quantità di materiale intercellulare, germi filamentosi in particolare *F.nucleatum* e *B.matruchoyii*, disposti a pannocchia di granturco, un filamento centrale con cocci adesi intorno.

1.3.2 Microbiologia della carie

Sono diversi i microrganismi ritenuti responsabili della lesione cariosa; i microrganismi più spesso presi in considerazione sono gli Streptococchi orali e i Lactobacilli, anche se i Lactobacilli pur essendo acidofili si è visto che spesso si insediano in lesioni cariose già formate, contribuendo all'evoluzione e alla cronicizzazione della lesione.

Lo Steptococcus Mutans già negli anni '70 era ritenuto il principale responsabile della cariogenesi, poiché è isolabile nella maggior parte delle lesioni cariose floride; è un forte acidogeno, fermenta numerosi zuccheri con produzione di acido lattico; ha una forte tendenza ad aderire allo smalto dei denti e produce dal metabolismo degli zuccheri dei polisaccaridi, che gli consentono una forte e persistente adesività alla

struttura dei denti. Sono tre i meccanismi basilari con i quali lo Streptococco determina lesione cariosa sugli elementi dentali:

- Adesione;
- Capacità di crescere e svilupparsi in ambiente acido;
- Fermentazione e produzione di acido lattico.

L'adesione è il primo meccanismo con il quale i microrganismi aderiscono alla superficie del dente; possiamo dividere il processo in due fasi:

1. Fase saccarosio-indipendente:

Unione *non particolarmente salda* alla superficie dentale, dovuta all'interazione tra strutture superficiali del batterio e recettori salivari (pellicola dentale) o direttamente sullo smalto (idrossiapatite) come:

- Interazione strutture superficiali di *S. mutans* e agglutinine salivari presenti nella pellicola dentale;
- Adesine batteriche;
- Acido lipoteicoico (LTA): capace di aderire a proteine pellicola dentale, GTF e idrossiapatite;
- Complesso GTF-LTA: capace di aderire allo smalto.

2. Fase saccarosio dipendente:

In presenza di saccarosio, la GTF forma glucano insolubile che stabilizza l'unione di *S. mutans* alla superficie dentale;

- a) Viene prodotto a ridosso della superficie del dente aderendo da un lato al dente e dall'altro al batterio
- b) Funge da molecola-ponte tra le cellule di *S. mutans* (AGGLUTINAZIONE).

Lo *S. mutans* è in grado di crescere e di resistere a bassi valori di pH; è in grado di accrescersi fino a valori di pH pari a 4.8 e presenta attività metabolica fino a PH 4, secondo meccanismo. Infine moltiplicandosi, il batterio produce acido lattico come catabolita della fermentazione degli zuccheri: al di sotto di pH=5.2 la saliva non è più in grado di bilanciare la quantità di acido (fenomeno di re-mineralizzazione), e si ha una irreversibile demineralizzazione dei tessuti duri dentali.

La comunità microbica nelle lesioni dentali è eterogenea e contiene batteri anaerobi obbligati e facoltativi del genere *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Parvimonas* e *Rothia*. Altri gruppi come *Streptococco mitis*, *anginosus*, *salivarius*, *Propionibacterium*, *Enterococcus fecalis* e *Scardovia* possono anch'essi essere responsabili di indurre lesioni cariose¹³.

Studi recenti hanno scoperto una specie strettamente correlata con forme severe di ECC (Early Childhood Caries), chiamata *Scardovia wiggsiae*, precedentemente classificata come una specie indeterminata di *Bifidobacterium*¹⁴.

Capitolo 2. Adesivi smalto-dentinali

2.1 Materiali in Odontoiatria conservativa

L'Odontoiatria conservativa ha come finalità il restauro delle strutture dentarie colpite da lesione cariosa, con l'intento di ripristinarne morfologia e funzione preservando le parti sane del dente. La ricostruzione della cavità in precedenza preparata dall'odontoiatra avviene attraverso l'utilizzo di appositi materiali.

L'amalgama è stato il materiale più utilizzato per oltre 150 anni; usato per la prima volta dai cinesi. Un medico tedesco in Europa ne raccomandava l'utilizzo come materiale da riempimento nel 1528. A livello mondiale l'accettazione dell'amalgama come materiale da restauro avvenne alla fine del 1800 con Black, sviluppando una lega ottenuta dalla combinazione del 68,5% d'argento, 25,5% di stagno, 5% di oro, 1% di zinco. La composizione ha subito delle modificazioni nel tempo. La lega attualmente in uso è costituita da 0-3% di mercurio per la miscelazione, 40-70% d'argento, 12-30% di stagno e 12-24% di rame. Inoltre può contenere indio, palladio e zinco in ridotte percentuali¹⁵. Le sue caratteristiche sono: basso costo, facilità d'impiego, resistenza alla compressione e abrasione. Inoltre anche a distanza di tempo, i restauri in amalgama hanno mostrato un buon comportamento biomeccanico e un'adeguata chiusura a livello marginale. Mostra inoltre un'elevata versatilità, infatti è impiegata sia per restauri di piccole o ampie dimensioni, estendendosi anche a livello cuspidale. Gli svantaggi sono vari, primo su tutti è la mancanza di adesione alle strutture dentali comportando la necessità di una preparazione cavitaria estesa per la sua

ritenzione, sacrificando a volte tessuto residuo sano. La scarsa resistenza alla torsione e alla frattura, corrosione, impatto ambientale collegato allo smaltimento dei suoi residui, mancanza di estetica e presunta tossicità dovuta al rilascio di mercurio nel corpo sono altre proprietà negative¹⁶.

L'approccio terapeutico proposto da Black nel 1917 di "estensione per prevenzione" è stato sovvertito dal concetto di mini invasività incentrato sulla realizzazione di una cavità conservativa¹⁷. Questo ha permesso la sostituzione dell'amalgama grazie all'utilizzo delle resine composite. I materiali compositi sono costituiti da una matrice polimerica, tipicamente un dimetacrilato, particelle riempitive aggiunte alla matrice ed un agente accoppiante, il silano, che lega le due componenti. La matrice resinosa è costituita principalmente da un monomero di base, il Bis-GMA, prodotto dalla reazione tra *bisfenolo-A* e *glicidildimetacrilato*, elaborato nel 1957 da Bowen del National Bureau of Standards (oggi National Institute of Standards and Technology). Il monomero di Bis-GMA essendo molto viscoso viene diluito con altri monomeri bifunzionali come il *trietilenglicoldimetacrilato* (TEGDMA), *etilenglicoldimetacrilato* (EGDMA), *uretandimetacrilato* (UDMA). Il riempitivo inorganico è costituito principalmente da vetri a base di silicati modificati con bario, zinco, ittrio che impartiscono radiopacità alle particelle. Ioni di litio, alluminio, zirconio conferiscono al materiale vetroso migliori proprietà fisiche. La resistenza del materiale restaurativo è aumentata da tali filler che riducono il coefficiente di dilatazione termica lineare. Il legame tra gli elementi che costituiscono il composito è fondamentale affinché il materiale abbia buone proprietà meccaniche. Questo è ottenuto rivestendo le particelle di riempitivo con una pellicola monomolecolare

di agenti di accoppiamento a base di silano, i quali hanno la capacità di legarsi ai gruppi ossidrilici -OH del filler e ai doppi legami C=C dei monomeri della matrice. L'agente legante non solo aumenta la resistenza del composito ma riduce anche la sua solubilità e la capacità di assorbire acqua.

La classificazione dei materiali compositi si basa sulle dimensioni, concentrazione e composizione del riempitivo (Fig.6). I primi compositi, definiti *macroriempiti*, avevano particelle di dimensioni tra i 10 e i 50 μm presentavano un'elevata resistenza ma difficili da rifinire e lucidare¹⁸.

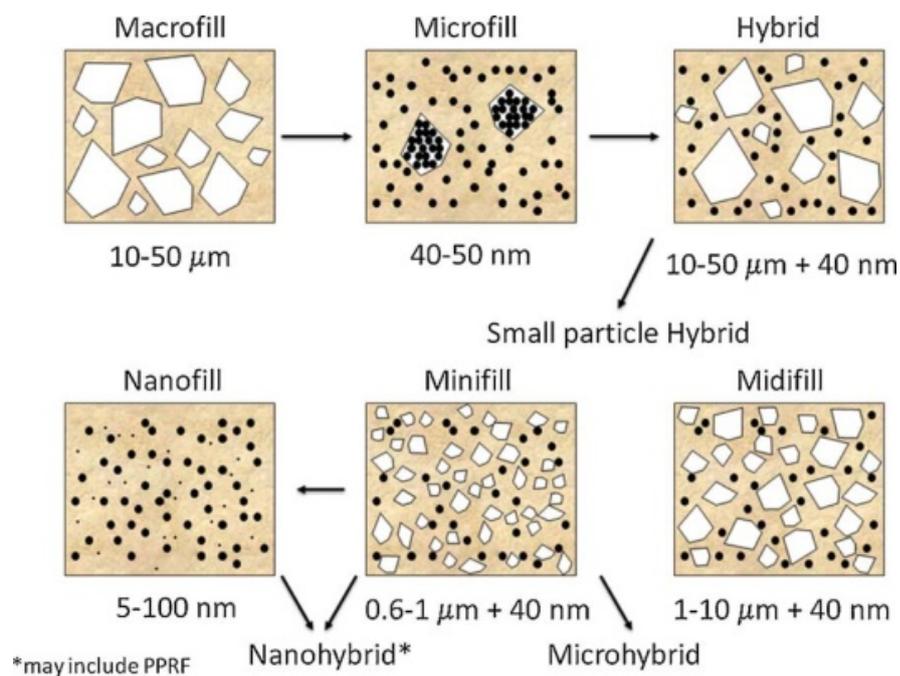


Figura 6. Classificazione delle resine composite in base alle dimensioni delle particelle di riempitivo.

Le caratteristiche di rifinitura e resistenza all'usura sono state rese più idonee da successive modifiche che portarono alla formulazione di compositi *microriempiti* da 40 a 50 nm e *nanoriempiti* da 5 a 100 nm, di compositi con gamme miste di dimensioni delle particelle definiti *ibridi* e

compositi eterogenei che contengono particelle prepolymerizzate di composito o di un altro filler (PPRF) all'interno della matrice.

La polimerizzazione è quel processo chimico-fisico che converte il monomero resinoso in polimero, consentendo al materiale di passare da una consistenza semifluida ad una rigida in modo da sopportare i carichi masticatori. Gli attuali compositi sono polimerizzabili tramite luce dello spettro visibile. La luce emessa dalle lampade fotopolimerizzatrici, con lunghezza d'onda tra i 460-480 nm, attiva i foto iniziatori presenti nel composito come il canforochinone (CQ), amine terziarie. La loro attivazione porta ad una reazione con formazione di radicali liberi che attaccano i monomeri promuovendone il legame, sviluppando così la catena polimerica. Allo stato attuale si stanno sperimentando materiali compositi con potenziale remineralizzante grazie al rilascio di calcio e fosfato, compositi con agenti antibatterici o che inibiscano la formazione del biofilm, contenenti clorexidina, nanoparticelle di ossido di zinco e derivati dell'ammonio quaternario¹⁸.

2.2 Meccanismo di adesione

L'adesione è definita dalla "American Society for Testing and Materials" come "lo stato in cui due superfici sono tenute insieme da legami interfacciali che possono essere di valenza o di interconnessione meccanica o di entrambi i tipi". L'adesivo è un materiale fluido viscoso che permette l'unione di due superfici distinte con la capacità di trasferire le forze di carico da una superficie all'altra. I meccanismi di adesione possono essere di *adsorbimento*, tramite legami chimici (ionici o covalenti,

legami idrogeno, forze di van der Waals), di *diffusione* come le interconnessioni tra polimeri, *elettrostatico* come il legame a livelli dell'interfaccia metallo-polimero, adesione *meccanica* caratterizzata da un'interconnessione micromeccanica dell'adesivo con le irregolarità nella superficie¹⁵. La formazione di un legame meccanico (interlocking meccanico) è alla base dell'adesione dentale, in tal modo la superficie viene condizionata (mordenzatura) con un acido al fine di creare microscopici rilievi e anfrattuosità che permetteranno la formazione di zaffi di resina all'interno della stessa. Talvolta si formano alcuni legami chimici con la componente inorganica (cristalli di idrossiapatite) ed organica (fibre collagene) del dente, ma generalmente forniscono un contributo limitato alla resistenza di legame.

L'interfaccia tra adesivo e superficie deve essere microscopicamente intima per garantire una buona adesione e ciò è strettamente dipendente dalla bagnabilità dell'adesivo stesso. Il contatto tra un liquido ed una superficie solida prende il nome di bagnabilità, in presenza di una fase gassosa o di un'altra fase liquida immiscibile con la prima. Essa viene quantificata con una grandezza nota come *angolo di contatto*, cioè quell'angolo che una goccia di liquido forma con la superficie su cui è adagiato (Fig.7). Questo fenomeno è descritto dalla legge di Young:

$$\gamma_{sa} = \gamma_{la} \cos \theta + \gamma_{sl}$$

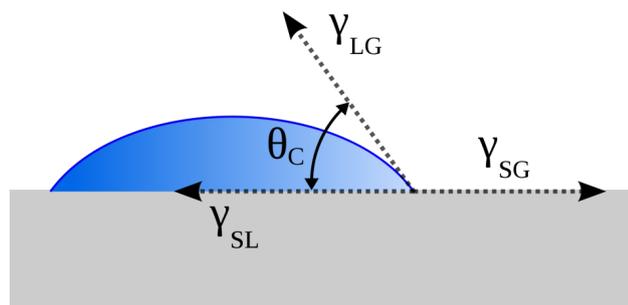


Figura 7. Angolo di contatto di un liquido con un solido.

L'angolo di contatto è il risultato dell'equilibrio che si stabilisce tra le tensioni superficiali delle interfacce liquido-aria (γ_{la}), solido-aria (γ_{sa}) e solido-liquido (γ_{sl}). Se la differenza dell'energia di interazione tra i due materiali è piccola, minore sarà tale angolo e maggiore sarà la bagnabilità del liquido^{19,20}.

I sistemi adesivi smalto-dentinali sono basati sul principio di formazione di un'area ibrida dovuta alla diffusione dei monomeri resinosi in essi contenuti attraverso i tessuti duri del dente. L'interconnessione dei compositi con le superfici dentali è resa possibile proprio dalla loro composizione. Sono formati da *monomeri idrofobici*, quindi insolubili in ambiente acquoso, come il bis-glicidilmetilacrilato (Bis-GMA), il trietilenglicoldimetacrilato (TEGDMA) e l'uretandimetacrilato (UDMA); *monomeri idrofili* che solubilizzandosi nell'ambiente umido della dentina ne facilita la bagnabilità, rappresentati principalmente dall'idrossietilmetacrilato (HEMA) e da monomeri acidi con gruppi fosforici (10-MDP, penta-P) o carbossilici (MAC-10, 4-MEC); *solventi organici* che permettono di mantenere in soluzione le due componenti monometriche e di veicolare le molecole di HEMA (*primer*) all'interno della compagine dentinale. Questi possono essere: Acetone, acqua o

alcol. L'evaporazione del solvente contenuto nell'adesivo favorisce la deposizione dei monomeri resinosi nel substrato dentinale permettendo la formazione dello strato ibrido. Mediante la reazione di polimerizzazione radicalica il sistema adesivo interagirà con la matrice organica del composito attraverso i suoi monomeri metacrilici superficiali reattivi. L'altra interfaccia è costituita dai citati legami d'interazione meccanica con la superficie dentale²¹.

