



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

MÁRJULLY EDUARDO RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO ASSOCIADO OU NÃO À
CLOREXIDINA NAS PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-
MECÂNICAS E DE REDUÇÃO DA DESMINERALIZAÇÃO DE
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO**

ARAÇATUBA - SP

2015

MÁRJULLY EDUARDO RODRIGUES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO ASSOCIADO OU NÃO À CLOREXIDINA NAS
PROPRIEDADES MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-MECÂNICAS E DE REDUÇÃO DA
DESMINERALIZAÇÃO DE CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Mestre em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Duque
Coorientador: Prof. Dr. Aberto Carlos Botazzo Delbem

**ARAÇATUBA - SP
2015**

Catálogo-na-Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586i Silva, Márjully Eduardo Rodrigues da.
Influência da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio associado ou não à clorexidina nas propriedades microbiológicas, físico-mecânicas e de redução da desmineralização de cimento de ionômero de vidro / Márjully Eduardo Rodrigues da Silva. – Araçatuba, 2015
84 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Duque
Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Cimentos de ionômeros de vidro 2. Fosfatos 3. Clorexidina I. Título

Black D27
CDD 617.645

Dados Curriculares
Márjully Eduardo Rodrigues da Silva

| | |
|--------------------|---|
| Nascimento | 27.06.1990 – Paranaíba - MS |
| Filiação | Cézar Rodrigues da Silva Marlene Eduardo Ferreira |
| 2008/2012 | Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO. |
| 2013/2015 | Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. |
| Associações | CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica |

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Marlene Eduardo Ferreira e Cézar Rodrigues da Silva (*in memorian*)

Por toda dedicação, educação e o mais importante pela confiança que depositaram em mim. Vocês são os maiores exemplos de vida, de dedicação, de honestidade, simplicidade, felicidade e amor.

Agradeço por todos os momentos em que estivemos juntos e pelas palavras de conforto que sempre trouxeram segurança, tranquilidade e confiança.

Tudo que acontece em minha vida é fruto do que vocês me ensinaram, a correr atrás do meu futuro, agradeço sempre pelo apoio constante de vocês.

Meu pai não está mais aqui fisicamente me assistindo, mas sei que, em algum lugar, ele torce e me guia para que tudo em minha vida dê certo.

Minha mãe, mesmo distante, todos os dias esta presente em meus pensamentos, enviando sempre palavras de apoio, ligando sempre para me escutar, desabafar, e com uma simples palavra, ela tem o dom de me acalmar.

Mãe, sem você hoje não poderia estar realizando mais um de meus sonhos.

Te amo, te agradeço por tudo que faz, você é tudo para mim!

Ao meu sobrinho Kaique Ferreira lamamura (*in memorian*)

Meu anjinho, você passou pelas nossas vidas tão depressa, que veio para demonstrar o que é um amor de verdade, o que é viver momentos de alegria, felicidades, demonstrou que todos devemos lutar e viver o hoje. Você foi o maior guerreiro que já vi em minha vida, você lutou dia após dia pela sua recuperação, lutou para viver, para ficar ao nosso lado.

Eu torci tanto para que este dia chegasse, e que você estivesse aqui para comemorar comigo mais uma vitória na minha vida. Mas hoje eu só posso pensar em você com saudades e o meu coração se enche de tristeza e faz as

lágrimas transbordarem pelos meus olhos. Mas não há nenhuma novidade nisso, porque eu pensei em você ontem, e anteontem, e todos os dias, desde que você se foi.

Eu penso em você em silêncio, e muitas vezes, chamo o seu nome. Penso que você ainda está aqui. Mas, infelizmente, tudo que me resta são memórias, são imagens, objetos, musiquinhas que me fazem lembrar você, e reacender o amor dentro do meu coração.

A sua lembrança continua viva, presente latente em minha vida e de todos da nossa família, em todas as partes de sua casa, e nunca irá desaparecer. Deus agora tem você em seus braços como um anjo, mas eu terei você eternamente em meu coração.

Titia te ama muito, saudades.

Agradecimentos especiais

A Deus,

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando meus passos nesse longo caminho rumo a grandes realizações. Devo a Ele todos os momentos de alegria e sucesso até aqui conquistado. Muito obrigada pela companhia.

A minha avó Geraldina Ferreira de Freitas

Agradeço todos os dias a Deus por tê-la colocado em minha vida. Minha querida avó, uma mulher sábia, honesta, guerreira.

Obrigada por estar junto de mim, em todos os momentos de minha vida. Você é muito especial.

Sua simplicidade nos mostra que com fé podemos tornar tudo realidade, e que sem Deus nada seríamos.

Te amo vó!

Ao meu irmão Juliano Keidy Ferreira Otaka e à minha cunhada

Kátia Regina lamamura

Agradeço todos os dias por Deus ter colocado duas pessoas tão especiais em minha vida, vocês dois são mais do que da família, são meus grandes amigos, um exemplo de amor ao outro, exemplos de pais maravilhosos, que lutam pela vida e pela saúde do próximo.

Vocês sempre caminharam ao meu lado e nunca mediram esforços para me ajudar, agradeço a cumplicidade, o companheirismo, amizade, paciência e o apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada por me confortar nos momentos difíceis, pela preocupação, por todo incentivo constante e por todos os momentos que compartilhamos até hoje.

Amo vocês!

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Cristiane Duque

Agradeço muito pela orientação, paciência, compreensão e por todo carinho dedicado durante esses dois anos de mestrado. Obrigada pela confiança que depositou em mim, pelo incentivo e dedicação. Obrigada por estar disposta em todos os momentos difíceis em que precisei de sua orientação, pelos momentos de desabafo, obrigada pela sua amizade, que se não fosse essa amizade e cumplicidade não conseguiria ter tornado nosso ambiente de trabalho tão agradável, onde se tornou possível a realização de todo esse trabalho.

Obrigada por ser esse exemplo de pessoa, dedicada ao trabalho, ao filho, a família, isso demonstra a pessoa bondosa, generosa, íntegra e profissional que é.

Minha eterna gratidão.

Às minhas queridas amigas Mariana Emi Nagata e Thayse Yumi Hosida

Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, sempre me ajudando, dando conselhos, me socorrendo nos momentos mais difíceis, me apoiando para que nunca desistisse. Acredito que as terei não só como amigas, mas sim como grandes irmãs. Agradeço pelas amizades, preocupações, compreensões, conversas e muitas risadas que demos ao longo desses anos. Obrigada por me ensinarem o que é ser uma amiga verdadeira, e por fazerem muito por mim.

Amo vocês.

Às minhas amigas Jaqueline Canova Paludetto Amaral e Carla Oliveira Favretto

Seus conselhos foram fundamentais para o meu crescimento. Sempre me animaram com suas palavras doces, meigas e sábias, que chegavam na hora certa. Não tenho palavras para agradecer todo carinho, amor e respeito que tiveram por mim. Por tudo o que já fizeram por mim, minha eterna gratidão. Minha admiração por vocês é imensa, assim como a alegria de tê-las sempre por perto.

Amo vocês.

Ao meu amigo Kevin Bruce Hall

Obrigada por existir em minha vida e dar a ela um novo sentido. Com você compartilhei momentos inesquecíveis durante os dois anos de mestrado, você é um presente de Deus em minha vida!

Sinto muito pela sua partida, mas espero que volte sempre para podermos compartilhar momentos únicos de risadas e alegrias!

Saudades, amigo.

À minha grande amiga Danielle Camara

Agradeço a você pelo imenso amor e carinho, e por dividir comigo alguns momentos desse mestrado. Muitos momentos foram de lágrimas, mas você, minha amiga sempre que precisei me deu conselhos sábios, palavras para me acalmar, sempre me confortou com suas palavras de ânimo, me fazendo dar altas risadas.

Obrigada pelos momentos em que não sabia de nada, como fazer nada, e você de longe vinha com suas palavras: “calma amiga, eu vou lhe ajudar, vamos lá que eu te ensino”. Isso eu levarei comigo para o resto de minha vida, sempre me estendeu a mão quando precisei.

Obrigada amiga, saudades.

Ao meu amigo José Antônio

José se pudesse descrever você aqui, iriam existir infinitas páginas. Para resumir, você me ajudou completamente em todos os momentos desse trabalho, me ensinou como a fazer um pouquinho de tudo. Acredito que você será um grande pesquisador, você é um homem brilhante, inteligente, amigo, fiel a Deus.

Obrigada por toda sua paciência, compreensão, pelas palavras de sabedoria. Sou muito grata a tudo que fez por mim, e para a realização deste trabalho, agradeço de coração por tudo, você faz parte disso.

Obrigada Zé!

À minha amiga Marcelle Danelon

Agradeço por todos os momentos que tive dúvidas, pelos e-mails, pelas mensagens bem tarde da noite, nos finais de semana, por responder com todo carinho, de estar disposta a ajudar sempre.

Minha amiga, agradeço a Deus por tê-la conhecido, ter colocado você em meu caminho, por ser um exemplo de pessoa se dedica muito à pesquisa. Você nunca mediu esforços para me ajudar, sempre ali quando precisei.

Conte sempre comigo, obrigada.

Aos alunos e alunas de Mestrado, Doutorado, Pós-Doutorado e Iniciação Científica: Jackeline Amaral, Valéria, Dani Oliveira, Maria Daniela, Kelly, Natália, Paula, Tatiana, Remberto, Carla, Carol Lodi, Douglas, Laís, Jesse, Vanessa, Marina, Dinah, Renan, Gabriela, Sâmia, Larissa, Guilherme, Giovanna e Karina.

Obrigada pelos momentos agradáveis, pela amizade de cada um e pela colaboração dos que me ajudaram e que foram essenciais para a conclusão desta pesquisa.

Obrigada, sucesso a todos!

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Federico Cunha, Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan, Prof^a. Dr^a. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, Prof^a Dra^a Cristiane Duque, Prof^o Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Obrigada pela agradável convivência e conhecimentos transmitidos durante o curso de mestrado.

Agradecimentos

À Maria dos Santos Ferreira Fernandes

Pela ajuda no início do meu mestrado, obrigada por compartilhar sua experiência.

Obrigada.

Ao Prof. Dr. Emerson Camargo, da UFSCAR

Obrigada pela síntese e caracterização das nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMP). Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr^a Ana Maria Pires Soubhia, digníssima Diretora e Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Vice-Diretor.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar pela atenção e disponibilidade com que nos recebem.

À Valéria, Cristiane e Lilian da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Ao Frigorífico FRIBOI, em especial, ao veterinário Henrique Borges e José Francisco, que permitiram a coleta dos dentes bovinos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Processo: 130717/2013-4), pela concessão de bolsa que possibilitou a realização deste Curso de Mestrado.

A Agência UNESP de Inovação (AUIN) – (Processo: 2173/2013, pela concessão de recursos financeiros que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao professor da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, por ceder gentilmente à máquina Instron, o qual foi fundamental para realizar os ensaios de compressão e tração diametral.

Ao técnico da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Marcos Blanco Cangiani, por gentilmente me ensinar a realizar os ensaios de compressão e tração diametral. Agradeço a receptividade e o convívio agradável.

A aluna de Pós Doutorado e professora da pós-graduação em Materiais Dentários da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Andreia Bolzan de Paula, por gentilmente me receber e ensinar a realizar parte do meu trabalho.

A todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão.

Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta.

Chico Xavier

Silva, MER. Influência da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio associado ou não à clorexidina nas propriedades microbiológicas, físico-mecânicas e de redução da desmineralização de cimento de ionômero de vidro. 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2015.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMP) e clorexidina (CHX) nas propriedades microbiológicas, físico-mecânicas e na capacidade de redução da desmineralização de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIV) indicado para restauração. Inicialmente, foram determinados nove grupos de estudo: 1) CIV; 2) CIV + CHX 1,25%; 3) CIV + CHX 2,5%; 4) CIV + TMP 7%; 5) CIV+ CHX 1,25% + TMP 7%; 6) CIV + CHX 2,5% + TMP 7%; 7) CIV+ TMP 14%; 8) CIV + CHX 1,25% + TMP 14%; 9) CIV + CHX 2,5% + TMP 14%. Para determinar a atividade antimicrobiana desses CIV contendo ou não TMP e CHX foi realizado o teste de difusão em ágar com *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces israelii* e *Candida albicans*. Após 24h, os halos de inibição obtidos pelos CIV foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital. Corpos-de-prova dos CIV foram confeccionados utilizando matrizes específicas e avaliadas as seguintes propriedades físico-mecânicas para cada grupo de materiais do estudo: resistência à compressão e à tração diametral e dureza de superfície, além de determinar a liberação total de fluoreto (F) e de TMP. Foram preparados 80 blocos a partir de incisivos bovinos e selecionados pelo teste de dureza de superfície do esmalte (DS₁). Os corpos-de-prova dos CIV foram adaptados aos blocos de esmalte recém-preparados e submetidos às ciclagens de pH. A seguir, foi analisada a dureza de superfície final do esmalte (DS₂) para o cálculo da porcentagem da perda de dureza de superfície (%PDS) e verificar a capacidade do material em reduzir a desmineralização. Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA e Bonferroni ou Student-Newman-Keuls, considerando $p \leq 0,05$. Os resultados mostraram que a adição de clorexidina aumentou significativamente a ação antimicrobiana dos CIV para todos os grupos em que foi associada. As propriedades físico-mecânicas dos CIV, em especial a resistência à compressão, foram reduzidas pela associação de CHX e TMP após 24

horas da confecção dos corpos-de-prova, entretanto, em 7 dias, houve aumento nestas propriedades. Houve aumento na dureza do material com a adição de TMP ao CIV. Os valores totais de liberação de F e TMP dos cimentos não foram afetados pela incorporação de CHX. Considerando a análise de dureza pós-ciclagem de pH, os blocos de esmalte dos grupos contendo TMP 14%, independente da concentração de CHX, apresentaram as menores perdas de dureza de superfície. Conclui-se que o cimento de ionômero de vidro associado com CHX 1,25% e TMP 14% apresentou os resultados mais promissores, apresentando efeito positivo na desmineralização, aumento da atividade antimicrobiana, na liberação de flúor, com mínima redução das propriedades físico-mecânicas.

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro, fosfatos, clorexidina, ação antimicrobiana, força compressiva, resistência à tração, dureza, fluoreto de sódio.

Silva, MER. Influence of the incorporation of sodium trimetaphosphate nanoparticles associated or not with chlorhexidine on the microbiological, physical-mechanical and enamel demineralization reduction properties of glass ionomer cement. 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica, área de Saúde Bucal da Criança) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2015.

The aim of this study was to evaluate the influence of the association of sodium trimetaphosphate nanoparticles (TMP) and chlorhexidine (CHX) on the microbiological, physical-mechanical and enamel demineralization reduction of glass ionomer cement (GIC). Initially, nine groups of the study were defined: 1) control - GIC Fuji LII; 2) GIC+ 1.25% CHX; 3) GIC + 2.5% CHX; 4) GIC + 7%TMP; 5) GIC+ 1.25% CHX + 7%TMP; 6) GIC + 2.5% CHX + 7%TMP; 7) GIC+ 14%TMP; 8) GIC + 1.25% CHX + 14%TMP; 9) GIC+ 2.5% CHX + 14% TMP. The antimicrobial activity of GIC containing or not CHX/TMP was determined by agar diffusion test against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces israelii* and *Candida albicans*. After 24h, the inhibition zones obtained by the GIC were measured with a digital caliper. GIC specimens were prepared using specific stainless steel molds in order to evaluate the following physical-mechanical properties for each material group: compressive and diametral tensile strength and superficial hardness, besides to determine total fluoride and TMP release. Eighty enamel blocks were prepared from extracted bovine incisors and selected through the initial surface hardness test (SH1). GIC specimens were adjusted to the enamel blocks and submitted to pH-cyclings. After that, final superficial hardness (SH2) was determined in order to obtain the percentage of superficial hardness loss (%SHL) and observe the capacity of the materials in reducing enamel demineralization. Data were submitted to ANOVA and Bonferroni or Student-Newman-Keuls statistical tests, considering $p \leq 0.05$. The results showed that the addition of chlorhexidine increased the antimicrobial activity of GIC for all groups. The physical-mechanical properties of GIC, especially compressive strength, were jeopardized by the association of CHX and TMP after 24h of the specimen's preparation, however, after 7 days, improvements on these properties were observed. F and TMP release were not affected by the CHX incorporation. Considering superficial hardness analysis after pH-cycling, groups containing 14%

TMP, regardless of the CHX concentration, have the lowest superficial hardness loss. It was concluded that the glass ionomer cement containing 1.25% CHX and 14% TMP presented the most promising results, presenting positive effect on the demineralization, increasing antimicrobial activity and fluoride release, with minimal interference on the physical-mechanical properties.

Keywords: glass ionomer cement, phosphates; chlorhexidine; antimicrobial action, compressive strength, tensile strength, hardness, sodium fluoride.

| | Páginas |
|---|----------------|
| Figura 1. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra <i>Streptococcus mutans</i> . ^a Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$). | 27 |
| Figura 2. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra <i>Lactobacillus acidophilus</i> . ^a Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$). | 28 |
| Figura 3. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra <i>Actinomyces israeli</i> . ^a Letras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$). | 29 |
| Figura 4. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra <i>Candida albicans</i> . ^a Letras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$). | 30 |
| Figura 5. Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de resistência à compressão para os CIV testados. ^a Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$). | 31 |
| Figura 6. Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de resistência à tração diametral para os CIV testados. ^a Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$). | 32 |
| Figura 7. Médias (Desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de microdureza dos CIV testados. ^a Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$). | 33 |
| Figura 8. Fluoreto total liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelos CIV nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão das médias. ^a Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$). | 34 |
| Figura 9. Fósforo (TMP) total liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelos CIV nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o | 35 |

desvio padrão das médias. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

Figura10. Médias das porcentagens (desvios padrão – barras) obtidas para a perda de microdureza superficial de esmalte bovino em contato com os CIVs testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