2.3 Adesione alle strutture dentali

I denti sono organi duri costituiti da tre porzioni mineralizzate (smalto, dentina, cemento) e da un tessuto connettivo simil-embrionale, la polpa dentaria. Gli ameloblasti di origine ectodermica sono le cellule che costituiscono il tessuto smalteo. Nelle differenti aree varia di spessore: più spesso a livello dei margini incisali e superfici occlusali, diviene più sottile fino a terminare a livello della giunzione smalto-cemento. Per il 95-98% del peso è costituito da materia inorganica, altamente mineralizzata, presente sotto forma di cristalli di *idrossiapatite*. La restante parte ha un contenuto organico per circa 1-2% ed acqua pari al 4% circa del peso. Prismi con diametro dai 4 agli 8 μm costituiscono la sua struttura, i quali si estendono perpendicolarmente dalla giunzione amelodentinale alla superficie esterna. I prismi dello smalto sono composti ciascuno da milioni di piccoli cristalli di apatite, allungati e addensati strettamente con un orientamento specifico che dona resistenza ai prismi stessi. Gli *odontoblasti*, di origine ectomesenchimale, formano invece la dentina. La composizione dentinale è invece per circa

il 75% di materiale inorganico, 20% organico e 5% di acqua. È meno mineralizzata dello smalto e il suo contenuto minerale è composto soprattutto da cristalli d'idrossiapatite. Nonostante sia un tessuto duro risulta flessibile e questo le permette di sopportare lo smalto che è più fragile e non resiliente. La dentina si estende per quasi tutta la lunghezza del dente, ricoperta esternamente dallo smalto sulla corona e dal cemento a livello delle radici. Per tutta la sua intera ampiezza è attraversata dai tubuli dentinali. Questi sono percorsi da processi cellulari citoplasmatici (*fibres di Tomes*) degli odontoblasti. Il loro numero progredisce dall'esterno verso l'interno, passando da 15.000-20.000/mm² a livello della giunzione amelodentinale fino a 45.000-65.000 a livello pulpare. Il lume dei tubuli varia allo stesso modo dai 0,5-0,9 μm fino a 2-3 μm²⁰.

L'adesione smalto-dentinale è essenzialmente basata sulla sostituzione della componente minerale rimossa dai tessuti duri dentali con monomeri resinosi che dopo polimerizzazione vengono micro-meccanicamente interconnessi con le porosità create.

Fu Buonocore nel 1955 a dimostrare per primo che il condizionamento dello smalto con acido fosforico all'85% per 30 secondi aumentava la superficie microscopica disponibile alla ritenzione della resina comportando così un incremento della forza del legame resina-smalto²² (Fig.8). Nel 1967 Gwinnett, trattando le superfici dentali con acido e successivamente applicando diversi adesivi, osservò al microscopio ottico ed elettronico la presenza di materiale resinoso, definendolo "estensioni filamentose", che avvolgeva i cristalli dello smalto²³. Ciò che permette la penetrazione dei monomeri resinosi all'interno delle

microporosità è l'applicazione dell'adesivo sulla superficie mordenzata, favorita anche dalla capillarità, creando così dopo polimerizzazione degli zaffi resinosi (*resin tag*) che formano l'interlocking meccanico alla base del legame con lo smalto.

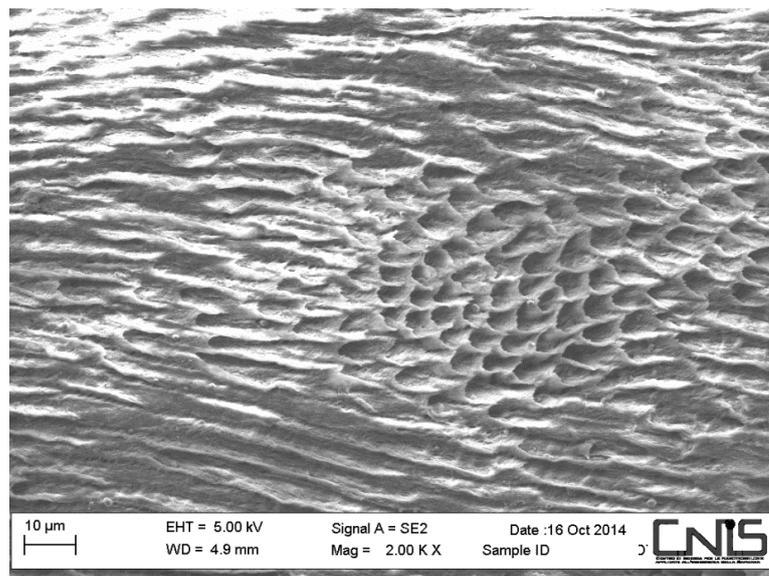


Figura 8. Superficie dello smalto al SEM dopo mordenzatura per 30 s con acido orto fosforico al 37%.

Tali zaffi che si formano tra i prismi dello smalto e lungo la periferia di questi vengono definiti *macrozaffi*. Quelli che si trovano alle estremità di ciascun prisma, che occupano delle piccolissime cripte lasciate dalla dissoluzione dei singoli cristalli d'idrossiapatite, *microzaffi*²⁰. L'adesione alla dentina è più difficile e meno prevedibile rispetto a quello che si realizza nel tessuto smalteo. Questo è dovuto alla struttura eterogenea della dentina caratterizzata da materiale inorganico immerso in una rete di fibre collagene e dalla presenza di tubuli contenenti fluidi organici che la connettono con il tessuto pulpare e che rende tale ambiente idrofilo. L'utilizzo di strumenti rotanti per la preparazione cavitaria forma uno

strato detritico di componenti organici ed inorganici, il cosiddetto *smear layer* o fango dentinale²⁴ (Fig.9A). L'identificazione dello *smear layer* fu resa possibile per la prima volta con la microscopia elettronica a scansione nel 1970 da Eickel al., costituito da particelle di dimensioni variabili da 0,5-15 μm . Successivamente Brännström e Johnson (1974) evidenziarono in preparazioni di cavità che lo spessore del fango dentinale era tra 2-5 μm il quale, estendendosi per pochi micrometri a livello dei tubuli dentinali, formava dei tappi definiti *smear plugs* (Fig.9B). La permeabilità dentinale a solventi e soluzioni è ridotta dalla presenza di tali detriti sulla superficie, inficiando la forza di legame delle resine adesive²⁵.

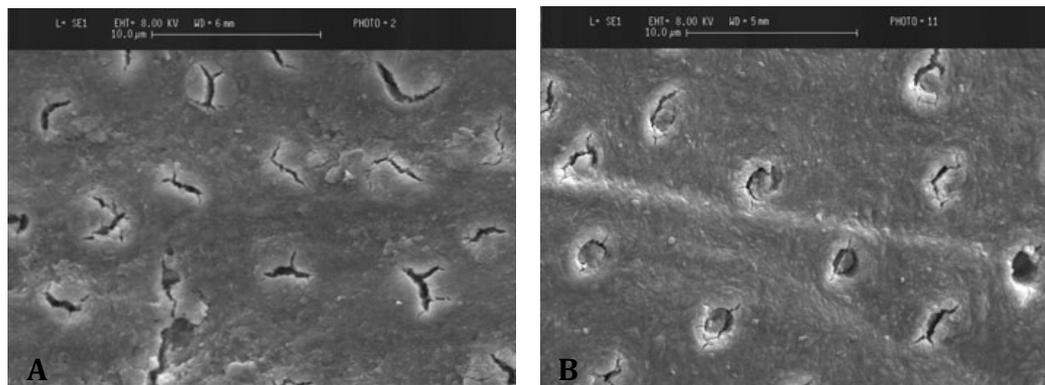


Figura 9. Immagini al microscopio elettronico della superficie dentinale che mostra la presenza di smearlayer (A) e smear plugs (B) che occludono i tubuli.

Gli studi di Nakabayashi e Pashley nel 1982 dimostrarono che il trattamento della superficie dentinale con un acido forte permetteva la dissoluzione della componente inorganica e contemporaneamente dello strato di *smear layer* e *smear plugs*. Questo consentiva l'infiltrazione della matrice resinosa dell'adesivo nella trama di fibre collagene e

all'interno dei tubuli esposti, con la formazione, dopo polimerizzazione, di quello che è stato definito *strato ibrido*^{26,27} (Fig.10).

Allo stato attuale i sistemi adesivi interagiscono con il substrato smalto-dentina attraverso due processi distinti, cioè o nella rimozione dello smear layer attraverso la tecnica che viene definita “*etch and rinse*” (mordenzatura e risciacquo), oppure mantenere lo smear layer come substrato nella formazione dello strato resina-dentina, tecnica chiamata “*self-etch*” o “*etch and dry*”.

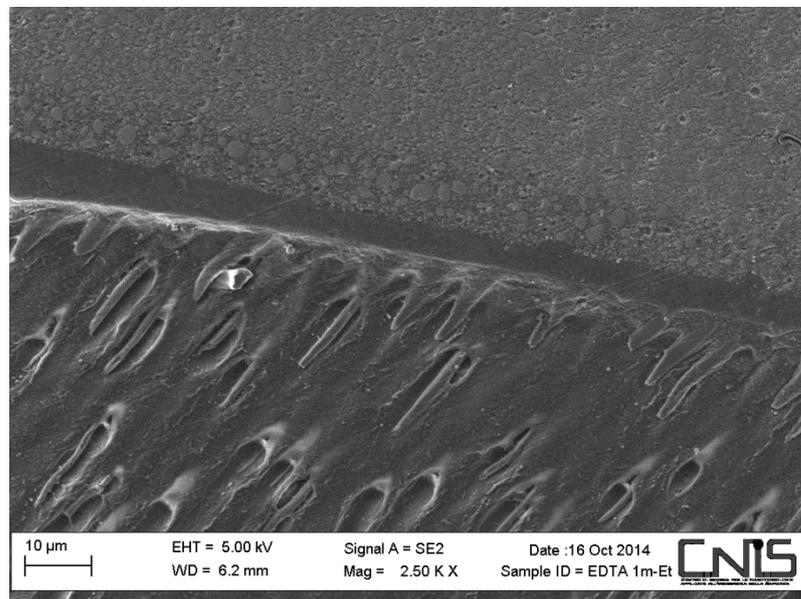


Figura 10. Micrografia a scansione elettronica di un'interfaccia resina-dentina (strato ibrido)

2.4 Sviluppo dei sistemi adesivi

I primi adesivi vennero utilizzati negli anni Cinquanta da Buonocore e altri e implicavano l'impiego dell'acido glicerofosforico-dimetacrilato.

Il legame era la risultante dell'interazione della molecola bifunzionale resinosa con gli ioni calcio dell'idrossiapatite, legame che in acqua subiva una rilevante riduzione. Qualche anno più tardi nel 1964, Bowen utilizzò

il co-monomero tensioattivo NPG-GMA (N-fenilglicina e glicidil metacrilato) capace di chelarsi al calcio della superficie dentaria generando un legame idroresistente tra resina e calcio, benché la resistenza di legame di questo materiale fosse di appena 1-3 MPa.

Solo negli anni '70 furono introdotti i primi adesivi di seconda generazione, che erano costituiti da una combinazione di fosfato-estere con resine non riempite come Bis-GMA (bis-glicidilmetilacrilato) oppure HEMA (Idrossietilmetacrilato). Il legame in questi sistemi adesivi era basato sull'interazione polare tra i gruppi fosfati a carica negativa della resina e il calcio a carica positiva presente nello smear layer. Tale legame però non era resistente all'idrolisi derivante dall'esposizione salivare o dall'umidità stessa della dentina, con conseguente perdita del legame resina-substrato e successiva micro infiltrazioni.

È da tenere in considerazione che fino a quegli anni non era ancora stato introdotto il concetto di condizionamento acido della dentina, per cui il legame avveniva con il fango dentinale. Conseguentemente la forza di legame degli adesivi dentali di seconda generazione era compresa tra 1 e 5 MPa, risultando ben al di sotto del valore soglia di 10 MPa, che garantisce una soddisfacente ritenzione in vivo.

Solo con gli adesivi di terza generazione era eseguito il trattamento acido della dentina che determinava una rimozione parziale e/o modifica dello smear layer lasciando però lo smear plug all'imboccatura dei tubuli. Per portare a termine il condizionamento dentinale furono usati EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) al 17% o acido maleico al 2,5%, che veniva risciacquato completamente prima dell'applicazione di un primer contenente monomeri resinosi idrofilici come il 4-META (anidride

dell'acido 4-metacrilossietil trimellitico) e BPDMA (Bifenil Dimetacrilato). I gruppi idrofilici del primer consentivano di infiltrare lo smear layer, modificandolo e promuovendo l'adesione alla dentina.

La forza di legame di questi adesivi era superiore ai precedenti ed era di 3-8 MPa.

Il concetto di “*total etching*” della cavità, in altre parole la simultanea mordenzatura di smalto e dentina, viene presentata nel 1979 da Fusayama.

Questa introduzione destò pareri discordanti, poiché si riteneva che la mordenzatura della dentina potesse avere delle reazioni pulpari avverse.

Negli anni '90 si afferma la quarta generazione di adesivi che risulta caratterizzata dalla tecnica total-etching, ovvero l'utilizzo di acido ortofosforico al 35-37% per 15-30 secondi.

Questa metodica richiedeva 3 step separati e distinti: mordenzatura, applicazione di un *primer* e successivamente *bonding*.

Il primo step era dato dall'applicazione dell'acido che comportava la rimozione parziale o totale dello smear layer e la demineralizzazione della superficie dentinale per uno spessore di 3-5 micron, la rimozione della dentina intertubulare e peritubulare, e quindi contemporaneamente l'apertura dei tubuli ed esposizione delle fibre collagene.

Il secondo step, dato dall'utilizzo del *primer*, prevedeva una soluzione costituita da monomeri idrofili reattivi in etanolo, acetone o acqua, infila le fibre collagene esposte, prevenendone il collasso, e i tubuli dentinali.

Il *primer*, aumentando la bagnabilità dell'adesivo sul substrato, permette la diffusione di un agente legante (resina fluida o *bonding*) contenente

monomeri idrofobi come il Bis-GMA, e quindi determina la formazione dello strato ibrido. Grazie a questi processi la forza di legame in questi casi è notevolmente maggiore rispetto alle generazioni precedenti, arrivando a 13-30 MPa.

In seguito la necessità di semplificare i procedimenti di adesione, ha spinto molti Autori alla ricerca di nuove tecniche.

La quinta generazione di adesivi dentinali, infatti, richiede soltanto 2 steps: condizionamento con acido della superficie che viene rimosso tramite risciacquo e successiva applicazione di un'unica soluzione contenente primer e bonding. Questo sistema adesivo è stato definito *self-priming/adhesive* o più impropriamente "one-bottle". La forza di legame di questa generazione è di 3-25 Mpa^{20,28}.

Contrariamente alla tecnica etch and rinse, gli adesivi self-etch non richiedono la fase di mordenzatura distinta, in quanto contengono monomeri acidi che simultaneamente condizionano e infiltrano il substrato dentinale. Pertanto tali sistemi non richiedono la fase di risciacquo dopo la loro applicazione per non rimuovere il primer. Questo meccanismo è la chiave di svolta degli adesivi di sesta e settima generazione. La forza di legame negli adesivi self-etch è di 15-25 MPa.

La sesta generazione prevede due fasi: innanzitutto l'applicazione di un self-etching primer, caratterizzato dall'associazione di etching e primer e di seguito separatamente l'uso del bonding. Le caratteristiche morfologiche dello strato ibrido in questi adesivi dipendono dalla loro capacità di demineralizzare il substrato dentinale. Pertanto, in base alla loro acidità, vengono distinti in forti ($\text{pH} \leq 1$), intermedi ($\text{pH} \approx 1,5$) e leggeri ($\text{pH} \geq 2$). Grazie alla presenza di monomeri funzionali come 10-

MDP, 4-META e fenil-P, i quali contengono gruppi carbossilici e fosforici che sono capaci di creare un legame ionico con il calcio dell'idrossiapatite, in questi adesivi automordenzanti si ha un legame non solo micromeccanico, ma anche chimico.

Gli adesivi di settima generazione, definiti *All-in-one*, sono costituiti da un unico step, ovvero un monocomponente caratterizzato da una soluzione contenente etch, primer e bonding. Rispetto agli automordenzanti a due passaggi, questi adesivi sono stati resi più acidi e idrofili. La maggiore idrofilia però tende a richiamare più acqua dal substrato, comportandosi così come membrane semipermeabili anche dopo polimerizzazione. Tale permeabilità dello strato adesivo oltre a causare una diminuzione della resistenza di legame, sembra anche contribuire all'idrolisi dei polimeri resinosi con conseguente perdita del legame dente resina nel tempo.

Conseguentemente gli attuali adesivi all-in-one non sono considerati in grado di competere con i tradizionali multi-step sia in termini di forza di legame sia di durata^{24,29}.