36

Tabela 1. Grupos de materiais do estudo

24

Lista de abreviaturas e símbolos

| | |
|----------------------|--|
| - | Menos |
| % | Porcentagem |
| %PDS | Porcentagem de perda da dureza de superfície |
| * | Asterisco |
| / | Dividido por |
| + | Mais |
| < | Menor |
| = | Igual |
| > | Maior |
| $\mu\text{g F/cm}^2$ | Micrograma de fluoreto por centímetro quadrado |
| $\mu\text{g P/cm}^2$ | Micrograma de fósforo por centímetro quadrado |
| μg | Micrograma |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrometro |
| A | Absorbância |
| ANOVA | Análise de variância |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| BHI-A | Brain Heart Infusion Agar |
| Ca | Cálcio |
| CaF_2 | Fluoreto de cálcio |
| CIV | Cimento de ionômero de vidro |
| cm | Centímetro |
| cm^2 | Centímetro quadrado |
| D | Diâmetro |
| DES | Desmineralização |
| DO | Densidade Óptica |
| DP | Desvio padrão |
| DS1 | Dureza de superfície inicial |
| DS2 | Dureza de superfície final |
| et al. | E colaboradores |
| F | Fluoreto |
| Fig. | Figura |

| | |
|----------------------|--|
| Fr | Força |
| g | Gramma |
| h | Hora |
| HA | Hidroxiapatita |
| HCl | Ácido clorídrico |
| KCl | Cloreto de potássio |
| kgf/cm ² | Quilograma-força por centímetro quadrado |
| KHN | Dureza Knoop |
| L | Litro |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mL/mm ² | Mililitro por milímetro quadrado |
| mm | Milímetro |
| mm/min | Milímetro por minuto |
| mm ² | Milímetro quadrado |
| mmol L ⁻¹ | Milimol por litro |
| mmol/ L | Milimolaridade |
| mol /L | Molaridade |
| MPa | Megapascal |
| n | Número de repetições |
| NaF | Fluoreto de sódio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| nm | Nanometro |
| °C | Grau Celsius |
| P | Fósforo |
| p | Nível de significância |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| ppm | Parte por milhão |
| RE | Remineralização |
| s | Segundos |
| T | Altura |
| TISAB | Tampão ajustador de força iônica total |
| TMP | Trimetafosfato de sódio |
| x | Vezes |

| | |
|----------------------|---|
| $\mu\text{g F/mL}$ | Micrograma de fluoreto por mililitro |
| $\mu\text{g F/mm}^3$ | Micrograma de fluoreto por milímetro cúbico |
| $\mu\text{g P/cm}^2$ | Micrograma de fósforo por centímetro quadrado |
| $\mu\text{g/cm}^2$ | Micrograma por centímetro quadrado |
| μm | Micrometro |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Resumo _____ | 24 |
| Introdução _____ | 25 |
| Material e método _____ | 27 |
| Resultados _____ | 33 |
| Discussão _____ | 35 |
| Conclusão _____ | 38 |
| Agradecimentos _____ | 39 |
| Referências _____ | 39 |
| Anexos _____ | 60 |

Influência da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio associado ou não à clorexidina nas propriedades microbiológicas, físico-mecânicas e de redução da desmineralização de cimento de ionômero de vidro

Silva MER¹, Silva DF¹, Pereira JA¹, Danelon M¹, Santos JA¹, Camargo ER², Paula AB³, Delbem ACB¹, Duque C¹.

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista – Araçatuba – SP

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Rua José Bonifácio, 1193 Araçatuba, SP - CEP 16015-050 – Brasil

²UFSCAR – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos - SP

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia (CCET)

Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310

São Carlos - São Paulo – Brasil, CEP 13565-905

³UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas – Piracicaba - SP

Departamento de Materiais Dentários

Avenida Limeira, 901, Piracicaba, São Paulo – Brasil, CEP. 13414-903

São Carlos - São Paulo – Brasil, CEP 13565-905

Título curto: Cimento de ionômero de vidro associado à TMP nanoparticulado e clorexidina.

Correspondência:

Cristiane Duque

Universidade Estadual Paulista – UNESP

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Rua: José Bonifácio, 1193, Araçatuba – SP – Brasil, CEP: 16015-050

Tel: (55) (18) 3636 3315, Fax : (55) (18) 3636 3332

Email: cduque@foa.unesp.br

*De acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research [Anexo A].

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMP) e clorexidina (CHX) nas propriedades microbiológicas, físico-mecânicas e na capacidade de redução da desmineralização de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIV). Inicialmente, foram determinados nove grupos de estudo: 1) CIV; 2) CIV + CHX 1,25%; 3) CIV + CHX 2,5%; 4) CIV + TMP 7%; 5) CIV+ CHX 1,25% + TMP 7%; 6) CIV + CHX 2,5% + TMP 7%; 7) CIV+ TMP 14%; 8) CIV + CHX 1,25% + TMP 14%; 9) CIV + CHX 2,5% + TMP 14%. Para determinar a atividade antimicrobiana desses CIV foi realizado o teste de difusão em ágar com *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces israelii* e *Candida albicans*. Corpos-de-prova dos CIV foram confeccionados e as seguintes propriedades físico-mecânicas avaliadas: resistência à compressão e à tração diametral e dureza de superfície, além de determinar a liberação total de fluoreto (F) e de TMP. Além disso, corpos-de-prova dos CIV foram adaptados a blocos de esmalte selecionados pelo teste de dureza de superfície (DS₁) e submetidos às ciclagens de pH. A seguir, foi analisada a dureza de superfície final (DS₂) para o cálculo da porcentagem da perda de dureza de superfície (%PDS). Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA e Bonferroni ou Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$). Os resultados mostraram que a adição de clorexidina aumentou a ação antimicrobiana dos CIV. As propriedades físico-mecânicas dos CIV foram afetadas pela associação de CHX e TMP após 24 horas da confecção dos corpos-de-prova, entretanto, aos 7 dias, houve aumento nestas propriedades. Os valores totais de liberação de F e TMP dos cimentos não foram afetados pela incorporação de CHX. Os blocos de esmalte dos grupos contendo TMP 14%, independente da concentração de CHX, apresentaram as menores perdas de dureza de superfície. Conclui-se que o CIV associado com CHX 1,25% e TMP 14% apresentou os resultados mais promissores, apresentando efeito positivo na desmineralização, na atividade antimicrobiana, na liberação de flúor, com mínima redução das propriedades físico-mecânicas.

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro, fosfatos, clorexidina, ação antimicrobiana, força compressiva, resistência à tração, microdureza, fluoreto de sódio.

Introdução

Nos últimos anos, a Odontologia vem buscando por técnicas e materiais que possibilitem a ausência ou a mínima remoção de esmalte e/ou dentina cariados, a fim de conservar o remanescente dentário e evitar danos pulpares. Assim, diferentes alternativas restauradoras como o selamento de lesões de cárie em esmalte [Martignon et al., 2006; Bakhshandeh et al., 2012; Ekstrand et al., 2012] ou ainda a remoção parcial de cárie em dentina [Casagrande et al., 2009; Duque et al., 2009; Castilho et al., 2013] tem surgido. Entretanto, esse resíduo cariogênico poderia contribuir para uma adesão inadequada do material restaurador no ângulo cavo superficial e resultar em formação de *gaps* marginais. Esse espaço entre material e restauração leva à maior retenção do biofilme dental ou facilita a passagem de nutrientes para as bactérias remanescentes do processo carioso, possibilitando sua sobrevivência [Kemoli e Van Amerongen, 2011]. Dessa forma, é necessário o estudo de materiais odontológicos com propriedades antimicrobianas, que atuem sobre a microbiota remanescente e no ingresso de novos microrganismos na interface dente-restauração, e propriedades anticariogênicas, que promovam a remineralização e previnam o desenvolvimento de cárie secundária.

Atualmente, os materiais com ação anticárie são os que apresentam e liberam fluoreto, cálcio ou fosfato para o meio bucal. Dentre os materiais mais utilizados por sua ação anticárie é o cimento de ionômero de vidro (CIV) que se destaca pela prevenção da desmineralização e promoção da remineralização de esmalte e dentina e na inibição do crescimento de bactérias causadoras da cárie dentária [Ten Cate e van Duinen, 1995, Forsten, 1998]. Essas qualidades foram atribuídas à liberação do flúor, que é depositado nos tecidos dentários ao redor da restauração, tornando-os mais resistentes ao ataque ácido. Apesar de existirem diferenças no padrão de liberação de flúor entre cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificados por resina [Gao e Smales, 2001], uma característica comum é o fato da maior liberação de flúor ocorrer nas primeiras 24 horas e cair rapidamente nas duas semanas subsequentes e se estabilizar após 5-6 semanas [Forss, 1993; de Araujo et al., 1996; Yip et al., 1999]. Entretanto, em longo prazo seria interessante manter essa propriedade anticariogênica dos CIV, fornecendo íons que participassem do processo desmineralização-remineralização e promovessem a saturação mineral do esmalte/dentina, como os fosfatos inorgânicos.

A associação de fosfatos à redução da cárie dentária teve início na década de 60 [Nizel e Harris, 1964; Harris et al., 1967; Gonzalez, 1973], quando foram adicionados em dietas [Harris et al., 1967; Henry e Navia, 1969], gomas de mascar [Finn et al., 1978; Vogel et al., 2000] e mais tarde em dentifrícios [Städtler et al., 1996; Takeshita et al., 2009]. Os fosfatos têm uma grande afinidade pela hidroxiapatita (HA) impedindo o desprendimento de íons e reduzindo a área de superfície disponível para dissolução [Barbour et al., 2008]. Isto produz um efeito anticárie no esmalte [Städtler et al., 1996; Takeshita et al., 2009, Takeshita et al., 2011]. O TMP (trimetafosfato de sódio) é um fosfato de cadeia cíclica condensada onde sua propriedade de ligação com a HA é menor do que os polifosfatos, porém o mesmo permanece ligado ao esmalte por um maior período de tempo, apresentando superior efeito anticárie devido à baixa habilidade de causar desagregação de microcristais de HA, ao mesmo tempo exercendo efeitos comparáveis a outros polifosfatos [McGaughey e Stowell, 1977]. Além disso, o uso de fosfatos inorgânicos tem mostrado aumentar o potencial anticárie do fluoreto [Takeshita et al., 2009; Danelon et al., 2014; Pancote et al., 2014, Manarelli et al., 2011, 2013, 2014]. Em estudo *in vitro*, diferentes concentrações de TMP foram adicionadas a uma resina composta observando um melhor efeito anticárie para 14,1% de TMP associado ao fluoreto. Estes resultados estiveram relacionados a uma maior capacidade do material em liberar flúor e TMP com pouca alteração na dureza da resina [Tiveron et al., 2013].

Além da ação anticárie, uma proposta para aumentar a longevidade da restauração é a adição de um componente antimicrobiano ao CIV, como a clorexidina, que auxiliaria na redução/eliminação da microbiota remanescente e no controle do biofilme adjacente à restauração. A clorexidina tem mostrado aumentar o efeito antibacteriano *in vitro* quando associada aos CIV [Takahashi et al., 2006; Turkun et al., 2008]. Em estudo *in vitro / in vivo*, Castilho et al. [2013] incorporaram digluconato de clorexidina a 1.25% a um CIV modificado por resina para forramento e verificaram não haver alteração das propriedades mecânicas do cimento e demonstraram eliminação completa de estreptococos grupo mutans após três meses da remoção parcial de cárie em crianças. Entretanto, outros estudos mostraram que algumas formas e concentrações de clorexidina podem alterar as propriedades mecânicas do cimento [Jedrychowski et al., 1983, Palmer et al., 2004; Botelho et al., 2004, Turkun et al., 2008].

Uma maneira de diminuir o impacto da incorporação de agentes antimicrobianos nas propriedades mecânicas do cimento de ionômero de vidro seria reduzir o tamanho das partículas, tornando-as nanopartículas. Ainda não existem trabalhos associando nanopartículas de TMP e clorexidina com cimento de ionômero de vidro. O único estudo encontrado com fosfato inorgânico e clorexidina foi desenvolvido por Cheng et al. [2012]. Esses autores desenvolveram nanocompósitos contendo nanopartículas de fluoreto de cálcio e fosfato de cálcio amorfo (ACP) e partículas pequenas de clorexidina e observaram que estes afetaram a atividade metabólica do biofilme, a produção de ácidos pelos microrganismos, sem interferir nas propriedades mecânicas quando comparado a um compósito sem flúor e um CIVMR. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar se a incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio e clorexidina aumentam a ação antimicrobiana e a capacidade de reduzir a desmineralização do esmalte, sem interferir nas propriedades físico-mecânicas de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina indicado para restauração dentária.

Materiais e Métodos

Síntese e caracterização das nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMP) (ANEXO C)

A moagem do trimetafosfato de sódio (TMP – Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O TMP foi primeiramente pesado na quantidade necessária para o estudo, e a seguir, armazenado em frascos de polietileno. Bolas de zircônia foram adicionadas ao TMP em associação com isopropanol até recobrir as bolas. Os frascos foram vedados com veda rosca, na rosca da tampa do frasco de polietileno. Em seguida, os frascos foram levados ao moinho de bolas sendo submetidos à moagem por 48 horas [Danelon et al., 2014].

Após o TMP ter sido submetido ao processo de moagem, o mesmo foi submetido à filtração em peneiras granulométricas para a sua separação das bolas de zircônia. O frasco de polietileno contendo o TMP foi lavado com isopropanol e o material filtrado será vedado com papel alumínio e submetido à secagem em estufa a temperatura de 85°C para evaporação do solvente (isopropanol). Após a secagem do

TMP, o mesmo foi submetido à trituração até atingir partículas com diâmetro médio de 22,7nm, em almofariz de ágata, pesado e armazenado em frasco de polietileno. A difração de raios-X foi utilizada para a identificação da estrutura cristalina e para estimativa do tamanho médio de TMP moído por 48 horas.

Preparo do cimento de ionômero de vidro (CIV) (ANEXO D)

O cimento de ionômero de vidro modificado por resina utilizado para os experimentos laboratoriais foi o Fuji II LC (GC America, USA). TMP e diacetato de clorexidina (CHX) (Sigma-Aldrich), foram inseridos no pó do CIV em concentrações definidas, conforme mostra a Tabela 1. As concentrações de TMP foram escolhidas baseadas nos resultados obtidos por Tiveron et al. [2013] e as de clorexidina conforme resultados de Türkün et al., [2008]. Para a mistura de cada concentração de TMP e CHX foi utilizado um frasco de 5g do pó do CIV, descontando-se as quantidades em miligramas desses agentes da quantidade de pó do CIV, para manter a proporção pó-líquido indicada pelo fabricante (3,2g pó para 1,0g de líquido). Os espécimes de CIV foram fotoativados (Blue Light Star II, Microdont) com 1000 mW/cm² de intensidade de luz por 40 segundos.

Avaliação das propriedades microbiológicas dos CIV

Teste de difusão em ágar (ANEXO E)

Os ensaios foram realizados com as espécies *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus acidophilus* (IAL#523), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102) e *Candida albicans* (ATCC 6093) que foram reativadas, a partir das suas culturas originais, em placas de BHI-Ágar (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Detroit, MI) e incubadas a 37° C para *S. mutans*, *L. acidophilus* e *A. israelii* em estufa a 5% CO₂ e em aerobiose para *C. albicans* por 24 a 48h. Em seguida, 5 colônias de cada cepa foram inseridas em caldo BHI individualmente e incubadas a 37°C por 18 a 24 h. Os procedimentos foram seguidos a partir da metodologia do teste de difusão em ágar descrita por Duque et al. (2005). Uma alíquota de 300µL de cada suspensão bacteriana (D.O de 0,5; A_{550nm}) foi homogeneizada com 15 mL de BHI-A a 45° C. Após a secagem do meio de cultura, cilindros de plástico com 3 mm de diâmetro devidamente desinfetados foram utilizados para confeccionar poços no ágar (n = 10). Os CIVs foram manipulados com ou sem CHX e TMP e de acordo com as instruções do fabricante, e foram inseridos nos poços, preenchendo-os até a borda com auxílio

de uma seringa Centrix e fotopolimerizadas (Blue Star II – Microdont). As concentrações de CHX incorporadas aos cimentos foram de 1,25 e 2,5% [Castilho et al., 2013; Turkun et al., 2008].

Para cada experimento, também foram utilizados como controle positivo CHX a 2% e como controle negativo, poços sem nenhum material. As placas foram mantidas por 2h na temperatura ambiente para permitir a difusão dos cimentos e incubadas a 37° C por 24h. Duas medidas de cada halo de inibição foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital e as médias calculadas. Os testes foram realizados em triplicata.

Avaliação das propriedades físico-mecânicas dos CIV

Avaliação da resistência à compressão (ANEXO F)

Doze corpos-de-prova foram confeccionados utilizando matrizes padronizadas com 2 mm de diâmetro x 4 mm de altura de acordo com as especificações da ISO 9917-1. Após os períodos de armazenamento (como descrito anteriormente), os espécimes foram submetidos ao ensaio de resistência à compressão em máquina de ensaio universal Instron, a uma velocidade de 1mm/min, em posição vertical, até que ocorresse a fratura. Os valores obtidos nos testes de compressão foram calculados (kgf/cm^2) dividindo a força pela área e convertidos em MPa.

Avaliação da resistência à tração diametral (ANEXO G)

Doze corpos-de-prova foram confeccionados por meio de matrizes padronizadas com 6 mm de diâmetro x 3 mm de altura, de acordo com as especificações da ISO 9917-1. Após os períodos de 24h e 7 dias de armazenamento em estufa a 37°C em umidade relativa, os espécimes foram submetidos ao ensaio de resistência à tração diametral (TD), a uma velocidade de 1 mm/min, em posição horizontal, até que ocorresse a fratura. Para tanto, foi utilizada uma máquina de ensaio universal Instron (DL3000, Instron Co., Canton, MA, USA). Os valores de tração diametral (kgf/cm^2) foram calculados usando a equação: $TD=2Fr/\pi DT$, onde Fr é a força, D é o diâmetro e T é a altura do espécime e convertidos em MPa.

Avaliação da dureza de superfície do material (ANEXO H)

Seis corpos-de-prova dos CIV (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura), mantidos 24h ou 7 dias em recipiente plástico e em ambiente com umidade relativa e à 37°C, foram submetidos ao teste de dureza de superfície. Este foi determinado utilizando microdurômetro (Micromet 5114 hardness tester, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos da América), sob carga estática (Knoop) de 100 gramas e tempo de 10 segundos. Foram realizadas 5 impressões na superfície de topo do material distantes 500µm entre si (Silva et al., 2007). A seguir, os corpos-de-prova foram armazenados em estufa a 37°C (100 % umidade) e em 7 dias foi repetido o teste da dureza.

Liberação de fluoreto (F) e TMP dos CIV

Confecção dos corpos-de-prova (ANEXO I)

Seis corpos-de-prova de cada material (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) foram confeccionados em matrizes metálicas. A fotoativação foi realizada com 1000 mW/cm² de intensidade de luz por 40 segundos, nas superfícies superior e inferior do corpo-de-prova (fotopolimerizador Blue Light Star II - Microdont).

Ciclagem de pH para liberação de F e TMP dos CIV (ANEXO I)

Os corpos-de-prova de cada material foram colocados em tubos de ensaio de polipropileno com tampa, suspensos por um fio de aço inoxidável. Cada tubo continha 2 mL da solução de desmineralização (DES) ou de remineralização (RE) (Silva et al., 2007). Inicialmente, os corpos-de-prova foram armazenados 6 horas em solução DES (Ca e P 2,0 mmol/L em tampão acetato 0,075 mol/L, em pH 4,7). Em seguida, as amostras foram transferidas para novos tubos contendo solução RE (Ca 1,5 mmol/L, P 0,9 mmol/L, KCl 0,15 mol/L em tampão cacodilato 0,02 mol/L, em pH 7,0) permanecendo por 18 horas. Os tubos foram deixados sob agitação constante (mesa agitadora TE-420 Orbital - Tecnal), à temperatura de 37°C. Estes procedimentos foram repetidos durante 15 dias. Os corpos-de-prova foram lavados com água deionizada e secos com papel absorvente antes de serem imersos em nova solução. As soluções foram recolhidas diariamente, identificadas e armazenadas em tubos de ensaio de polipropileno a 4°C para leitura do F e TMP liberado.