2.5 Nanotecnologie applicate agli adesivi dentali

Per nanotecnologia o ingegneria molecolare si intende la produzione di materiali e strutture funzionali nel campo nanometrico. Al fine di poter manipolare la struttura dei materiali in modo da fornire miglioramenti notevoli nelle proprietà elettriche, chimiche, meccaniche e ottiche gli studi si sono focalizzati sui nanomateriali. Nella tecnologia delle resine composite le dimensioni delle particelle di riempitivo, la distribuzione e la quantità in essi incorporata, influenzano molto le proprietà del

materiale stesso e quindi del successo clinico. L'utilizzo di particelle di dimensioni sensibilmente inferiori, che permette così di elevarne la concentrazione, determina un miglioramento delle proprietà, garantendo l'ottimizzazione dell'adesione, della resistenza, dell'affidabilità e della durata del restauro. Contrariamente alle resine composite che contengono sempre particelle di filler, gli adesivi possono non averne.

Infatti i riempitivi possono essere aggiunti agli adesivi per diversi motivi. Per esempio essi possono essere utili quando si vogliono aumentare le capacità adesive, poiché gli adesivi hanno una bassa resistenza e un basso modulo elastico. Inoltre i filler possono modificare la viscosità, aumentando così lo spessore una volta applicato sulla superficie, e conseguentemente anche la resistenza alle sollecitazioni da contrazione del composito posto sopra. Attualmente la ricerca è concentrata sull'inclusione di componenti antimicrobici nella formulazione degli adesivi³⁰.

In letteratura è ampiamente documentato lo sviluppo di adesivi dentali con proprietà antimicrobiche, attraverso l'utilizzo di nanofiller organici come monomeri di MDPB³¹ (12- metacrilossidodecylpiridinio bromide) che grazie alla carica positiva del gruppo piridinico attraggono ed alterano le strutture cellulari batteriche causandone la lisi. Altri adesivi contengono QAMP (Quaternary Ammonium Methacrylate Polymer) o DMADDM (dimethylaminododecyl methacrylate) nuovi monomeri dell'ammonio quaternario^{32,33}. Sono stati anche utilizzati nanofiller metallici o miscele tra organici e metallici. Tuttavia questi adesivi hanno comunque presentato diverse limitazioni. I nanofiller organici presentano buone qualità antibatteriche ma andando incontro a shrinkage proprio

come la matrice, ne limitano la resistenza di legame. Per quanto riguarda i nanomateriali metallici, il loro effetto antimicrobico è basato essenzialmente sul rilascio di ioni. Tale effetto è attribuibile all'elevato rapporto superficie-volume, che permette di avere un maggior numero di atomi superficiali così da aumentare il rilascio degli ioni. Inoltre le ridotte dimensioni di queste particelle ne facilitano l'interazione e la loro penetrazione attraverso le membrane cellulari. Purtroppo l'effetto tossicologico di questi materiali è inversamente proporzionale alle loro dimensioni. È stato, infatti, dimostrato che nanoparticelle più piccole (20 nm), quindi più efficaci, sono tossiche su modello murino (cellule macrofagiche e fibroblasti), limitandone così il loro utilizzo³⁴.

Lo studio della tesi è stato mirato sullo sviluppo di un adesivo dentale antimicrobico sfruttando le proprietà di materiali a base grafene.

I materiali grafenici come Grafene Ossido (GO), Grafene Ossido ridotto (rGO) e nanoplacchette di Grafene (GNP) hanno mostrato forti capacità antimicrobiche, superando le relative limitazioni di shrinkage dimostrate da altri nanofiller.

2.5.1 Grafene: Tecniche di produzione

Con il termine grafene si intende il monostrato piano di atomi di carbonio che si dispongono a formare esagoni con angoli di 120°, costretto bidimensionalmente (2D) in una struttura reticolare a nido d'ape. Può essere avvolto in *fullereni*, con una forma simile ad una sfera cava, arrotondato in *nanotubi* oppure accatastato in una struttura tridimensionale (3D) che è la *grafite* (Fig.11). Ritenuto come parte

integrante dei materiali grafiteici, il grafene veniva studiato come materiale “accademico” poiché si riteneva termodinamicamente instabile data la sua tendenza a curvarsi formando le strutture sopracitate, fullereni e nanotubi³⁵. Nel 2004 gli studiosi Novosolov e Geim riuscirono ad isolare uno strato di grafene tramite tecnica *scotch-tape*, ovvero un’esfoliazione meccanica della grafite su wafer di silicio attraverso un pezzo di nastro adesivo³⁶, vincendo per tale scoperta il premio nobel della fisica nel 2010.

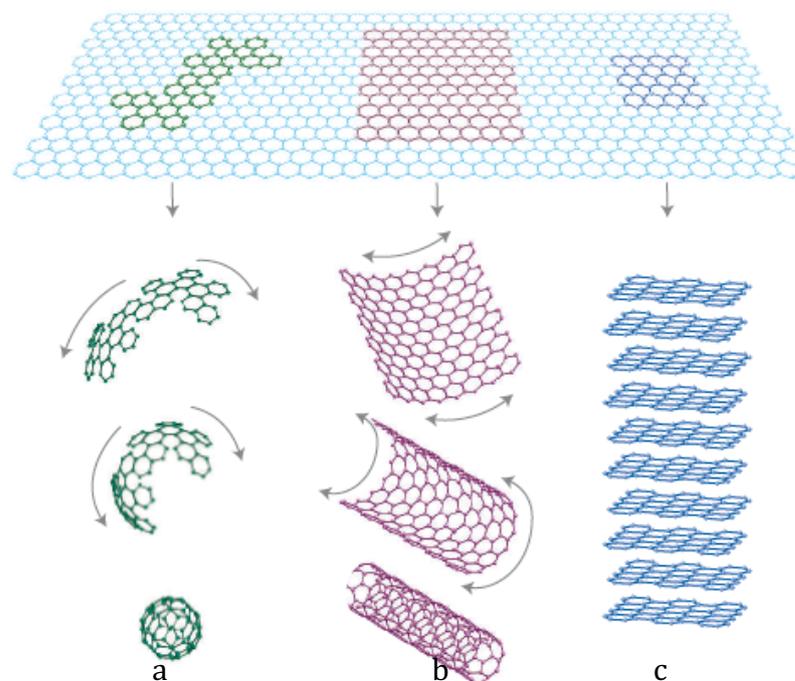


Figura 11. Struttura dei materiali grafiteici. Fullereni (a), Nanotubi (b), Grafite (c)

Chemical Vapour Deposition (CVD)

La Chemical Vapour Deposition è una tecnica bottom up basata sulla deposizione chimica da vapore di carbonio su film sottili di metalli di transizione, generalmente nichel (Ni) o rame (Cu), utilizzando una miscela di idrocarburi precursori come metano o etilene, in presenza di

H₂ e ad una temperatura tra i 700-1000 °C. Il carbonio diffonde nel substrato metallico e dopo raffreddamento del sistema si ha la segregazione del carbonio sulla superficie. Infine grazie all'etching chimico del substrato metallico si può staccare il grafene³⁷.

Tecniche top down

Le tecniche top down vengono inquadrare sotto la definizione di tecniche di esfoliazione in fase liquida. Sono tecniche di produzione più economiche e riproducibili in larga scala. Queste tecniche sfruttano la possibilità di ottenere il grafene da un precursore grafite sottoposto a trattamenti meccanici in grado di rompere i legami che legano i singoli fogli di grafene. In generale si utilizzano dispersioni di materiale precursore in soluzione acquosa o in solventi organici, come NMP (N-metil-2-pirrolidone) e DMF (N,N-dimetilformammide)³⁸, e la soluzione liquida così composta viene sottoposta a trattamenti meccanici di milling o di esfoliazione agli ultrasuoni. Le varie tecniche di esfoliazione in fase liquida vengono distinte principalmente in base al precursore utilizzato e di conseguenza dai residui di produzione di cui il materiale è composto. In questo studio abbiamo prodotto few layer e multilayer graphene tramite ultrasuoni. In questa tecnica si prevede un tipo di esfoliazione meccanica che sfrutta le capacità di tali onde acustiche di produrre forze di Bjerknes in grado di vincere le forze dei legami di van der Waals e separare i piani grafenici dei precursori; tra i quali i più comunemente utilizzati sono la grafite naturale, grafene ossido e grafite intercalata. Il grafene ossido (GO) è un intermediario idrofilo ottenuto mediante ossidazione della grafite naturale. In conseguenza delle forti interazioni

tra le molecole di acqua e i gruppi carbossilici ed epossidici che vengono a crearsi sulla superficie della grafite nel processo di produzione del GO, questo è capace di esfoliarsi completamente mediante sonicazione.

Nel reticolo grafítico i piani di grafene sono legati da forze di Van Der Waals, le quali permettono interazioni con una grande varietà di specie. L'inserzione di elementi differenti dal carbonio, tra cui i più utilizzati sono acidi ad alta concentrazione come acido solforico e nitrico, genera un prodotto definito GIC (graphite intercalation compound) (Fig.12), la cui espansione con uno shock termico ad alte temperature determina l'*expanded graphite* (EG) (Fig.12), estremamente poroso e con una struttura a strati ancora presente³⁹. Durante la preparazione dei GIC, l'ossidazione chimica del grafene porta alla formazione di gruppi funzionali i quali, insieme alla natura porosa del composto, aumentano la compatibilità con composti e polimeri rendendo possibile la produzione di compositi a matrice polimerica⁴⁰. L'EG ottenuto è costituito all'interno da molti strati di grafene tenuti insieme da forze di van der Waals, strati che non sono in grado di interagire con la matrice. Per migliorarne le prestazioni quindi si procede all'esfoliazione dell'EG in sottilissimi GNP (Graphite NanoPlatelets), il cui spessore è inferiore ai 100 nm.

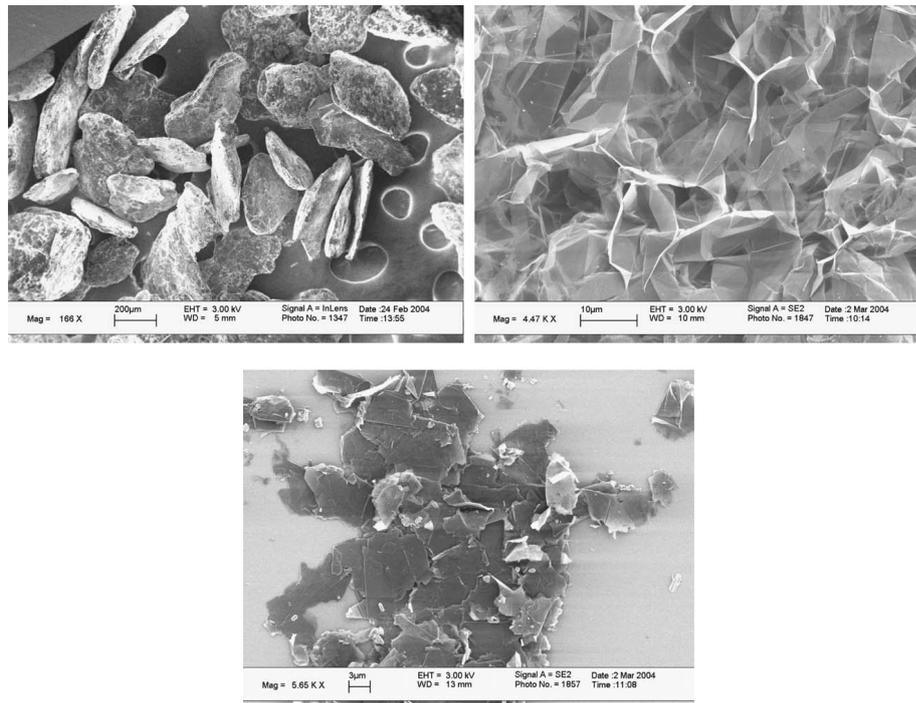


Figura 12. Immagine al SEM di GIC (a), EG (b) ed esfoliata mediante sonicazione (c)

2.5.2 Biocompatibilità e proprietà antimicrobiche del grafene

Grazie alle loro potenziali applicazioni nel campo dell'elettronica, energia, materiali e negli ultimi anni anche nel campo biomedicale il grafene e i suoi derivati hanno suscitato un elevato interesse da molti fronti. Tuttavia rimangono ancora poche le informazioni disponibili sulla loro tossicità e biocompatibilità. Il grafene ossido (GO) è un potenziale candidato per applicazioni biologiche, come ad esempio nella somministrazione di farmaci a scopo terapeutico (Liu et al., 2008)^{40,41}. Tuttavia i GO sono risultati potenzialmente tossici per l'uomo. Alcuni studi condotti su cellule alveolari basali epiteliali umane hanno dimostrato che GO non ha alcuna citotossicità evidente ma può causare uno stress ossidativo dose-dipendente nelle cellule ed indurre perdita di

vitalità ad alte concentrazioni⁴². Wang et Al. hanno dimostrato che GO potrebbe produrre citotossicità dose e tempo-dipendente. Può entrare nel citoplasma e nel nucleo diminuendo l'adesione cellulare e indurre apoptosi. È stato osservato inoltre, che può causare infiammazioni e granulomi polmonari, fortemente dipendenti alla dose iniettata. In più la clearance renale sembrerebbe molto difficoltosa⁴³. Carnaedopsis Elegans da Zanni et Al.⁴⁴ hanno effettuato studi in vitro di tossicologia di grafene prodotto a partire da GIC, dimostrando invece assenza di stress ossidativo ed ottima biocompatibilità di tale materiale su sistemi biologici semplici. Le analisi Raman del grafene prodotto con tale tecnica hanno dimostrato l'assenza di gruppi funzionali estranei al grafene puro, confermando così la tesi presente nel lavoro di Conroy et al.⁴⁵, in cui è stata studiata la tossicità su cellule umane di grafene puro ottenuto da sonicazione di grafite e da tecniche CVD. In questo studio è stato dimostrato che la citotossicità umana o su sistemi complessi è dovuta alla presenza di residui di produzione quali gruppi carbossilici, epossidici, idrossile, quindi è intrinseca al grafene prodotto a partire da GO.

I meccanismi alla base della tossicità dei nanomateriali a base grafene sembrano essere principalmente chimico e meccanico. Gli effetti di natura chimica sono associati alla chimica superficiale, la quale è direttamente correlata al processo produttivo del nanomateriale e al precursore utilizzato nella sintesi. Nel 2010 Huang e Al. per la prima volta hanno esplorato le proprietà antibatteriche del GO, studiandone le interazioni con batteri *Escherichia Coli*. e hanno dimostrato che ad una concentrazione di 85 µg/mL sopprimeva la crescita di E. coli dopo 2 ore di incubazione a 37 °C, pur presentando bassa citotossicità su cellule

mammifere⁴⁶. La generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), come già detto, causa stress ossidativo e morte cellulare. Gurunathan et al.⁴⁷ hanno infatti dimostrato come la produzione di ROS da GO e rGO ha effetti di tossicologia rilevanti su ceppi batterici di *Pseudomonas Aeruginosa*. Tale effetto, oltre ad essere dimensioni, tempo e dose-dipendente, è anche strettamente dipendente al precursore usato. Il grafene prodotto a partire da grafite naturale sembra non produrre ROS, così come nanoplacchette di grafene prodotte a partire da grafite intercalata non sembrano avere effetti tossicologici legati a produzione di ROS^{44,48}.

Benché dal punto di vista biologico, il grafene sembra essere chimicamente inerte, esso ha delle proprietà antimicrobiche attribuibili ad un effetto meccanico, che sembrano infatti legate all'aspetto morfologico del grafene ottenuto per esfoliazione in fase liquida. Infatti i suoi bordi, lunghi e sottili, risultano essere "taglienti" ed entrando in contatto con la membrana cellulare, possono minarne l'integrità.

Capitolo 3. Materiali e metodi

Il grafene ossido (GO) risulta il materiale a base grafene più comune. Questo materiale è stato utilizzato sia come filler che in associazione ad altri nanomateriali antimicrobici dando ottimi risultati^{49,50}.

Diversi studi hanno dimostrato che il grafene interagisce fortemente con la matrice resinosa rinforzando il materiale, in particolare si tratta di nanocompositi su base grafene, prodotti ad alte concentrazioni (fino a 6mg/ml) mediante semplice sonificazione di grafite, contenenti questi nanofiller in una matrice polimerica di Bis-GMA/TEGDA⁵¹. Al tempo stesso, un'accurata revisione della letteratura, non ha dato risultati sull'uso di GNP (nanoplacchette di grafite) come filler in biomateriali. Stessi risultati per quanto riguarda l'uso di questi materiali a scopo antimicrobico mentre vi sono diversi brevetti relativi a materiali e nanomateriali ad uso dentale con proprietà antimicrobiche⁵².

Il presente studio, partendo da un adesivo commerciale di uso comune in odontoiatria e dalle proprietà ampiamente conosciute, ha sviluppato e prodotto un adesivo smalto dentinale con proprietà antibatteriche grazie all'introduzione di GNP come filler. Sono stati eseguiti test concentrati sulla funzione antimicrobica e adesiva per avere dati preliminari sulla reale concezione del materiale e il conseguente successo clinico.

3.1 Produzione dell'adesivo

Il materiale di partenza per la realizzazione dell'adesivo è stata la grafite intercalata artificiale (Grafguard 160 50N), espansa in forno a muffola.

E' stato ottenuto EG e poi pesato su bilancia analitica per avere 20 mg di prodotto. Questo è stato posto in una soluzione a base di etanolo, solvente che permetterà al prodotto finito di risultare compatibile con l'adesivo commerciale con il quale verrà poi miscelato. La soluzione è stata sonicata per mezzo di un sonotrodo (Sonics&Materials VC505 con punta stepped horn di $\Phi = 13\text{mm}$).

In finale abbiamo ottenuto una sospensione di GNP che è stata inserita nell'adesivo commerciale attraverso la tecnica del solution processing. Il prodotto sperimentale è stato quindi conservato al buio ad una temperatura di 4 °C ed utilizzato al massimo ad una settimana di distanza dalla produzione.

Tutti i parametri, come anche le quantità di materiale, non sono stati menzionati con precisione in quanto soggetti a brevetto.

3.2 Test antimicrobici

Per tali test sono stati utilizzati ceppi batterici di *Streptococcus mutans* ATCC 25175. È stata effettuata la crescita in BHI (Brain Heart Infusion), terreno di coltura altamente nutritivo, a 37 °C in camera anaerobica, in un'atmosfera costituita da 80% N₂, 10% H₂ e 10% CO₂.

Abbiamo eseguito due tipologie di test: uno al tempo 0 ed uno con invecchiamento del campione. Per quest'ultimo è stato utilizzato una 12-well con 6 pozzetti contenente adesivo commerciale e gli ulteriori 6 con adesivo sperimentale (Fig 13).

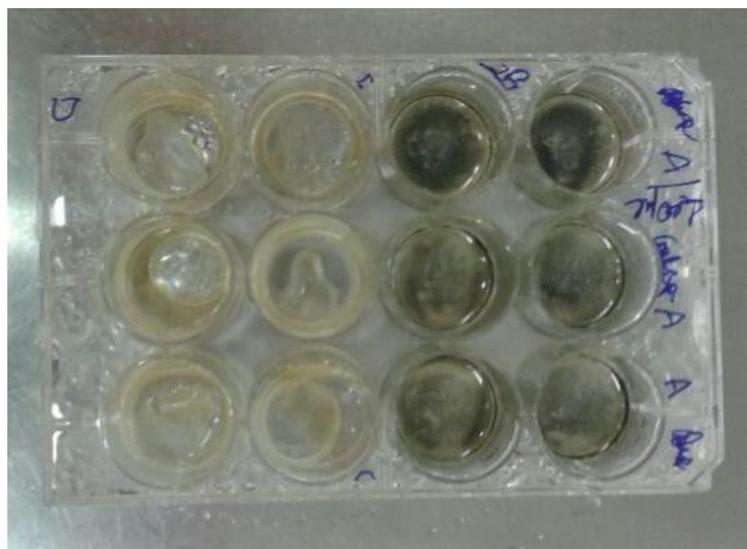


Figura 13. Preparazione per test di vitalità dopo invecchiamento. 6 pozzetti con adesivo commerciale (chiaro a sinistra), 6 pozzetti con adesivo sperimentale (scuro a destra)

I singoli pozzetti sono stati riempiti con una soluzione 1:5 di PBS ed acqua bidistillata, rinnovata ogni 48 ore per 1 e 4 settimane, conservata poi al buio a 37 °C.

Il processo d'invecchiamento è terminato con la sterilizzazione dei campioni sotto cappa di sicurezza biologica ed il trattamento per la conta batterica.

Per valutare l'effetto antimicrobico dell'adesivo sono stati depositati 100 µl di adesivo sul fondo di una piastra di coltura a 24-well, sia al tempo 0 che dopo invecchiamento.

Dopo polimerizzazione i campioni sono stati sterilizzati sotto UV in cappa di sicurezza per eliminare eventuali contaminazioni biologiche del campione e per avere una sovra cura dell'adesivo così da eliminare il polimero liquido in sospensione con i batteri. Si è proceduto al trattamento dei campioni con ceppo batterico incubando 10⁸ cellule/ml per 90 minuti, 24 ore e 48 ore a 37 °C, in condizioni anaerobiche e in

presenza di umidità. Per i controlli della reale crescita delle colonie batteriche, quindi della loro vitalità, sono stati utilizzati sia pozzetti vuoti e con adesivo commerciale sia pozzetti con adesivo sperimentale. Aliquote di campione sono state così prelevate, diluite e disperse su piastre di Petri. Dopo incubazione a 37 °C in condizioni anaerobiche, è stata verificata la capacità dei batteri di formare colonie attraverso il metodo della conta del numero di Unità di Colonie Formatesi (CFU).

Per avere risultati con una maggiore sensibilità abbiamo portato a termine i test antimicrobici anche su denti che sono stati sezionati in modo da essere uguali tra loro. Seguendo le procedure odontoiatriche standard, è stata fatta la mordenzatura della superficie, applicato uno strato di adesivo, sia commerciale sia sperimentale, e infine polimerizzato. I campioni così ottenuti sono stati sterilizzati sotto UV, come per i precedenti test, e trattati con il metodo di colorazione Crystal Violet (Gentian violet) per il dosaggio colorimetrico delle cellule batteriche.

3.3 Test di adesione

Il test di adesione è stato eseguito utilizzando denti permanenti e denti decidui umani estratti, per problematiche parodontali o necessità ortodontiche, nell'U.O.C. di Odontoiatria Pediatrica del Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo Facciali "Sapienza" Università di Roma, conservati in acqua distillata a 4 °C per un massimo di 2 settimane ed utilizzati previo consenso informato dei pazienti.

Per i test di adesione abbiamo eseguito prove di resistenza alla micro trazione dell'adesivo.

I campioni sono stati preparati seguendo lo standard di adesione dentale ISO TR 11450 (1994), il quale richiede che i provini per la micro trazione devono essere a osso di cane o a forma di parallelepipedo (beam), con una sezione di 1 mm².

Ogni dente è stato incollato su di una piastra in policarbonato (Fig.14a), planarizzato mediante una sega a controllo numerico con punta diamantata SECOTRON 200 (Fig.14b) e successivamente lappato. Il substrato così ottenuto è stato condizionato con acido ortofosforico al 37% per 15-30 secondi, rispettivamente della dentina e smalto (Fig.14c). È stato poi applicato uno strato di adesivo commerciale o sperimentale (Fig.14d), fatto evaporare il solvente in esso contenuto tramite getto d'aria ed infine polimerizzato tramite lampada a led (Fig.15a). Sulla superficie del campione è stato posizionato uno strato di resina composita per uno spessore complessivo di 4 mm e polimerizzato (Fig.15b). Il dente così preparato è stato sezionato con una sega a controllo numerico per ottenere i beam da 1 mm² e circa 8 mm di lunghezza (Fig.15c).

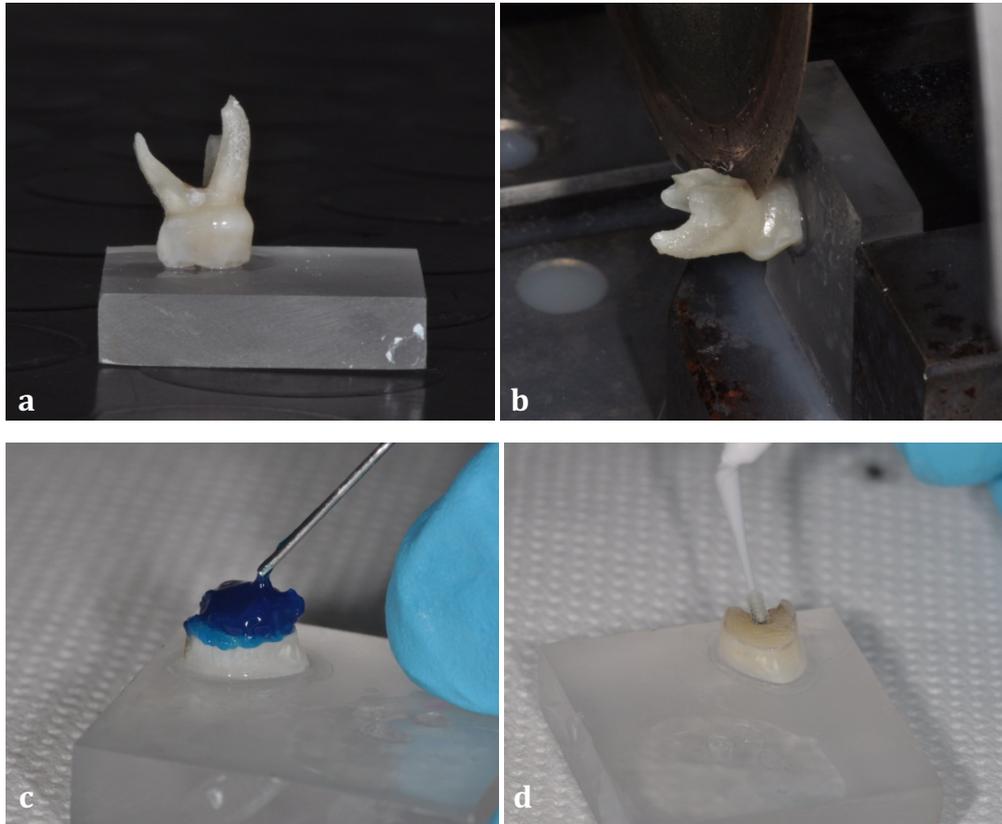


Figura 14. Preparazione campioni per test meccanici: (a) Dente incollato sul supporto per consentire il taglio (b); mordenzatura (c); applicazione adesivo (d)

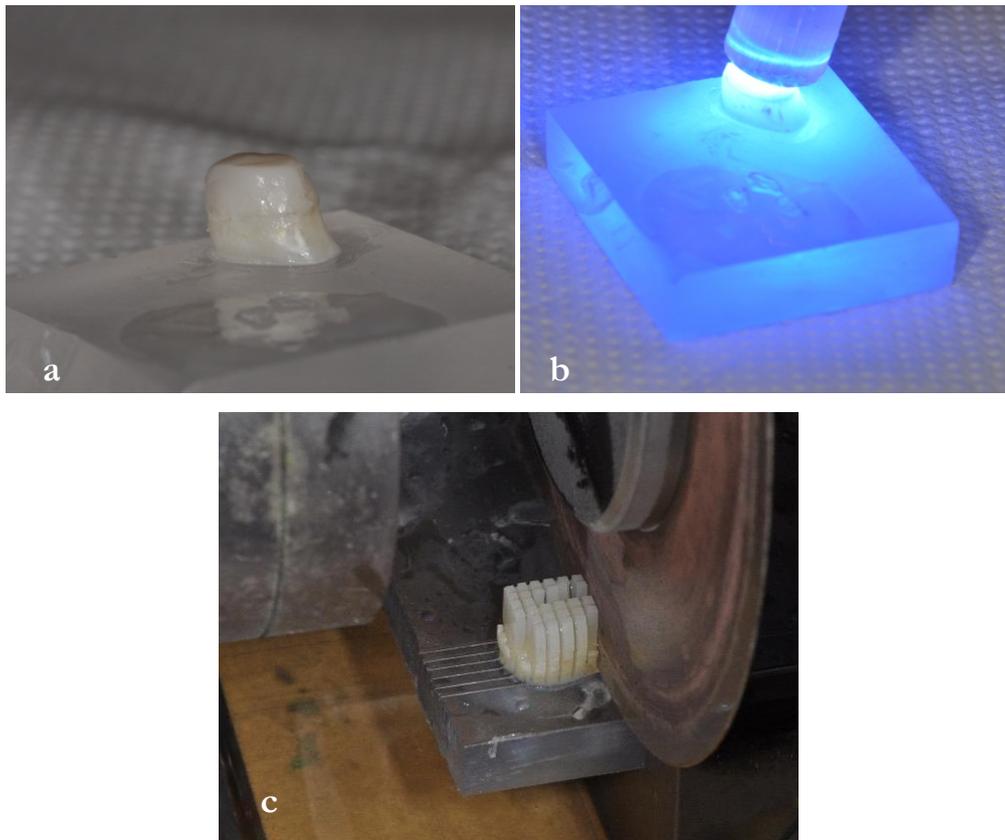


Figura 15. polimerizzazione (a); campione finale dopo applicazione del composito (b), pronto per la sezione e produzione dei beam (c).

I beam sono stati conservati in acqua distillata per 24 ore a 37 °C per simulare l'ambiente orale e successivamente sottoposti a trazione. Per questo test è stata utilizzata una cella di carico di 1 kN su una macchina universale fornita di morse per metalli (Fig.16). I beam sono stati incollati su lamine di acciaio INOX con l'utilizzo di una colla a base di cianoacrilato.

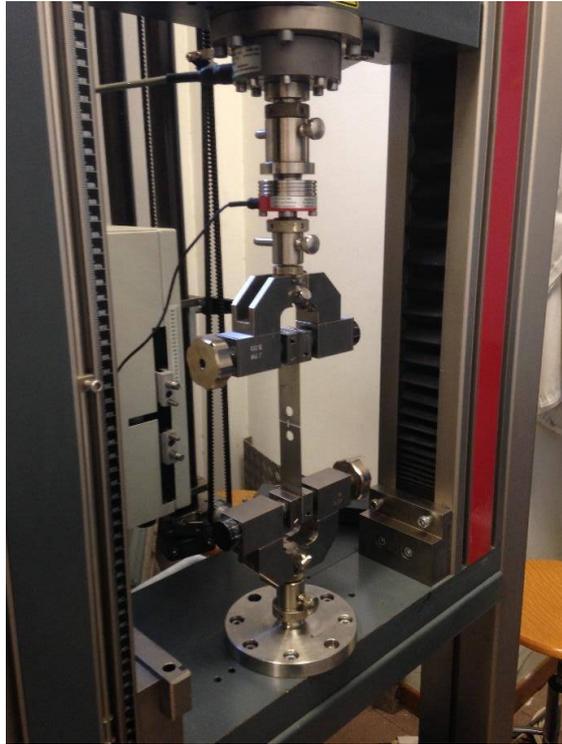


Figura 16. Macchina universale per i test meccanici

3.4 Preparativa SEM

L'ultima fase prevedeva di eseguire micrografie al microscopio elettronico a scansione.

Le sezioni sono state fissate mediante immersione in una soluzione al 2% di gluteraldeide in acqua bidistillata per 1 ora a temperatura ambiente, sottoposte a tre lavaggi in acqua bidistillata e poi immersi per 10 minuti in successione attraverso tre soluzioni di etanolo al 50%, 70% e 96% al fine di disidratarli. Infine sono stati sottoposti a sputtering di 15 nm di cromo per renderli conduttivi, aumentarne il contrasto topografico e stabilizzare le strutture contro il riscaldamento prodotto dal fascio elettronico⁵³.

Capitolo 4. Discussione dei risultati ottenuti

4.1 Test antimicrobici

4.1.1 Analisi delle dimensioni medie dei GNP prodotti

Le dimensioni laterali dei GNP sono direttamente correlata con il loro potere antimicrobico; quindi la tecnica utilizzata per la produzione, il contatto tra materiale e microrganismi ed in particolar modo i parametri di espansione ed esfoliazione utilizzati per ottenere i GNP influiscono sulla vitalità.

Sono stati eseguiti test che prevedevano esfoliazione in acqua e due modalità differenti di espansione, i dati ottenuti dimostrarono una diretta correlazione tra tempo, temperatura di espansione e capacità antimicrobica di ceppi batterici di *S. Mutans*; ovvero sospensioni contenenti GNP di dimensioni più piccole ed esfoliati hanno un maggiore effetto antimicrobico.