Análise de F e TMP nas soluções DES e RE

Para a dosagem de F das soluções DES e RE, o eletrodo específico combinado para íon fluoreto (9609 BN, Orion Research, Inc., Beverly, MA, EUA) foi calibrado com soluções padrão de 1, 3, 6, 12 e 24 $\mu\text{g F/mL}$. Para as dosagens foram pipetadas 0,5 mL das soluções DES e RE e acrescido 0,5 mL de TISAB II (Tampão ajustador de força iônica total). As leituras foram realizadas sob agitação constante em agitador magnético (TE-081, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Esses valores foram convertidos para $\mu\text{g/cm}^2$ (**ANEXO J**).

O TMP liberado pelos materiais foi dosado após hidrólise em meio ácido seguido da determinação do fósforo (P) liberado. Para isto, alíquotas de 0,2 mL das soluções DES e RE foram acrescidas de 0,2 mL de ácido clorídrico (HCl) a 1,0 mol/L e aquecidas em banho fervente, a 100°C, por 1 hora. Após a hidrólise, a concentração de P nas soluções foi determinada pelo método colorimétrico (Fiske & Subbarow., 1925), em placas de 96 poços (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo 92096 - TPP, Suíça). Alíquotas de 0,02 mL das soluções DES e RE foram utilizadas para as leituras em leitor de placas (PowerWave 340, Biotek), no comprimento de onda de 660nm .

A concentração de P determinada nas soluções DES e RE após hidrólise ácida foi subtraída da quantidade de fósforo existente nas soluções DES ($57,5 \pm 7,6 \mu\text{g P/mL}$) e RE ($26,9 \pm 2,7 \mu\text{g P/mL}$) e o valor final considerado como a proveniente de TMP presente nas soluções. Esses valores foram convertidos para $\mu\text{g/cm}^2$ (**ANEXO K**). As concentrações de F e TMP das soluções DES e RE foram determinadas separadamente. Posteriormente, os resultados das soluções DES e RE foram somados (DES + RE), completando um período de 24 horas e um ciclo da metodologia utilizada (ciclagem de pH), nos 15 dias analisados.

Avaliação da capacidade dos CIV em reduzir a desmineralização de esmalte

Preparo dos corpos-de-prova (ANEXO L)

Inicialmente, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) protocolo FOA-00884-2013 (**ANEXO B**). Blocos de esmalte (4x4x3mm) foram obtidos de incisivos bovinos e a superfície de dentina foi planificada utilizando uma lixa de granulação de 320, e a superfície de esmalte foram planificadas com as lixas de granulação 600, 800 e 1200, carga de 4 libras, sob refrigeração a água e polidas com feltro (Polishing Cloth Buehler 40-7618, Buehler, Lake Bluff, IL,

USA) e suspensão de diamante (Metadi Monocrystalline Diamond Suspension, 1 micron, Blue Color Polish Spray, Water Base 40-6530 – Buehler, Lake Bluff, IL, USA), com carga de 4 libras. O desgaste resultou na remoção de aproximadamente 120 µm em profundidade do esmalte. Após o polimento, secções transversais foram realizadas a uma distância de 1mm da borda do bloco, em cortadeira sob refrigeração de água deionizada, obtendo-se blocos com 4x3x3mm.

Ciclagem de pH (ANEXO M)

Oito corpos-de-prova de cada material (3x2x1mm) foram justapostos às bordas seccionadas dos blocos de esmalte e fixados com auxílio de cera pegajosa. Os conjuntos blocos/corpos-de-prova foram submetidos a cinco ciclagens de pH, a uma temperatura de 37°C, sendo imersos nas soluções de desmineralização – DES (6 horas – Ca e P 2,0 mmol/L em tampão acetato 0,075 mol/L, 0,04 ppm F em pH 4,7 - 2,2 mL/mm²) e remineralização - RE (18 horas – Ca 1,5 mmol/L, P 0,9 mmol/L, KCl 0,15 mol/L em tampão cacodilato 0,02 mol/L, 0,05 ppm F em pH 7,0 – 1,1 mL/mm²).

Os blocos foram lavados com jatos de água deionizada por 30 segundos, após remoção das soluções DES e RE. Decorrido o 5º dia, a solução RE foi trocada, e os blocos permanecem nesta solução por 48 horas (Rodrigues et al., 2008; Vieira et al., 2005)

Avaliação da dureza do esmalte (ANEXO N)

Para o teste de dureza superfície inicial (DS₁) será utilizado o microdurômetro Buehler (Lake Bluff, USA and Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos [Argenta et al., 2003]. Serão realizadas 5 impressões no esmalte separadas entre si por uma distância de 100µm e a uma distância de 300µm da borda seccionada [Rodrigues et al., 2008], sendo selecionados para os grupos de estudo mais o grupo placebo 80 blocos de esmalte com dureza de superfície de 320 a 380kgf/mm².

Concluída a ciclagem de pH, os materiais unidos aos blocos de esmalte foram removidos, e os blocos submetidos ao teste de dureza de superfície final (DS₂), utilizando a mesma metodologia do teste de DS₁, para o cálculo da porcentagem de perda da dureza de superfície (%PDS=[[DS₂ – DS₁]/DS₁] \times 100).

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente considerando como fator de variação os materiais, e as variáveis, mensuração dos halos de inibição, da força de resistência à compressão e de resistência à tração diametral (MPa), dureza superficial dos materiais (KHN), concentração de F ($\mu\text{g F/cm}^2$) e TMP ($\mu\text{g P/cm}^2$) liberados nas soluções DES e RE e os valores de %PDS (perda da dureza de superfície) do esmalte bovino. Todos os dados apresentaram distribuição normal (Kolmogorov–Smirnov) e homocedasticidade (Teste de Cochran). Estas variáveis foram submetidas à análise de variância (2-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou teste de múltipla comparação de Student-Newman-Keuls. O programa BioStat 5.0 e SPSS versão 17.1 foram utilizados para as análises estatísticas, considerando nível de significância de 5%.

Resultados

Para a avaliação das propriedades microbiológicas dos CIV as Figuras 1 a 4 mostram as médias/desvio-padrão das medidas dos halos de inibição obtidos para os CIV testados. Para todos os microrganismos testados, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. israelii* e *C. albicans*, houve aumento significativo na ação inibitória do CIV quando incorporada CHX, independente da concentração (1,25 ou 2,5%). A presença de TMP, nas concentrações 7 ou 14%, não comprometeu a ação antimicrobiana da clorexidina. TMP não teve ação antimicrobiana quando incorporado isoladamente no CIV.

Na avaliação das propriedades físico-mecânicas dos CIV os grupos de CIV contendo ou não TMP e CHX foram avaliados quanto aos testes mecânicos de resistência à compressão, à tração diametral e dureza de superfície após 24h e 7 dias de armazenamento dos espécimes em umidade relativa.

A Figura 5 mostra os resultados obtidos para o teste de compressão. Após 24h, pôde-se notar redução nesta propriedade mecânica após a inclusão de TMP, independente da concentração, sendo que a associação de CHX 2,5% e TMP 14% foi a que mais afetou a resistência a compressão do CIV. Em 7 dias, houve um aumento na resistência a compressão para todos os grupos de materiais, notando-se que a associação de CHX 1,25 com TMP 7% apresentou resultados semelhantes ao controle CIV e CIV com CHX 1,25%. A associação de CHX 1,25% e TMP 14% teve

efeito semelhante às demais associações duplas, com exceção da associação de CHX 2,5% e TMP 14%. Entretanto, esse grupo de materiais recuperou sua resistência à compressão mostrando resultados similares aos demais grupos em 7 dias.

A Figura 6 mostra os resultados obtidos para os testes de resistência à tração diametral. Os grupos contendo somente CHX não diferiram do controle CIV, independente do tempo avaliado. Os demais grupos diferiram do controle, para ambos os tempos, com exceção de CIV + TMP 7% para 24h e 7 dias e CIV + CHX 1,25% + TMP 7% para 7 dias. Em 7 dias, houve um aumento na resistência à tração diametral, embora não significativo para todos os grupos. Os resultados obtidos por todos os grupos foram inferiores ao controle CIV, embora similares entre os grupos de associações, mostrando que a concentração de CHX ou de TMP não influenciou na resistência à tração diametral.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos para o teste de dureza superficial dos CIV testados. Após 24h de armazenamento, todos os grupos diferiram do controle CIV. A partir da associação de CHX 2,5% não houve diferença entre os grupos de associações, mostrando que independente da concentração de TMP e CHX, quando estes estão associados no CIV há uma redução da dureza superficial. O mesmo foi observado em 7 dias. Somente o grupo controle e os grupos de CHX 2,5%, TMP 7% e TMP 14% apresentaram aumento significativo na dureza de 24h para 7 dias de armazenamento.

A Figura 8 mostra os resultados de liberação de fluoreto dos CIV. Os maiores valores ocorreram no primeiro dia em todos os grupos. A média do fluoreto total liberado durante os 15 dias foi maior nos grupos de CIV associado ao TMP 14% seguido do TMP 7%. A partir do quarto dia todos os grupos apresentaram liberação constante. A associação de CHX e TMP concomitantes não interferiu na liberação de fluoreto pelos CIV. A maior liberação de F foi observada no grupo CIV + CHX 1,25% + TMP 14% .