Nel nostro studio sono stati utilizzati GNP prodotti da GIC espansi a 1050 °C per 30 secondi (GNP_{1050°}), altri ottenuti mediante espansione a 1150 °C per 5 secondi (GNP_{1150°}), entrambi esfoliati in acqua. L'utilizzo del SEM è stato essenziale per poter eseguire un'analisi statistica delle dimensioni laterali dei GNP così prodotti. I GNP_{1150°} hanno dimostrato una dimensione laterale media di 5-6 µm, come espresso anche dalla distribuzione dimensionale nel grafico 1A. Analizzando i GNP ottenuti con diversi parametri di espansione è stato possibile ottenere una migliore distribuzione dimensionale, con dimensioni laterali medie pari a 2-3 µm.

L'analisi condotta sui GNP_{1050°} invece ha rivelato dimensioni laterali medie più ridotte (Graf.1B).

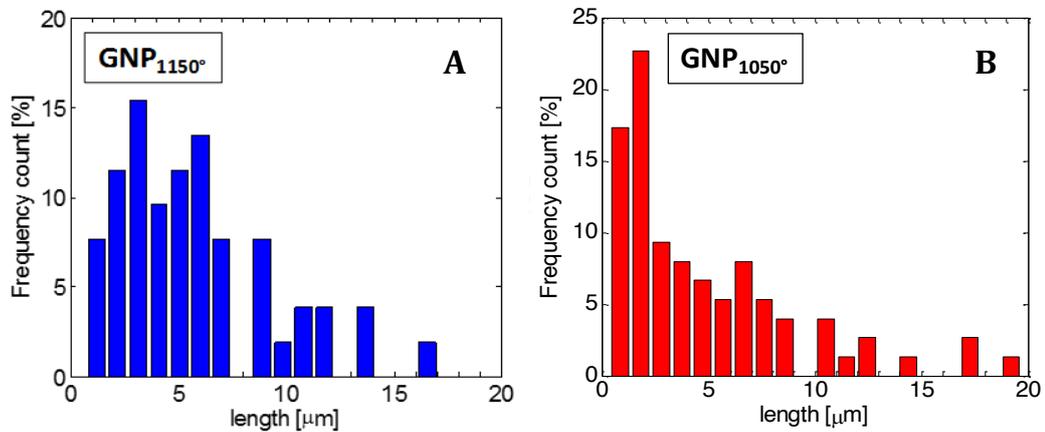


Grafico 1. Risultati test dimensionali: frequenza dei conteggi di GNP con dimensioni inferiori ai 20μm, alle due diverse temperature

I dati ottenuti dai test antimicrobici ci hanno indicato migliori proprietà antimicrobiche al diminuire delle dimensioni, così come riportato dal grafico (Graf.2).

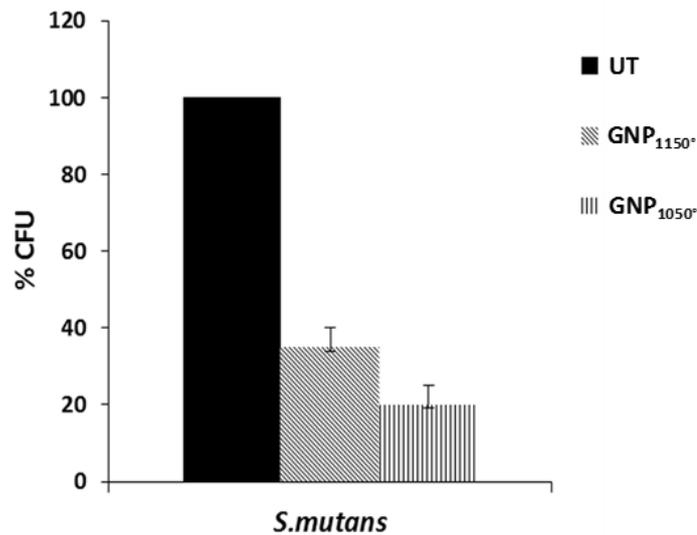


Grafico 2. Risultati test di vitalità dello *Streptococcus mutans* dopo trattamento con GNP.

Per il forte potere antibatterico del solvente, la CFU riguardante test sulla sospensione prodotta in soluzione contenente anche etanolo, non è stata possibile eseguirla, tuttavia sono state analizzate statisticamente le dimensioni laterali dei GNP ottenuti in tali soluzioni (Graf.3).

I risultati ci evidenziano una diminuzione della dimensione media dei GNP prodotti, il che ci fa ipotizzare buone probabilità di avere effetti antimicrobici su *S. mutans*.

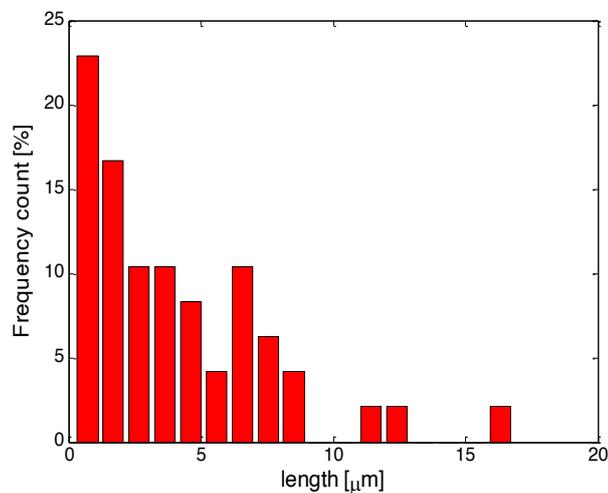


Grafico 3. Risultati test dimensionali di GNP prodotti in soluzioni a base di etanolo.

4.1.2 Test di vitalità batterica su adesivo

I test hanno evidenziato come l'adesione ai batteri delle sospensioni dei GNP è l'essenza del loro potere antimicrobico. L'ipotesi più accreditata sull'azione dei GNP indica che è l'adesione dei microrganismi sulle nanoplacchette, ovvero un'interazione di tipo meccanico, a determinare l'intrappolamento dei batteri, causandone la perdita di contatto con sostanze nutritive e fratture sulla membrana cellulare.

La differenza tra i test su sospensioni e quelli effettuati sull'adesivo sperimentale è che i primi avvengono in continua agitazione del campione, mentre i secondi sono test statici.

Abbiamo già parlato della capacità dei microrganismi di formare una comunità organizzata, con struttura tridimensionale e racchiusa da una matrice extracellulare, chiamata biofilm¹¹. Il ciclo vitale del biofilm dello *S. mutans* segue 5 fasi:

adesione, formazione di microcolonie, proliferazione, maturazione e distacco periodico delle cellule planctoniche¹² (Fig.17).

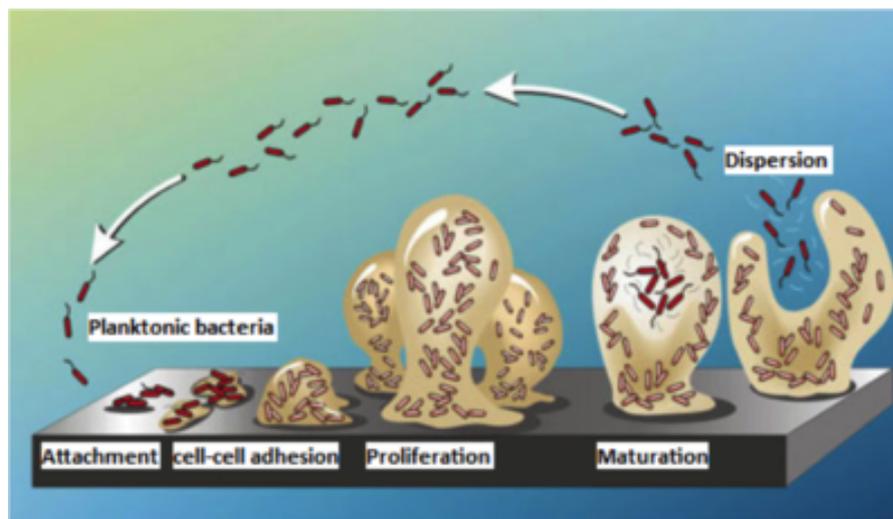


Figura 17. Ciclo vitale del biofilm

La prima e l'ultima fase del ciclo sono i punti nei quali gli agenti anti-biofilm possono agire⁵⁴. La fase di dispersione delle cellule batteriche è stata dimostrata, dalle immagini ottenute al SEM e dai test di vitalità, essere il punto nel quale i GNP agiscono, mentre la fase iniziale di adesione è preservata, il che rispecchia il comportamento tipico dei

materiali a base grafene, utilizzati appunto per la loro alta tendenza a far aderire i batteri.

Le immagini al SEM riguardanti campioni ottenuti con adesivo commerciale, hanno mostrato chiaramente la presenza di colonie batteriche sovrastanti la superficie dell'adesivo, testimoniando una struttura del biofilm ben preservata ed una elevata vitalità (Fig.18).

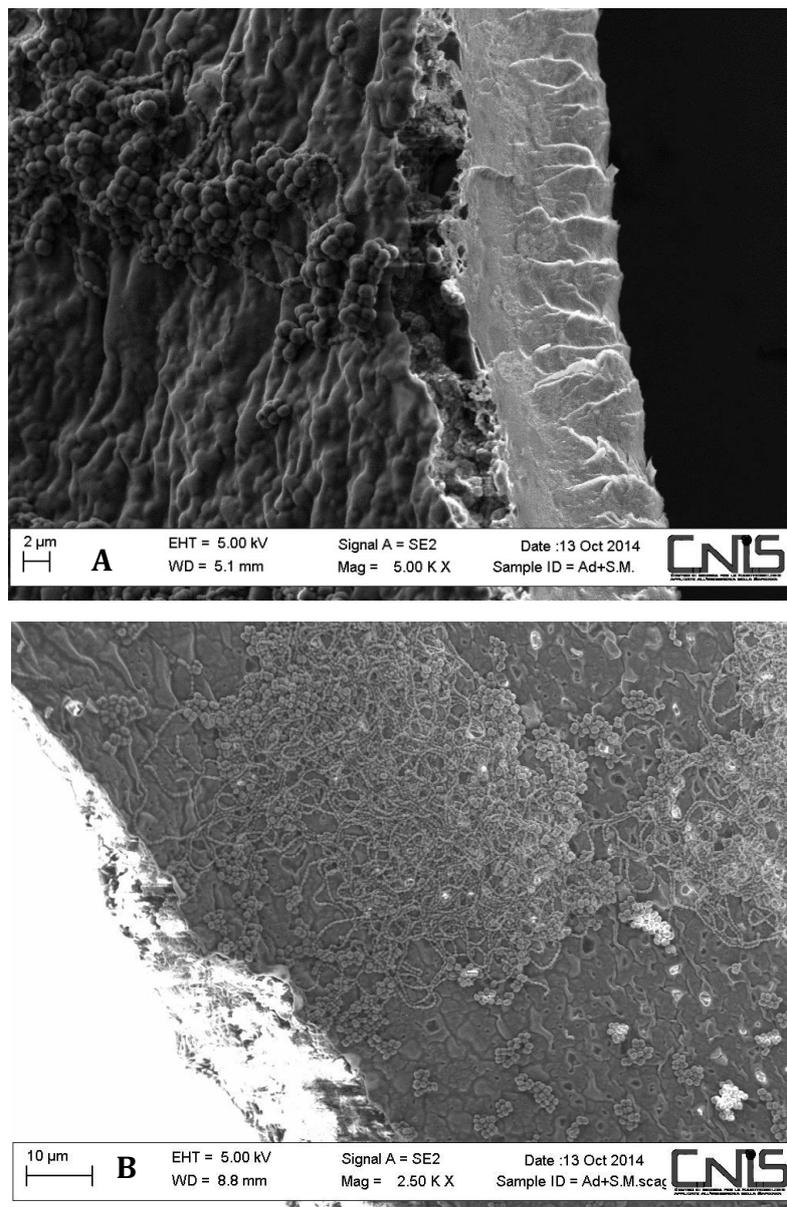


Figura 18. (A,B) Immagine SEM dell'adesivo commerciale dopo incubazione con *S. Mutans* per 24 ore.

L'intervento dei GNP altera la conformazione del biofilm batterico, determinandone un'organizzazione non più ben definita; ed è proprio questa la causa della loro tossicità. È molto evidente dalle immagini al SEM che l'architettura strutturale del biofilm sia alterata in seguito al contatto con i GNP ed oltretutto non sono visibili cellule batteriche intatte (Fig.19).

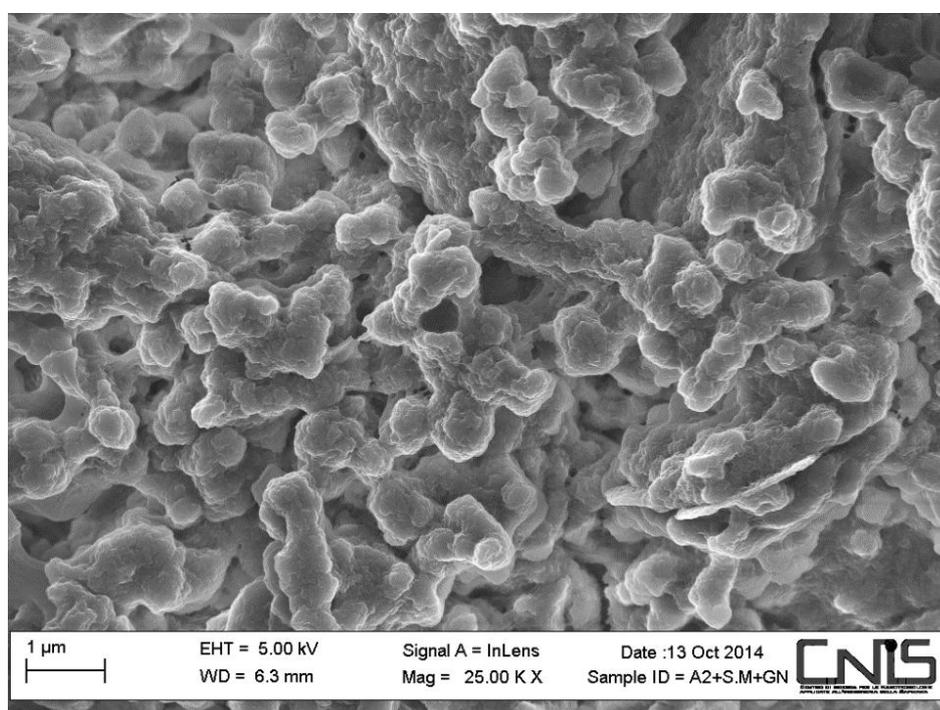


Figura 19. Immagine SEM dell'adesivo sperimentale dopo incubazione con *S. Mutans* per 24 ore; compromissione strutturale del biofilm

A un ingrandimento minore si è constatata la presenza di strutture microbiche mature, cioè in uno stadio avanzato del ciclo vitale del biofilm (Fig.20), a testimoniare che i GNP agiscono solo dopo un breve tempo di interazione tra adesivo e batteri. Inoltre in alcune zone vi è la presenza di fratture della compagine del biofilm. La matrice del biofilm è

una struttura viscoelastica che ha un ruolo protettivo per i batteri, difficile da fratturare.