A Figura 9 mostra os resultados de liberação de fósforo (TMP) dos CIV. Os maiores valores ocorreram no primeiro dia em todos os grupos. Houve um aumento gradativo na liberação de TMP dos CIV a partir da associação de CIV com TMP 7%, independente da concentração de CHX. Os maiores valores de liberação de TMP foram observados para os grupos TMP 14% isolado ou associado com CHX 2,5%.

Para a avaliação da capacidade dos CIV em reduzir desmineralização de esmalte na Figura 10 mostra a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) observada nos espécimes de esmalte bovino, após ciclagem de pH e na presença dos grupos de CIV justapostos. Pode-se notar que a menor perda de dureza foi apresentada pelos grupos apresentando TMP 14% e a concentração de CHX não interferiu na capacidade de reduzir a desmineralização do CIV. Os demais grupos foram semelhantes ao grupo controle CIV.

Discussão

Lesões de cárie secundária são consideradas como o principal motivo de falhas nas restaurações com materiais adesivos, entre eles, os cimentos de ionômero de vidro. Isso ocorre mais comumente na interface entre a restauração e a cavidade preparada. Com a tendência da realização de abordagens mais conservadoras para a remoção de lesões de cárie, bactérias remanescentes permanecem no tecido afetado e poderiam contribuir também para o desenvolvimento de cárie recorrente [Farrugia e Camilleri, 2015]. Assim, a introdução de agentes antimicrobianos em materiais restauradores poderiam auxiliar na prevenção da colonização de microrganismos na interface dente-restauração provenientes tanto da cavidade bucal quanto do próprio dente, após procedimentos de remoção parcial de cárie [Imazato, 2003].

Diversas tentativas de inclusão de agentes antimicrobianos, em especial a clorexidina, em cimentos de ionômero de vidro têm sido relatadas na literatura [Jedrychowski et al., 1983; Palmer et al., 2004; Botelho et al., 2004, Takahashi et al., 2006; Turkun et al., 2008; Castilho et al., 2013]. Todas as formas de clorexidina, incluindo acetato, diacetato, digluconato e hidrocloreto, mostraram aumentar a atividade antibacteriana dos materiais contra bactérias cariogênicas. No presente estudo foi escolhido o diacetato de clorexidina por sua apresentação em pó e a facilidade de inserção (pelo peso) no pó do cimento de ionômero de vidro. Além disso, estudos têm demonstrado ótimas propriedades antibacterianas, físicas e de adesão de cimento de ionômero de vidro contendo diacetato de clorexidina [Takahashi et al., 2006; Turkun et al., 2008]. Este estudo mostrou que a adição de clorexidina aumentou a atividade inibitória do cimento de ionômero de vidro frente a microrganismos relacionado com o processo de cárie, como *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. israelii* e *C.*

albicans. Não houve diferença entre as concentrações testadas quanto à atividade antimicrobiana, demonstrando que a incorporação de 1,25% no cimento teve o efeito esperado, pelo menos, em curto prazo (24h). A utilização de concentração mais baixa desse agente antimicrobiano é interessante pelo potencial citotóxico da clorexidina [Castilho et al., 2013; Lessa et al., 2010], além da possível influência nas propriedades mecânicas do cimento quando em maior concentração [Jedrychowski et al., 1983; Turkun et al., 2008, Marti et al., 2014]. Este estudo também demonstrou que a associação de clorexidina a 1,25% causou prejuízo às propriedades mecânicas testadas, nos tempos 24h e 7 dias. O mesmo não foi verificado para a concentração de 2,5% de clorexidina que afetou principalmente a resistência à compressão e a dureza do material.

Além da ação antimicrobiana, seria interessante aumentar o poder anticárie do cimento de ionômero de vidro, que já dispõe da capacidade remineralizadora resultante da presença do íon fluoreto em sua formulação. Estudos recentes demonstraram um aumento na capacidade de redução da perda mineral e da remineralização do esmalte quando o fosfato inorgânico, trimetafosfato de sódio (TMP), foi associado ao fluoreto em dentifrícios [Takeshita et al., 2009], géis [Danelon et al., 2014; Pancote et al., 2014], colutórios [Manarelli et al., 2011] ou vernizes [Manarelli et al., 2013, 2014]. Recentemente, estudos mostraram similar efeito sinérgico entre TMP e o fluoreto na redução da desmineralização e indução da remineralização quando associados à resina composta [Tiveron et al., 2013; 2015], embora concentrações acima de 14% de TMP afetaram a dureza do material. No presente estudo, a incorporação de TMP no cimento de ionômero de vidro afetou as propriedades físico-mecânicas do material, principalmente na concentração de 14%. Entretanto, para ambas as concentrações de TMP incorporadas no CIV foi verificado aumento nestas propriedades de 24h para 7 dias, semelhante ao que ocorreu para o cimento controle. Outros fosfatos também estão sendo inseridos em cimento de ionômero de vidro, como o fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) e mostraram aumento na remineralização do esmalte na área adjacente à restauração após ciclagem de pH e redução da resistência à compressão, tração diametral e prolongamento do tempo de cura do cimento [Al Zraikat et al., 2011]. A inclusão de diferentes componentes ao cimento de ionômero de vidro poderia interferir na reação do ácido poliacrílico e das partículas de vidro. Além disso,

pequenas alterações na proporção pó-líquido também poderiam afetar as propriedades físico-mecânicas do material [Crisp et al., 1976; Billington et al., 1990].

Neste estudo, optou-se por incorporar dois agentes simultaneamente no cimento de ionômero de vidro, a clorexidina e o TMP, com o objetivo clínico futuro de suprimir a infecção residual e aumentar a longevidade da restauração em abordagens minimamente invasivas. Foi verificado que a presença de TMP não interferiu na atividade antimicrobiana da clorexidina e o mesmo foi observado pela clorexidina em relação à redução de desmineralização do esmalte pelo TMP, que obteve seus melhores resultados com a concentração 14%. A inclusão simultânea desses agentes no cimento não teve efeito negativo sobre as propriedades mecânicas do material quando comparado aos cimentos contendo somente TMP nas concentrações correspondentes 7 ou 14%, com exceção da combinação CHX 2,5% e TMP 14% para os testes de resistência à compressão para o tempo de 24h. Essa combinação foi mais prejudicial para as propriedades mecânicas do material possivelmente pela maior incorporação de TMP e CHX no pó do material e a maior alteração na composição do pó do cimento de ionômero. Sendo assim, embora as propriedades mecânicas dos cimentos de ionômero de vidro possam ter sido alteradas pela incorporação de TMP ou CHX, a inclusão de ambos os agentes não aumentou significativamente esse efeito deletério sobre o material.

Em relação à liberação de flúor pelos cimentos de ionômero de vidro, houve um aumento significativo com a inclusão de TMP, demonstrando o mesmo efeito observado quando inserido em outros veículos, como dentifrícios, colutórios, vernizes, géis e até resina composta [Takeshita et al., 2009, Manarelli et al., 2011; Manarelli et al., 2013, 2014; Danelon et al., 2014; Pancote et al., 2014; Tiveron et al., 2013.]. O grupo de cimento de ionômero de vidro combinado com CHX 1,25% e TMP 14% apresentou a maior liberação de flúor, praticamente o dobro observado pelo grupo controle. Os cimentos de ionômero de vidro liberam níveis mais elevados de fluoreto nas primeiras 24 horas, diminuindo rapidamente esta liberação nos dias subsequentes [Pedrini et al., 2003; Silva et al., 2007]. Esta maior disponibilidade de fluoreto no meio mostrou um efeito na redução da desmineralização do esmalte, já que os grupos que apresentaram melhores efeitos anticárie foram aqueles que apresentaram maior liberação de flúor. O mesmo foi observado para a liberação de fósforo (TMP) dos materiais, que foi crescente a partir da incorporação isolada TMP 7%, com exceção para o grupo CIV + CHX 1,25% + TMP 14%, que teve liberação de

fósforo semelhante ao grupo com CHX 2,5% e TMP 7%. Essa variação não afetou a capacidade de prevenir a desmineralização deste grupo, que teve valores semelhantes aos outros dois grupos com TMP 14%. Estudos têm mostrado que TMP e fluoreto podem agir independentemente e simultaneamente no processo de desmineralização do esmalte [Takeshita et al., 2011; Danelon et al., 2014]. Neste presente estudo, para que a proporção pó-líquido do material pudesse ser mantida, a quantidade de pó do cimento correspondente àquela que foi inserida dos sais de clorexidina e/ou TMP foi retirada e possivelmente componentes do pó foram reduzidos, inclusive o fluoreto. Entretanto, não houve influência na capacidade de reduzir a desmineralização comparando-se os grupos contendo TMP 14% isolado ou com clorexidina nas duas concentrações. O TMP devido à sua conformação cíclica permanece aderido ao esmalte por um período mais longo que os polifosfatos lineares. Isso poderia explicar o efeito inibitório do TMP sobre a desmineralização, mesmo isolado ou na presença de baixas concentrações de fluoreto.

O único estudo encontrado na literatura que associou fosfato inorgânico e clorexidina foi desenvolvido por Cheng et al. [2012]. Nossos resultados corroboram com os obtidos por Cheng et al. [2012], respeitando o fato de que os próprios agentes anticárie (CaF_2 e ACP) e a metodologia empregada são diferentes da utilizada no presente estudo, incluindo outros testes mecânicos (módulo de elasticidade e resistência flexural) e outras análises microbiológicas. Neste presente estudo, optou-se pela utilização de nanopartículas de TMP com a intenção de reduzir a interferência da incorporação desse fosfato nas propriedades físico-mecânicas e microbiológicas do CIV, como ocorreu em estudo desenvolvido com outro fosfato inorgânico, o hexametáfosfato, também em escala nanométrica associado com CHX que manteve a ação antimicrobiana de ambos os agentes sem alterar significativamente a resistência à tração diametral de CIV [Hook et al., 2014]. Nosso estudo não utilizou partículas reduzidas de clorexidina, como no estudo de Cheng et al. (2012), pois em estudo piloto não foi verificada diferença estatística entre as propriedades mecânicas e microbiológicas do CIV contendo CHX microparticulada ou não [Silva et al., 2014].

Conclusão

O cimento de ionômero de vidro associado com CHX 1,25% e TMP 14% apresentou os resultados mais promissores, apresentando efeito positivo na

desmineralização, aumento da atividade antimicrobiana, na liberação de flúor, causando mínima redução nas propriedades físico-mecânicas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela disposição da bolsa de Mestrado para realização deste trabalho, processo nº. 130717/2013-4. A Agência UNESP de Inovação (AUIN) pelo auxílio-pesquisa concedido, processo 2173/2013.

Referências

Al Zraikat H, Palamara JE, Messer HH, Burrow MF, Reynolds EC. The incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass ionomer cement. *Dent Mater* 2011;27:235-43.

Araujo FB, García-Godoy F, Cury JA, Conceição EN. Fluoride release from fluoride-containing materials. *Oper Dent.*;1996;21(5):185-90.

Argenta RM, Tabchoury CP, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras.*;2003 Jul-Sep;17(3):241-6.

Bakhshandeh A, Qvist V, Ekstrand KR. Sealing occlusal caries lesions in adults referred for restorative treatment: 2-3 years of follow-up. *Clin Oral Investig.*;2012;16(2):521-9.

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. Inhibition of hydroxyapatite dissolution by whole casein: the effects of pH, protein concentration, calcium, and ionic strength. *Eur J Oral Sci* 2008;116:473-8.

Billington RW, Williams JA, Pearson GJ. Variation in powder/liquid ratio of a restorative glass-ionomer cement used in dental practice. *Br Dent J.* 1990 Sep 22;169(6):164-7.

Botelho MG. Compressive strength of glass ionomer cements with dental antibacterial agents. *SADJ* 2004;59:51–3.

Casagrande L, Falster CA, Di Hipolito V, De Góes MF, Straffon LH, Nör JE, de Araujo FB. Effect of adhesive restorations over incomplete dentin caries removal: 5-year follow-up study in primary teeth. *J Dent Child (Chic)*. 2009 May-Aug;76(2):117-22.

Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA, Spolidório DM, Puppim-Rontani RM. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent*. 2013; Feb;41(2):155-63.

Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dent Mater*. 2012 May;28(5):573-83.

Crisp S, Lewis BG, Wilson AD. Glass ionomer cements: chemistry of erosion. *J Dent Res*. 1976 Nov-Dec;55(6):1032-41.

Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig*. 2014 May;18(4):1119-27.

Duque C, Negrini T de C, Hebling J, Spolidorio DM. Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper Dent*. 2005 Sep-Oct; 30(5):636-40.

Duque C, Negrini TC, Sacomo NT, Spolidorio DMP, Costa CAS, Hebling J. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clin Oral Invest* 2009;13:465-71.

Ekstrand K, Martignon S, Bakhshandeh A, Ricketts DN. The non-operative resin treatment of proximal caries lesions. *Dent Update*. 2012 Nov;39(9):614-6, 618-20, 622.

Farrugia C, Camilleri J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review. *Dent Mater.* 2015 Apr;31(4):e89-99.

Finn SB, Frew RA, Leibowitz R, Morse W, Manson-Hing L, Brunelle J. The effect of sodium trimetaphosphate (TMP) as a chewing gum additive on caries increments in children. *J Am Dent Assoc* 1978;96:651-5.

Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* 1925;66:375-400.

Forss H. Release of fluoride and other elements from light-cured glass ionomers in neutral and acidic conditions. *J Dent Res* 1993; 72:1257–1262.

Forsten L. Fluoride release and uptake by glass-ionomers and related materials and its clinical effect. *Biomaterials* 1998;19:503–508.

Gao W, Smales RJ. Fluoride release/uptake of conventional and resin-modified glass ionomers, and compomers. *J Dent* 2001; 29:301–306.

Gonzalez M, Jeansonne BG, Feagin FF. Trimetaphosphate and fluoride actions on mineralization at the enamel-solution interface. *J Dent Res.* 1973;52(2):261-6.

Harris RS, Nizel AE, Walsh BN. The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. *J Dent Res* 1967;46:290-4.

Henry CA, Navia JM. Sodium trimetaphosphate influence on the early development of rat caries and concurrent microbial changes. *Caries Res* 1969;3:326-38.

Hook ER, Owen OJ, Bellis CA, Holder JA, O'Sullivan DJ, Barbour ME. Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. *J Nanobiotechnology.* 2014 Jan 23;12:3.

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater.* 2003 Sep;19(6):449-57.

Jedrychowski J, Caputo A, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil* 1983;10:373–81.

Kemoli AM, Van Amerongen WE. Effects of oral hygiene, residual caries and cervical marginal-gaps on the survival of proximal atraumatic restorative treatment approach restorations. *Contemp Clin Dent.* 2011; 2(4): 318–323.

Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *Journal of Applied Oral Science*, 18 (2010), pp. 50–58

Manarelli MM, Delbem ACB, Lima TMT, Castilho FCN, Pessan JP. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimeta´phosphate on enamel erosion and abrasion. *Am J Dent In Press* 2013.

Manarelli MM, Delbem ACB, Lima TMT, Castilho FCN, Pessan JP. In vitro remineralizing effect varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Caries Res* (48) 2014.

Manarelli MM, Vieira AE, Matheus AA, Sasaki KT, et al. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion, an in vitro study. *Caries Res* 2011;47 (5):532-538.

Marti LM, Mata M, Ferraz-Santos B, Azevedo ER, Giro EMA, Zuanon CC. Addition of chlorhexidine gluconate to a glass ionomer cement: a study on mechanical, physical and antibacterial properties. *Brazilian Dental Journal* 2014; 25(1):33-37.

Martignon S, Ekstrand KR, Ellwood R. Efficacy of sealing proximal early active lesions: an 18-month clinical study evaluated by conventional and subtraction radiography. *Caries Res.* 2006;40(5):382-8.

McGaughey C, Stowell EC. Effects of polyphosphates on the solubility and mineralization of HA: relevance to a rationale for anticaries activity. *J Dent Res* 1977;56(6) 579-587.

Nizel AE, Harris RS. The effects of phosphates on experimental dental caries: a literature review. *J Dent Res* 1964;43:1123-36.

Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials* 2004;25:5423–31.

Pancote LP, Manarelli MM, Danelon M, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: In vitro study. *Arch Oral Biol* 2014;59:336-340.

Pedrini D, Delbem AC, de França JG, Machado Tde M. Fluoride release by restorative materials before and after a topical application of fluoride gel. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Apr-Jun;17(2):137-41.

Rodrigues E, Delbem ACB, Pedrini D, Oliveira MSR. pH-cycling model to verify the efficacy of fluoride-releasing materials in enamel demineralization. *Oper Dent* 2008;33:658-65.

Silva KG, Pedrini D, Delbem AC, Cannon M. Microhardness and fluoride release of restorative materials in different storage media. *Braz Dent J.* 2007;18(4):309-13.

Silva KG, Pedrini D, Delbem ACB, Cannon M. Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials. *Oper Dent* 2007;32:328-35.

Silva DF, Silva MER, Paula AB, Sinhoreti MAC, Pedrini D, Delbem ACB, Duque C. Efeito da associação de micropartículas de clorexidina nas propriedades microbiológicas e mecânicas de cimento de ionômero de vidro. *Braz Oral Res* 2014;28(1):22-476.

Städtler P, Müller-Bruckschwaiger K, Schäfer F, Hunttington E. The effect of sodium trimetaphosphate on caries: a 3-year clinical toothpaste trial. *Caries Res* 1996;30:418-22

Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater* 2006;22:647-52.

Takehita EM, Castro LP, Sasaki KT & Delbem ACB. *In vitro* evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Research* 2009;43(1) 50-56.

Takehita EM, Exterkate RAM, Delbem ACB, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel De- and Remineralization in vitro. *Caries Res* 2011;45:494-7.

Ten Cate JM, van Duinen RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *J Dent Res* 1995;74:1266–1271.

Tiveron ARF, Delbem, ACB, Gaban G, Sasaki KT, Pedrini D. Effect of resin composites with sodium trimetaphosphate with or without fluoride on hardness, ion release and enamel demineralization. *Am J Dent* 2013;26:201-6.

Tiveron AR¹, Delbem AC, Gaban G, Sasaki KT, Pedrini D. *In vitro* enamel remineralization capacity of composite resins containing sodium trimetaphosphate and fluoride. *Clin Oral Investig* 2015, Jan 23.

Türkün LS, Türkün M, Ertugrul F, Ates M, Brugger S. Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent* 2008;20(1):29-40.

Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;39:514-20.

Vogel GL, Zhang Z, Carey CM, Ly A, Chow LC, Proskin HM. Composition of plaque and saliva following use of an α -tricalcium-phosphate-containing chewing gum and a subsequent challenge. *J Dent Res* 2000;79:58-62.