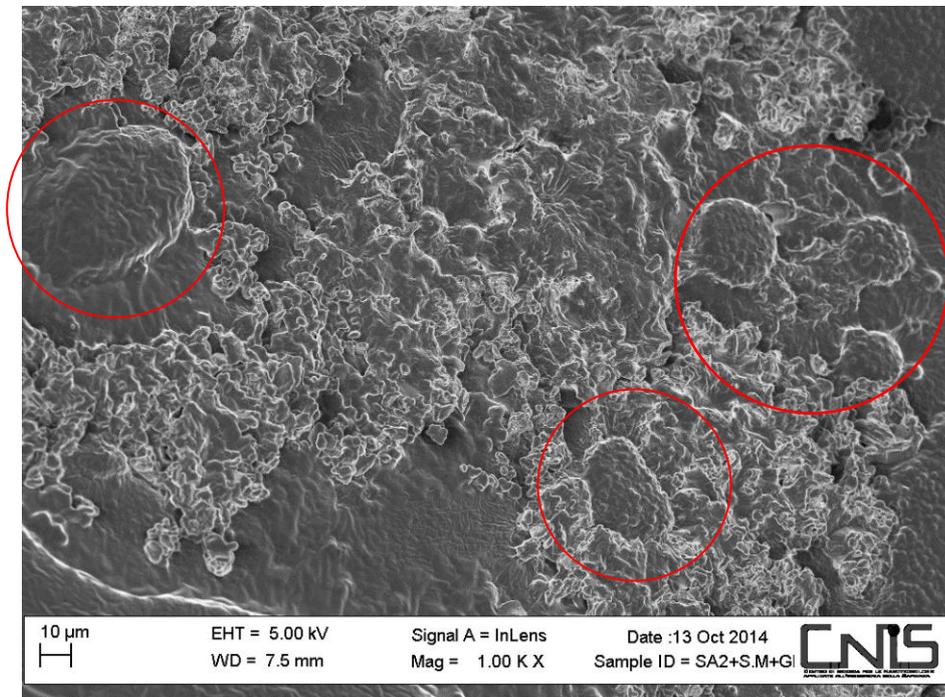


Figura 20. Immagine SEM dell'adesivo sperimentale dopo incubazione con *S. mutans* per 24 ore; presenza di strutture in fase avanzata di maturazione.

Tuttavia è stato possibile osservare tali fratture in corrispondenza dei GNP (Fig.21).

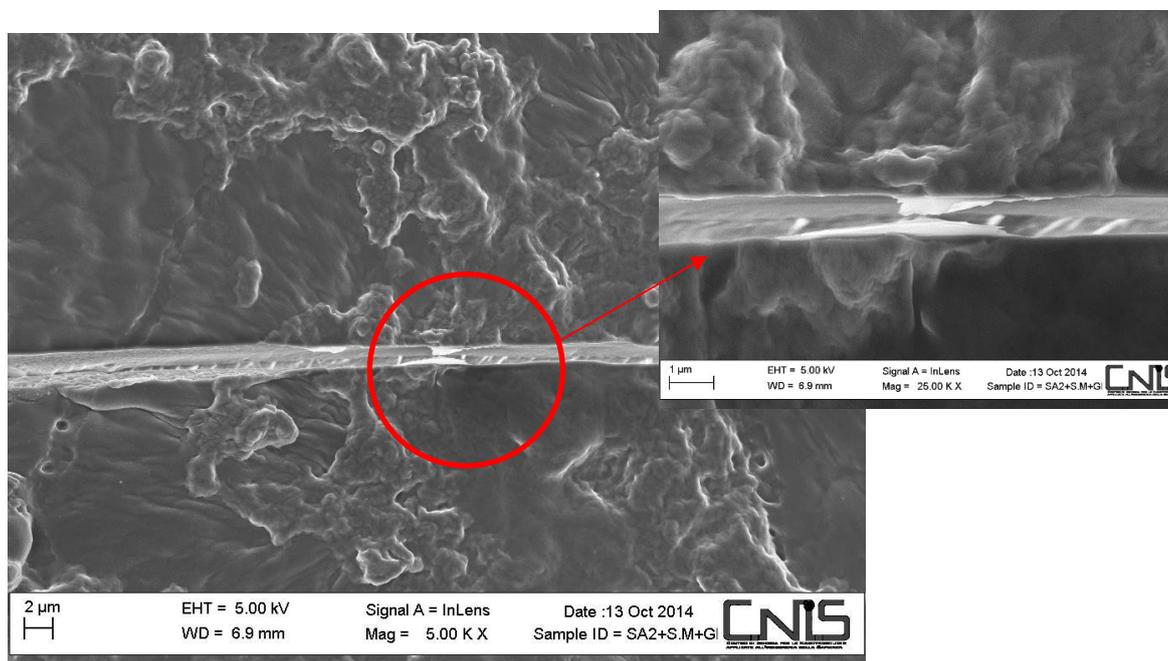


Figura 21. Immagine SEM dell'adesivo sperimentale. Presenza di fratture in corrispondenza di GNP.

I test di vitalità al tempo zero ci hanno permesso di constatare l'effetto antimicrobico dei GNP una volta inglobati nella matrice polimerica dell'adesivo. Tali test non sono effettuati sulle cellule componenti o inglobate nel biofilm, ma sono focalizzati sull'analisi di vitalità delle cellule batteriche rilasciate dal biofilm e non aderenti. I dati in nostro possesso hanno dimostrato l'assenza di vitalità delle cellule batteriche in sospensione sull'adesivo caricato con GNP, nonostante la presenza testimoniata dalle immagini SEM della stessa tipologia di campione di strutture di maturazione del biofilm, stando così ad indicare quindi il blocco del ciclo vitale del biofilm stesso.

I dati dei test di vitalità mostrano che a novanta (90) minuti si ha ancora una sopravvivenza del 35%. All'aumentare delle ore di contatto con

l'adesivo sperimentale abbiamo una mortalità del 100% (Graf.4), così come mostrato anche da indagini qualitative (Fig.22).

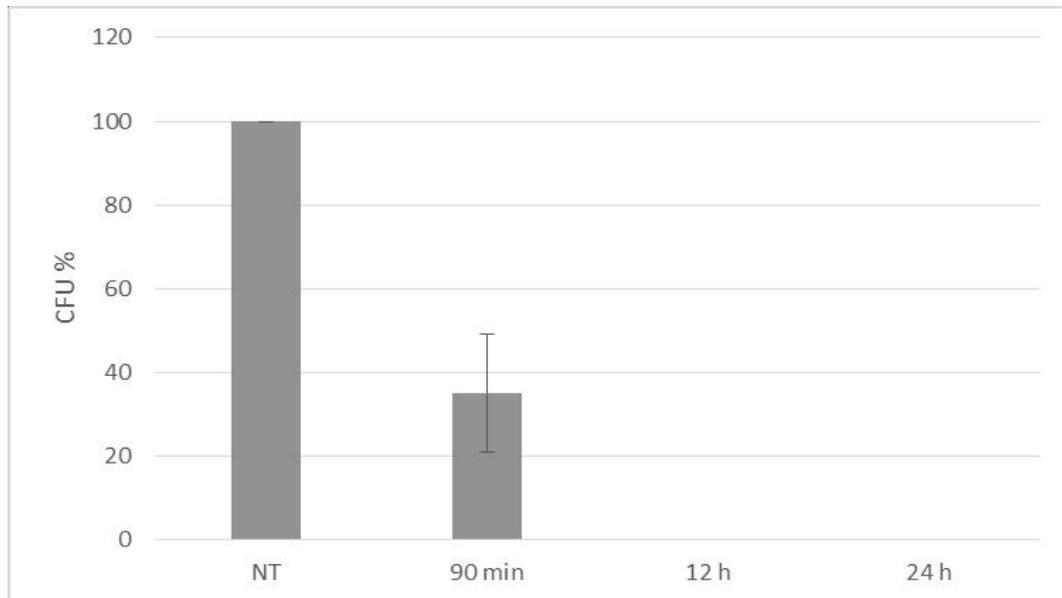


Grafico 4. Test di vitalità su adesivo sperimentale non invecchiato

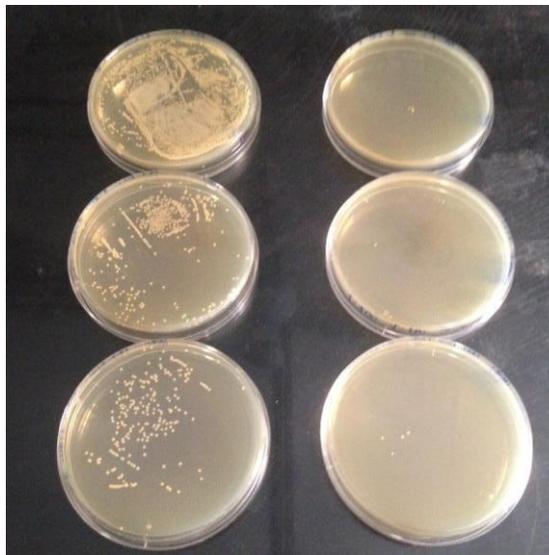


Figura 22. Confronto visivo dei risultati del test di vitalità su adesivo commerciale (a sinistra); su adesivo sperimentale (a destra) si nota l'assenza di colonie batteriche

Affinché fosse isolato l'effetto esclusivo dei GNP, gli esperimenti sono stati condotti in parallelo a test di controllo. Il controllo positivo si

ottiene su una piastra 12-well in cui in tre (3) pozzetti vengono coltivati batteri senza alcun materiale. Questi campioni ci hanno consentito di escludere che i risultati riportati siano influenzati da una cattiva crescita del ceppo batterico utilizzato. Il dato del controllo positivo, detto non trattato (NT), ha così permesso di definire il 100% di vitalità.

Un altro controllo positivo è l'adesivo commerciale che ci permette di valutare la differenza di comportamento dello stesso materiale quando caricato con GNP. I risultati ci indicano che abbiamo comunque crescita di biofilm sia nei pozzetti non trattati (NT) sia nei pozzetti con adesivo commerciale, per cui verranno entrambi definiti NT.

Inoltre, al fine di verificare l'assenza di contaminazioni esterne, contestualmente ad ogni esperimento sono stati eseguiti controlli negativi in pozzetti non trattati con batteri, nei quali si è osservata vitalità dello 0%.

Nei test di vitalità in seguito ad invecchiamento di una (1) settimana del campione, i dati a novanta (90) minuti dal contatto dei batteri con l'adesivo sperimentale sono rimasti invariati, anzi è diminuita la deviazione standard.

I dati invece a dodici (12) e ventiquattro (24) ore danno risultati di vitalità maggiori rispetto a quelli ottenuti in assenza d'invecchiamento (Graf.5). Questo potrebbe essere legato alle varie fasi di risciacquo eseguite nella fase d'invecchiamento del campione, le quali hanno portato ad una possibile diminuzione delle particelle di GNP in superficie.

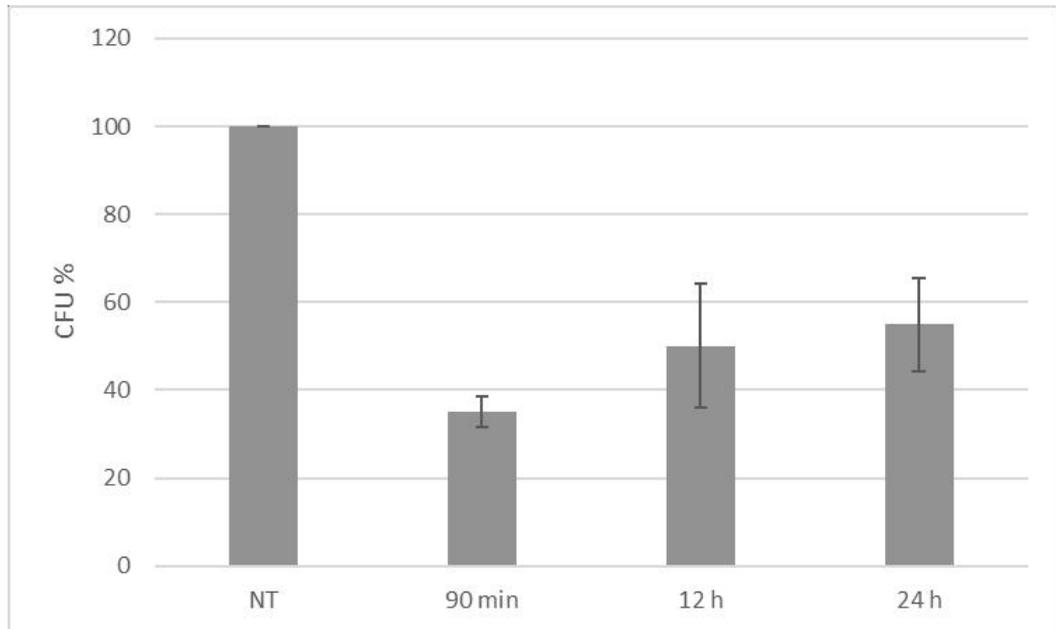


Grafico 5. Test di vitalità su adesivo sperimentale dopo invecchiamento di 1 settimana.

Successivi dati, anche se solo qualitativi, sono stati ottenuti su test effettuati su sezioni di dente trattati con colorazione Crystal Violet. La Fig.23 mostra una colorazione più intensa nella sezione non trattata, indice di una maggior presenza batterica, rispetto a quelle trattate con adesivo sperimentale.



Figura 23. Test di vitalità qualitativo su sezioni di dente con adesivo sperimentale, trattati con colorazione Crystal Violet

4.2 Test meccanici

4.2.1 Analisi della forza di legame dell'adesivo

Test meccanici e analisi strutturali al SEM dell'interfaccia dente-adesivo-composito, sono stati eseguiti al fine di valutare gli effetti dei GNP sulla qualità dell'adesivo sperimentale.

Tramite prove di micro-trazione (Fig.24), abbiamo valutato la forza di legame (σ_R) dell'adesivo.

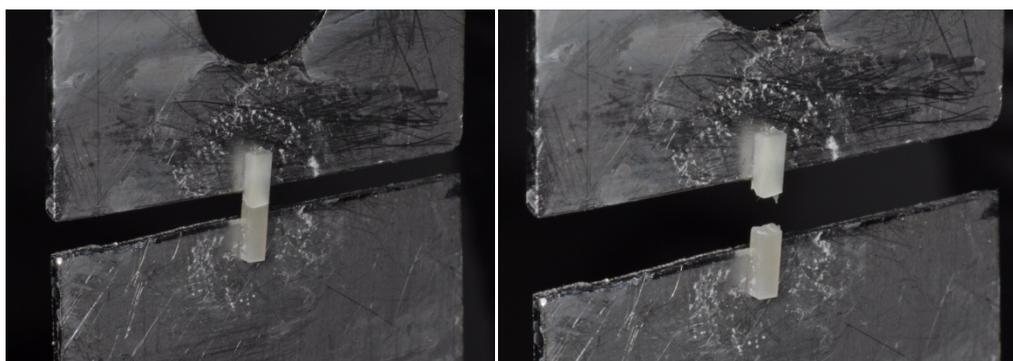


Figura 24. Test di micro-trazione sui campioni

La rottura coesiva è definita come quel tipo di frattura che avviene a livello del dente o del composito. Nel nostro caso questo tipo di rottura si è verificata soltanto due volte e sempre sul dente. Lo sforzo di rottura misurato è stato di circa 6 MPa (Graf.6), circa cinque (5) volte inferiore al valore medio definito in letteratura per il tessuto dentinale. Questo si presuppone sia stato causato da difetti strutturali del tessuto, trattandosi di denti estratti.

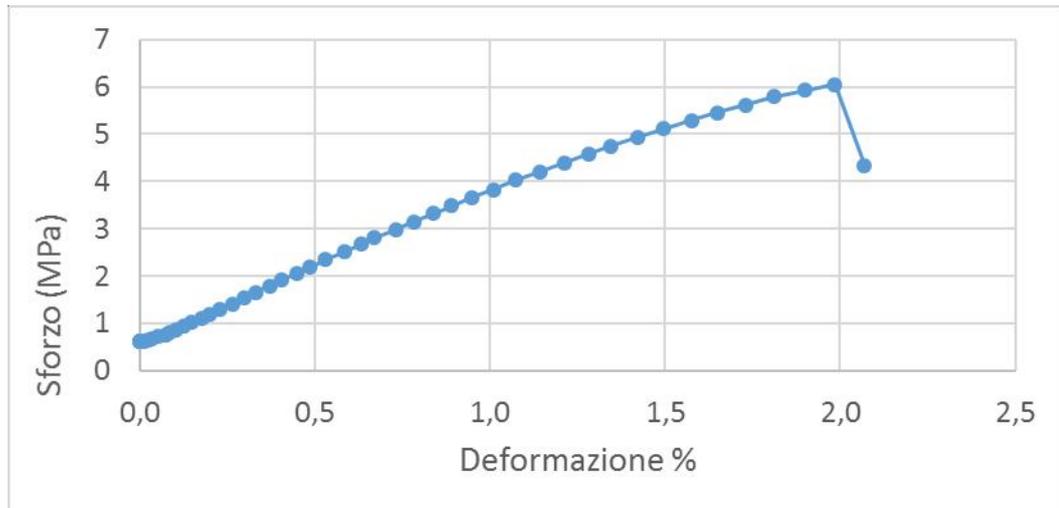


Grafico 6. Curva sforzo-deformazione del campione sottoposto a micro trazione che indica il punto di rottura coesiva.

Abbiamo eseguito test di rottura, sia su adesivo commerciale sia sperimentale, utilizzando micro-trazione al fine di valutare la forza di legame dell'interfaccia dente-adesivo-composito. I dati riguardanti l'adesivo commerciale sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura allo scopo di avere validità sulle impostazioni di misura.

La deformazione a rottura è fissa al 3,5-4,5% (Graf.7). La media dei valori per l'adesivo commerciale è di $35,61 \pm 4,01$ MPa, che rientra nella deviazione standard dei dati stabiliti nel datasheet del materiale.

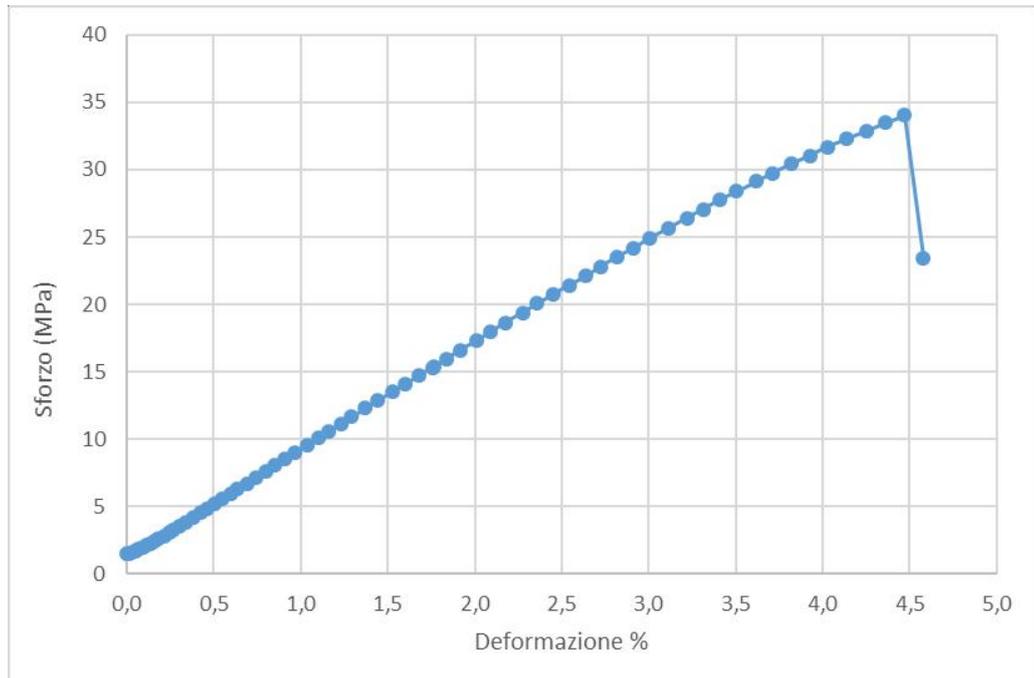


Grafico 7. Curva sforzo-deformazione di un campione di adesivo commerciale sottoposto a micro-trazione.

La media dei carichi di rottura per l'adesivo sperimentale è di $29,1 \pm 2,06$ MPa e indica un valore minore di 6 MPa nella forza di legame rispetto al suo analogo commerciale (Graf.8). Tuttavia sono dati accettabili se confrontati ai valori medi degli adesivi commerciali.

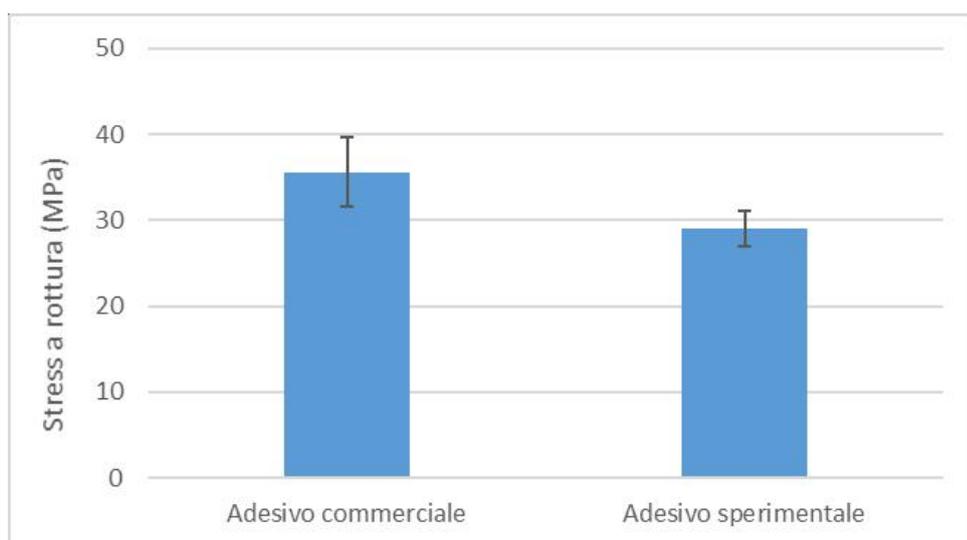


Grafico 8. Test di micro trazione. Comparazione dei valori medi della forza di legame dell'adesivo commerciale e sperimentale in dentizione permanente.

Gli stessi test sono stati eseguiti anche su elementi della serie decidua, ottenendo una media dei carichi di rottura dell'adesivo commerciale e dell'adesivo sperimentale (Graf.9) minori rispetto ai valori sulla dentatura permanente, ma in linea con i valori presenti in letteratura⁵⁵.

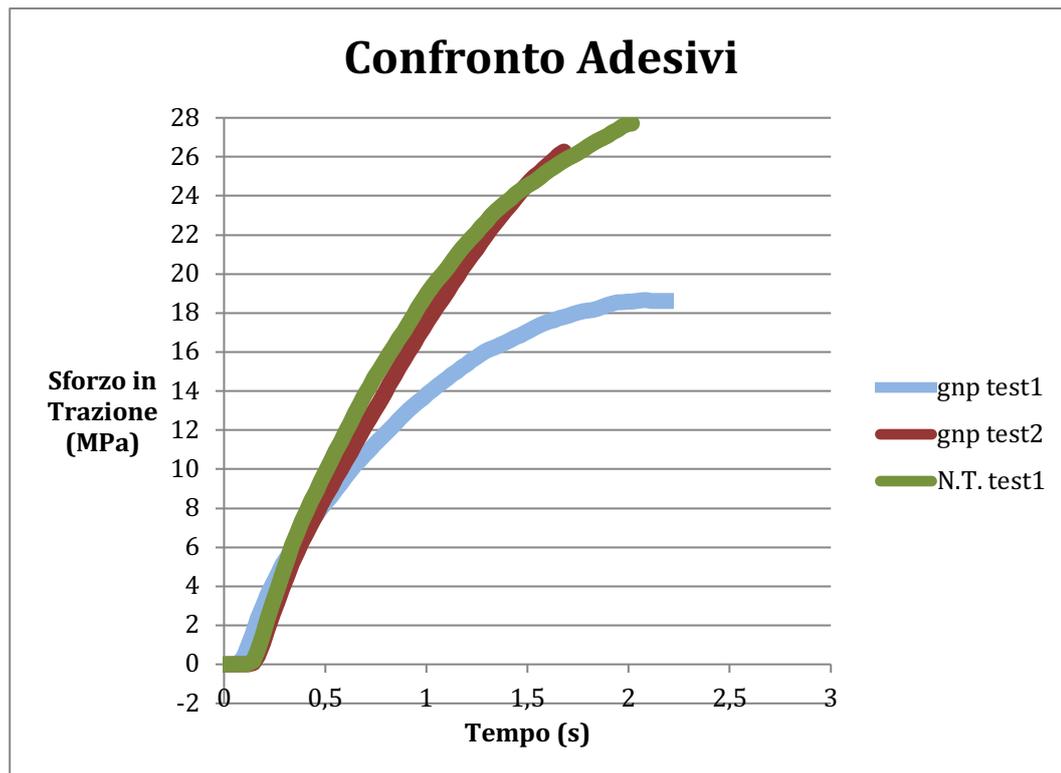


Grafico 9. Media dei media dei carichi di rottura dell'adesivo commerciale e dell'adesivo sperimentale in dentizione decidua.

L'adesivo commerciale presenta un carico di rottura media pari a $23,33 \pm 4,89$ MPa mentre l'adesivo sperimentale una media di $18,25 \pm 4,12$ MPa (Graf.10). Si può notare come vi sia una differenza di forza di rottura, tra adesivo commerciale e sperimentale, di 5 MPa valore molto simile ai test eseguiti sulla dentatura permanente.

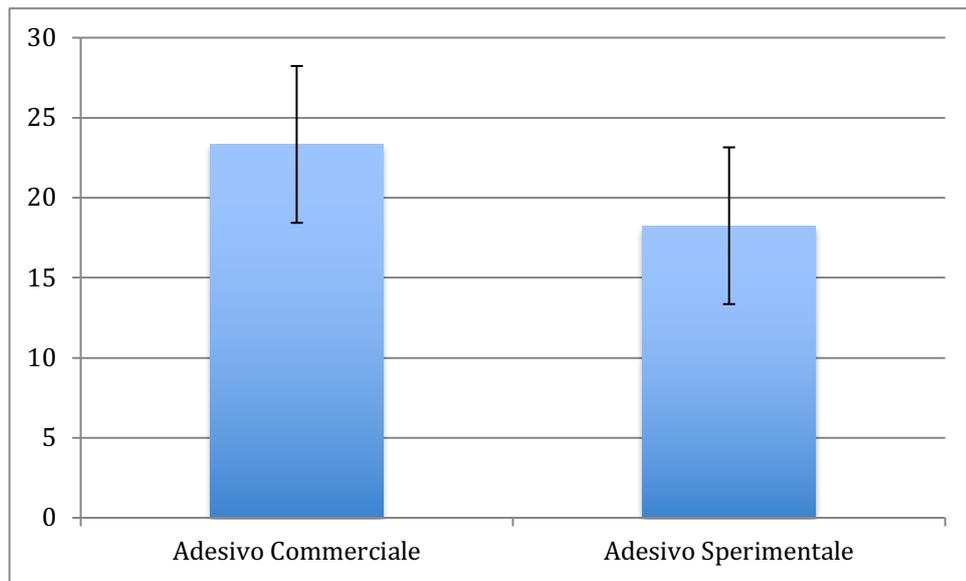


Grafico 10. Test di micro trazione. Comparazione dei valori medi della forza di legame dell'adesivo commerciale e sperimentale in dentizione decidua.

Abbiamo valutato, inoltre, la qualità dell'adesivo sperimentale anche grazie all'imaging tramite SEM. Gli adesivi smalto dentinali costituiscono un'interfaccia tra il substrato dentale e la resina composita, con lo scopo di rendere saldo il legame tra un materiale idrofobico, il composito, ed un tessuto con struttura eterogenea, umida e vitale. Il legame sulla superficie del dente avviene per interazione meccanica, grazie alla penetrazione di zaffi resinosi all'interno dei tubuli dentinali e nella fitta trama di fibre collagene esposte dalla mordenzatura. Le immagini da noi elaborate mostrano la presenza invariata dell'interfaccia dente-adesivo-composito sia nell'adesivo commerciale sia in quello da noi sviluppato (Fig.25).

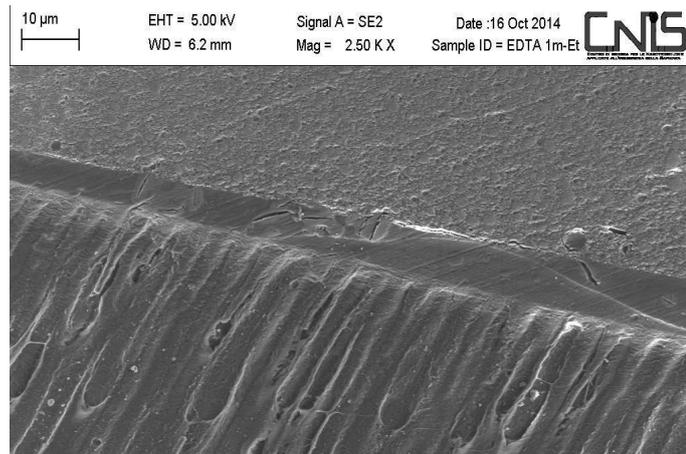


Figura 25 Immagine SEM dell'interfaccia dell'adesivo sperimentale.

4.2.2 Qualità dell'interfaccia filler-matrice

I GNP sono particelle che appartengono alla classe dei filler a fibra corta. Questo tipo di riempitivo può rinforzare o indebolire la matrice resinosa polimerica termoindurente in base al tipo di forma, dimensioni e qualità dell'adesione tra le particelle e la matrice. È di fondamentale importanza l'entità di legame fibra-matrice al fine di migliorare le proprietà meccaniche dell'adesivo. Un aspetto negativo emerso nelle nostre indagini è la presenza d'incrinature nella compagine dell'adesivo in corrispondenza dei GNP, le quali potrebbero indurre a fratture, spiegando così anche la diminuzione della forza di legame (Fig.26,27). Tale fenomeno comunque sembra essere presente quasi esclusivamente in zone ove vi siano GNP non ben esfoliati, i quali rivestendo i lati delle incrinature, si sono separati in fasi successive come ad esempio la polimerizzazione o il taglio del campione.

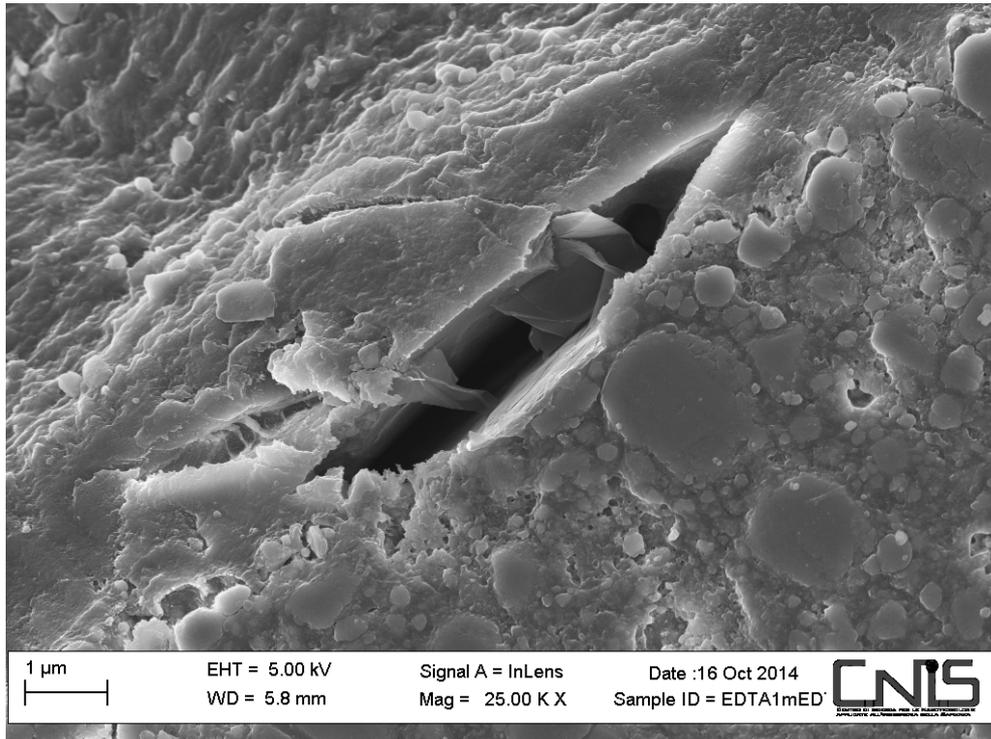


Figura 26. Immagine SEM dell'interfaccia GNP-matrice resinosa.

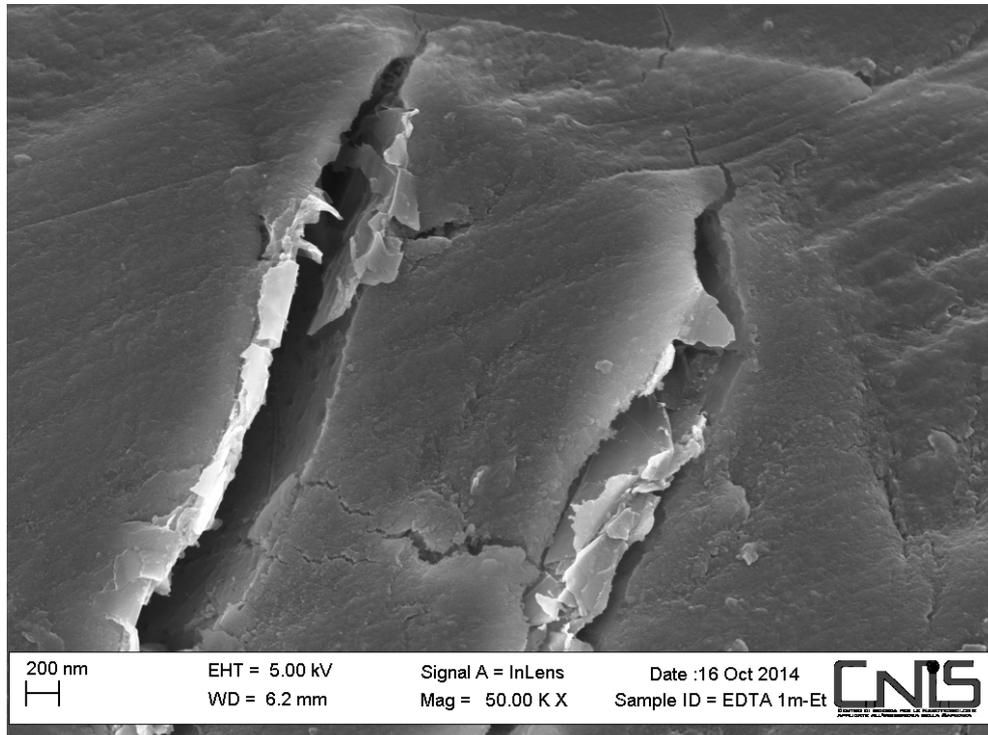


Figura 27. Immagine SEM dell'interfaccia GNP-matrice resinosa

Per ovviare a tale inconveniente si è pensato che una centrifugazione aggiuntiva, in grado di selezionare ed escludere dal materiale i GNP più spessi, possa migliorare la tenuta dell'interfaccia e l'instaurarsi di tale fenomeno.

Oltre alla centrifugazione della sospensione si è tentato di eseguire il *grafting* dei GNP, secondo la tecnica definita da Nuvoli et al⁵¹, che consiste nel funzionalizzare i GNP con catene polimeriche durante la fase di esfoliazione in fase liquida. Questo permette di limitare la presenza di aggregati, migliorando la bagnabilità dei filler e la loro integrazione nella matrice resinosa.

Questa integrazione del processo è ancora in fase di studio e non è stata affrontata in questa tesi.

Conclusioni

Uno degli ostacoli più rilevanti in campo odontoiatrico è la presenza nel cavo orale di microrganismi. A poche ore dalla nascita esso si colonizza di batteri principalmente facoltativi e aerobi. La flora orale di un individuo adulto è rappresentata da più di 500 specie differenti, per la maggior parte simbiotici e utili all'organismo stesso. In condizioni particolari però potrebbero divenire patologici, portando così a diversi quadri clinici.

In Odontoiatria conservativa la contaminazione batterica secondaria di un restauro crea le basi per un insuccesso clinico.

Lo studio intrapreso in questa tesi ha permesso di sviluppare un adesivo smalto dentinale dalle innovative proprietà antimicrobiche. Cardine di tali proprietà è il GNP, che ha mostrato anche una elevata biocompatibilità sia su cellule umane che su modello animale. Il punto di partenza è stato l'ormai riconosciuto potere antibatterico del grafene, soprattutto Grafene Ossido, nonostante che in letteratura e nei brevetti non vi fosse un utilizzo di GNP in materiali dentali. I GNP sono stati prodotti e testati come filler in adesivi dentali. I test antimicrobici dei campioni su ceppi di *Streptococcus mutans* hanno mostrato elevati valori di mortalità. Nello specifico analizzando cellule batteriche in sospensione attraverso il metodo della conta delle colonie formatesi (CFU), si è osservato che i GNP non hanno solo tossicità sulle singole cellule, ma anche un effetto anti-biofilm interferendo con il ciclo vitale dello stesso, inibendone così lo sviluppo. Il materiale così prodotto ha mostrato un'elevata efficacia nei primi giorni di applicazione, in cui si è osservato il

100% di mortalità batterica, e quindi il blocco della crescita del biofilm. I test sono stati condotti anche su invecchiamento del materiale, in cui i dati sull'effetto coincidevano nelle prime ore, ma diventavano inferiori dopo dodici (12) e ventiquattro (24) ore, arrivando a un tasso di mortalità del 65%. Tale perdita è stata attribuita alle fasi della procedura d'invecchiamento che possono modificare la distribuzione superficiale del filler e quindi l'efficacia dei GNP.

Lo scopo principale degli adesivi smalto dentinali rimane comunque quello di dare stabilità e ritenzione al restauro. A questo scopo sono stati eseguiti test per verificare le proprietà meccaniche dell'adesivo sperimentale. Sono stati eseguiti test standard per i materiali dentali quali la micro-trazione, al fine di studiare la forza di legame nell'adesivo modificato con l'introduzione dei GNP. Si è riscontrata una diminuzione di tale forza rispetto a quella mostrata dal corrispettivo adesivo commerciale. Tuttavia il valore medio dell'adesivo sperimentale ottenuto, nei due campioni analizzati, è di 18,25 MPa e poiché rientra nella media dei valori riferiti ad adesivi dentali ora in commercio, ci fa ritenere il nostro prodotto potenzialmente competitivo. Si è cercato di dare una spiegazione scientifica a questa riduzione nelle proprietà meccaniche del materiale. Le analisi al SEM ci hanno rivelato l'esistenza di fratture nella compagine dell'adesivo, dove si è sempre osservata la presenza di GNP di dimensioni superiori al micrometro. Queste incrinature possono essere dovute o a distacco tra i piani grafenici a causa di una forte adesione tra GNP e polimero, oppure a dimensioni troppo elevate e quindi ad un comportamento dei GNP come inclusione e non come rinforzo. L'interpretazione data grazie alle immagini SEM è che

probabilmente il fenomeno sia dovuto a una sommazione di questi effetti. Si stanno comunque eseguendo studi per migliorare le dimensioni medie dei GNP, variando i parametri di esfoliazione in fase liquida, oppure effettuando uno step di centrifugazione successivo all'esfoliazione.

Si è ipotizzata altresì l'introduzione di una procedura di grafting del GNP con i polimeri presenti nella matrice al fine di aumentarne l'adesione e diminuire contestualmente la comparsa di fratture.

Ci si è aperto quindi un ventaglio d'ipotesi che sono ora oggetto di studio al fine di migliorare le proprietà meccaniche del materiale pur mantenendo inalterate o migliorandone quelle antimicrobiche.

Bibliografia

1. WHO World Health Organization, Oral health information systems.
2. Loesche WJ, Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiol Rev* 1986; 50: 353-380.
3. Trottni M, Bossù M, Corridore D, Ierardo G, Luzzi V, Saccucci M, Polimeni A, Assessing Risk Factors for Dental Caries: A Statistical Modeling Approach. *Caries Res* 2015; 49: 226-235.
4. Campus G, Condò SG, Di Renzo G, Ferro R, Gatto R, Giuca MR, Giuliana G, Majorana A, Marzo L, Ottolenghi L, Petti S, Piana G, Pizzi S, Polimeni A, Pozzi A, Sapelli PL, Ugazio A. National Italian Guidelines for caries prevention in 0 to 12 years-old children. *Eur J Paediatr Dent* 2007; 8: 153-159.
5. De Michelis B, Modica R, Re G, *Trattato di clinica odontostomatologica*, Torino, Ed. Minerva Medica 1986; 1: 65-69.
6. Ministero della Salute. Linee Guida Nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età evolutiva. Aggiornamento, novembre 2013.
7. Schmidt RF, Lang F, Twes G, *Fisiologia Umana*, trad. It. Astarita L, Carelli R, Carlomagno G, Napoli, Idelson-Gnocchi 2008 (Ed. orig. *Physiologie des Menschen*, Heidelberg, Springer Medizin Verlag 2005).
8. Stookey GK, The effect of saliva on dental caries. *JADA* 2008; 139: 11S-17S.
9. Schachtele CF, Jensen ME, Comparison of Methods for Monitoring Changes in the pH of Human Dental Plaque. *J Dent Res* 1982; 61: 1117-1125.
10. Selwitz RH, Ismail A, Pitts NB, Dental Caries. *The Lancet* 2007; 6: 51-59.
11. Marsh P, Martin MV, *Microbiologia Odontoiatrica*, trad.It. Polonelli L, Parma, UNI.NOVA 2005 (Ed. orig. *Oral Microbiology*, Elsevier 1999).
12. Carranza FA, Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza - *Parodontologia Clinica*, Ed. It. Piloni A, Roma, Antonio Delfino Editore 2011 (Ed. orig. *Carranza's – Clinical Periodontology*, Elsevier 2006).
13. Takahashi N, Nyvad B, The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 2011; 90: 294-303.
14. Tanner ACR, Mathney JMJ, Kent RL, Chalmers NI, Hughes CV, Loo CY, Pradhan N, Kanasi E, Hwang J, Dahlan MA, Papadopoulou E, Dewhirst FE, Cultivable anaerobic microbiota of Sever Early Childhood Caries. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1464-1474.

15. Bharti R, Wadhvani K, Tikku A, Chandra A, Dental amalgam: an update. *J Conserv Dent* 2010; 13: 204-210.
16. Brenna F, Breschi L, Cavalli G, Devoto W, Dondi dall'Orologio G, Ferrari P, Fiorini A, Gagliani M, Manfrini F, Manfrini G, Marcoli PA, Massai L, Monari A, Nuvina M, Oddera M, Palazzo M, Pansecchi D, Patroni S, Prando G, Robello C, Spreafico R, Tinti C, Veneziani M, Odontoiatria restaurativa: procedure di trattamento e prospettive future. Milano, Elsevier 2009.
17. Black GV, A work in operative dentistry in two volumes. Chicago, Medico-Dental Publishing 1917.
18. Ferracane JL, Resin Composite – State of the art. *Dent Mater* 2011; 27: 29-38.
19. Kinloch AJ, Adhesion and Adhesives: science and technology. London, Springer Science + Business media 1987.
20. Roberson TM, Heymann HO, Swift Jr EJ, *Sturdevant's Odontoiatria Conservativa: arte e scienza*, trad It. Nicolin G, Pradella F, Simionato F, Trapani C, Padova, Piccin 2004 (Ed. orig. *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry*, Mosby 2002).
21. Daniele S, Rimondini L, Lodi G, Carrassi A, Lo stato dell'arte in Odontoiatria adesiva. *Dental Cadmos* 2009; 77.
22. Buonocore GM, A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955; 34: 849-853.
23. Gwinnett AJ, Matsui A, A study of enamel adhesives. The physical relationship between enamel and adhesive. *Archs Oral Biol* 1967; 12: 1615-1620.
24. Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, Van Meerbeek B, Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Australian Dental Journal* 2011; 56: 31-44.
25. Violich DR, Chandler NP, The smear layer in endodontics – A review. *International Endodontic Journal* 2010; 43: 2-15.
26. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E, The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16: 265-273.
27. Pashley DH, Michelich V, Kehl T, Dentin permeability: effects of smear layer removal. *J Prosthet Dent* 1981; 46: 531-537.
28. Kugel G, Ferrari M, The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc* 2000; 131: 20S-25S.
29. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijai P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G, Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. *Oper Dent* 2003; 28: 215-235.

30. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; 28: 3757-3785.
31. Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S, An in vivo evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dent Mater* 2007; 23: 170-176.
32. Pupo YM, Farago PV, Nadal JM, Simão LC, Esmerino LA, Gomes OM, Gomes JC, Effect of a novel quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) on adhesion and antibacterial properties of dental adhesives. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 8998-9015.
33. Wang S, Zhang K, Zhou X, Xu N, Xu HH, Weir MD, Ge Y, Wang S, Li M, Li Y, Xu X, Cheng L, Antibacterial effect of dental adhesive containing dimethylaminododecyl methacrylate on the development of *Streptococcus mutans* biofilm. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 12791-12806.
34. Park MVDZ, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briedé JJ, van Loveren H, de Jong WH, The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 2011; 32: 9810-9817.
35. Geim AK, Novoselov KS, The rise of graphene. *Nature materials* 2007; 6: 183-191.
36. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA, (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 2010; 306: 666-669.
37. Ismach A, Druzgalski C, Penwell S, Schwartzberg A, Zheng M, Javey A, Bokor J, Zhang Y, Direct chemical vapor deposition of graphene on dielectric surfaces. *Nano letters* 2010; 10: 1542.
38. Zhao W, Wu F, Wu H, Chen G, Preparation of colloidal dispersions of graphene sheets in organic solvents by using ball milling. *Journal of Nanomaterials* 2010.
39. Asma Y, Jyi-Jiin L, Isaac MD, Processing of expanded graphite reinforced polymer nanocomposites. *Composites Science and Technology* 2006; 66: 1182-1186.
40. Liu J, yang L, Hopfinger AJ, Affinity of drugs and small biologically active molecules to carbon nanotubes: a pharmacodynamics and nanotoxicity factor?. *Mol Pharm* 2009; 6: 873-882.
41. Liu Z, Robinson JT, Sun X, Dai H, PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 10876-10877.
42. Chang Y, Yang ST, Liu JH, Dong E, Wang Y, Cao A, Liu Y, Wang H, In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicology letter* 2011; 200: 201-210.

43. Wang K, Ruan J, Song H, Zhang J, Wo Y, Guo S, Cui D, Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters* 2011; 6: 1-8.
44. Zanni E, De Bellis G, Bracciale MP, Broggi A, Santarelli ML, Sarto MS, Palleschi C, Uccelletti D, Graphite nanoplatelets and *Caenorhabditis elegans*: insights from an in vivo model. *Nano Letters* 2012; 12: 2740-2744.
45. Conroy J, Verma NK, Smith RJ, Rezvani E, Duesberg GS, Coleman JN, Volkov Y, Biocompatibility of Pristine Graphene Monolayers, Nanosheets and thin films. *arXiv*2014; 1406.2497 [q-bio.CB].
46. Yang K, Li Y, Tan X, Peng R, Liu Z, Behavior and Toxicity of Graphene and Its Functionalized Derivatives in Biological Systems. *Small* 2013; 9: 1492-1503.
47. Gurunathan S, Han JW, Dayem AA, Eppakayala V, Kim JH, Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine* 2012, 7: 5901-5914.
48. Ponticelli G, Studio in vitro degli effetti citotossici indotti da nanoplacchette di grafene su linee tumorali umane; Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria delle Nanotecnologie, Università La Sapienza di Roma, 2013.
49. An X, Ma H, Liu B, Wang J, Graphene Oxide Reinforced Polylactic Acid/Polyurethane Antibacterial Composites. *Journal of Nanomaterials* 2013.
50. Huang Y, Wang T, Zhao X, Wang X, Zhou L, Yang Y, Liao F, Ju Y, Poly(lactic acid)/graphene oxide-ZnO nanocomposite films with good mechanical, dynamic mechanical, anti-UV and antibacterial properties; *Journal of chemical technology and biotechnology* 2014.
51. Nuvoli D, Alzari V, Sanna R, Scognamillo S, Alongi J, Mlucelli G, Mariani A, Synthesis and characterization of graphene-based nanocomposites with potential use for biomedical applications. *J Nanopart Res* 2012; 15: 1512.
52. Bregnocchi A, Sviluppo di adesivi dentali innovativi a base grafene con proprietà antimicrobiche. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria delle Nanotecnologie, Università La Sapienza di Roma, 2014.
53. Curtis R, Watson T, Dental biomaterials: imaging, testing and modeling. Woodhead Publishing Group 2008.
54. Bakkiyaraj D, Pandian SK, Biofilm inhibition by nanoparticles; *Antibiofilm Agents: Springer Series on Biofilm* 2014; 8: 385-406.
55. Kensche A, Dähne F, Wagenschwanz C, Richter G, Vieregutz G, Hannig C, Shear bond strength of different types of adhesive systems to dentin and enamel of deciduous teeth in vitro. *Clin Oral Investig.* 2016 May;20(4):831-40.