Yip HK, Lam WT, Smales RJ. Fluoride release, weight loss and erosive wear of modern aesthetic restoratives. *Br Dent J*, 1999;187:265–270.

LEGENDA DE TABELA

Tabela 1. Grupos de materiais do estudo.

Tabela 1. Grupos de materiais do estudo.

CIV – Cimento de Ionômero de Vidro

CHX – Clorexidina

TMP – Trimetafosfato de Sódio nanoparticulado

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| CIV | CIV + CHX 2,5%+ TMP 7% |
| CIV + CHX 1,25% | CIV + TMP 14% |
| CIV + CHX 2,5% | CIV + CHX 1,25%+ TMP 14% |
| CIV + TMP 7% | CIV + CHX 2,5%+ TMP 14% |
| CIV + CHX 1,25% + TMP 7% | |

LEGENDA DE FIGURAS

- Figura 1.** Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Streptococcus mutans*. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).
- Figura 2.** Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Lactobacillus acidophilus*. ^aLetras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).
- Figura 3.** Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Actinomyces israelii*. ^aLetras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).
- Figura 4.** Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Candida albicans*. ^aLetras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p < 0,05$).
- Figura 5.** Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de resistência à compressão para os CIV testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).
- Figura 6.** Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de resistência à tração diametral para os CIV testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).
- Figura 7.** Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de microdureza dos CIV testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p < 0,05$).
- Figura 8.** Fluoreto total liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelos CIV nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão das médias. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).
- Figura 9.** Fósforo (TMP) total liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelos CIV nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão das médias. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

Figura10. Médias das porcentagens (desvios-padrão – barras) obtidas para a perda de microdureza superficial de esmalte bovino em contato com os CIVs testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

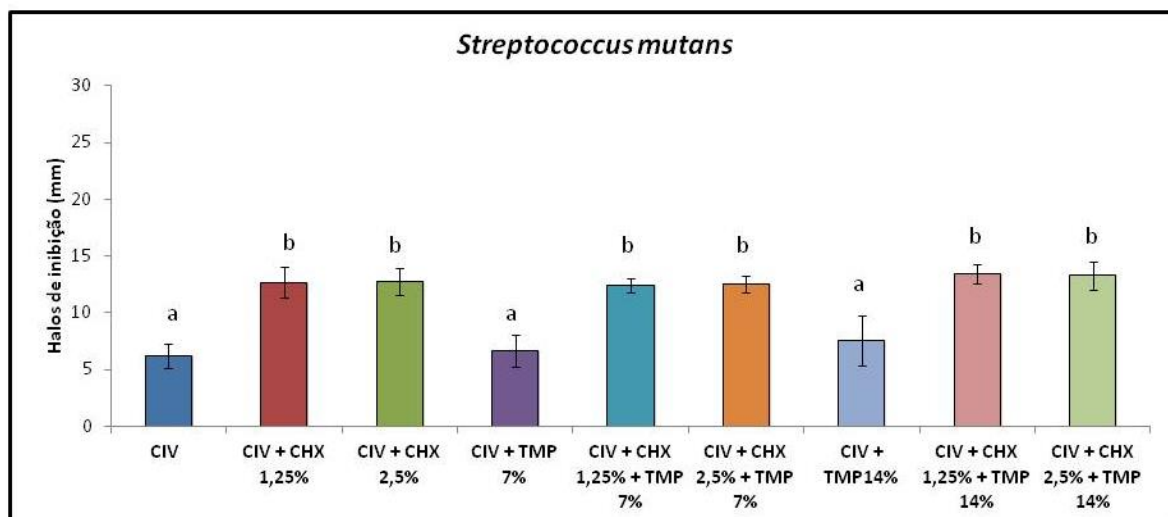


Figura 1. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Streptococcus mutans*. ^aLetras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).

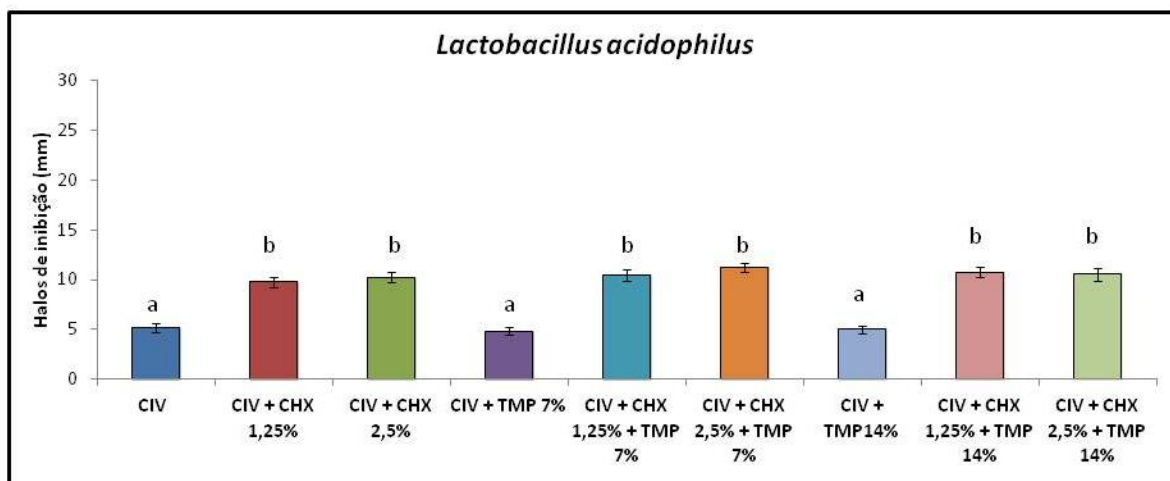


Figura 2. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Lactobacillus acidophilus*. ^aLetras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).

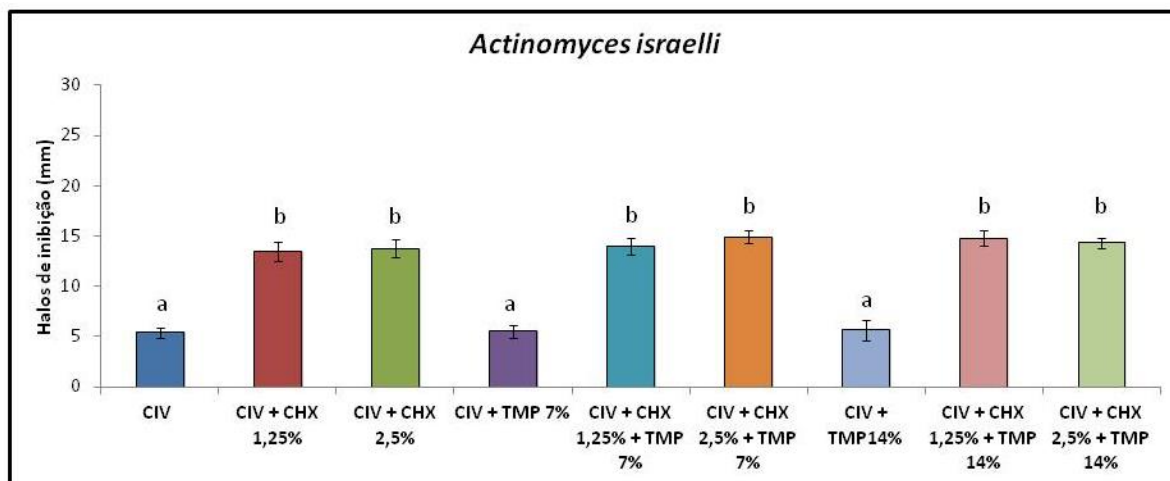


Figura 3. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Actinomyces israelii*.
^aLetras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).

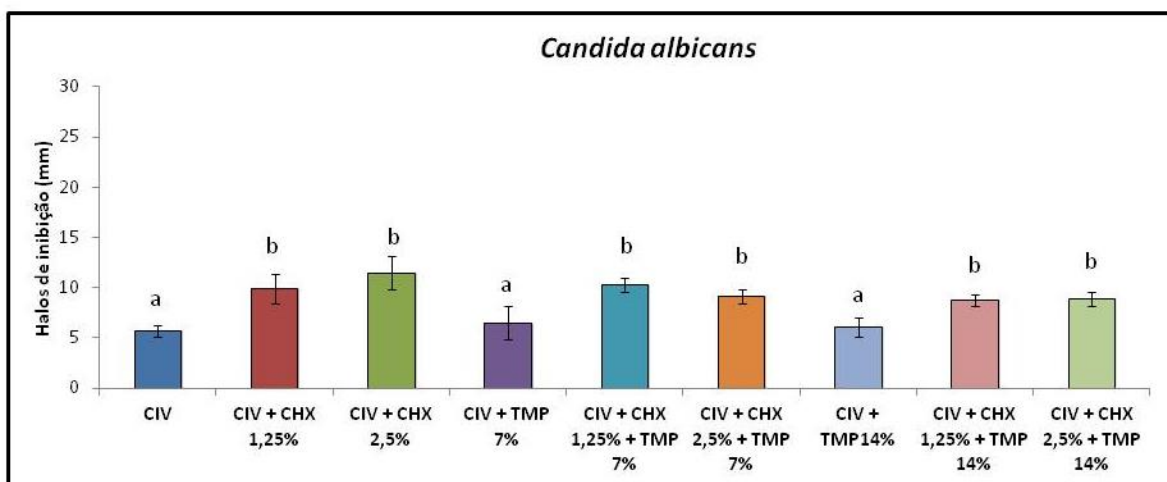


Figura 4. Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Candida albicans*.^aLetras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).

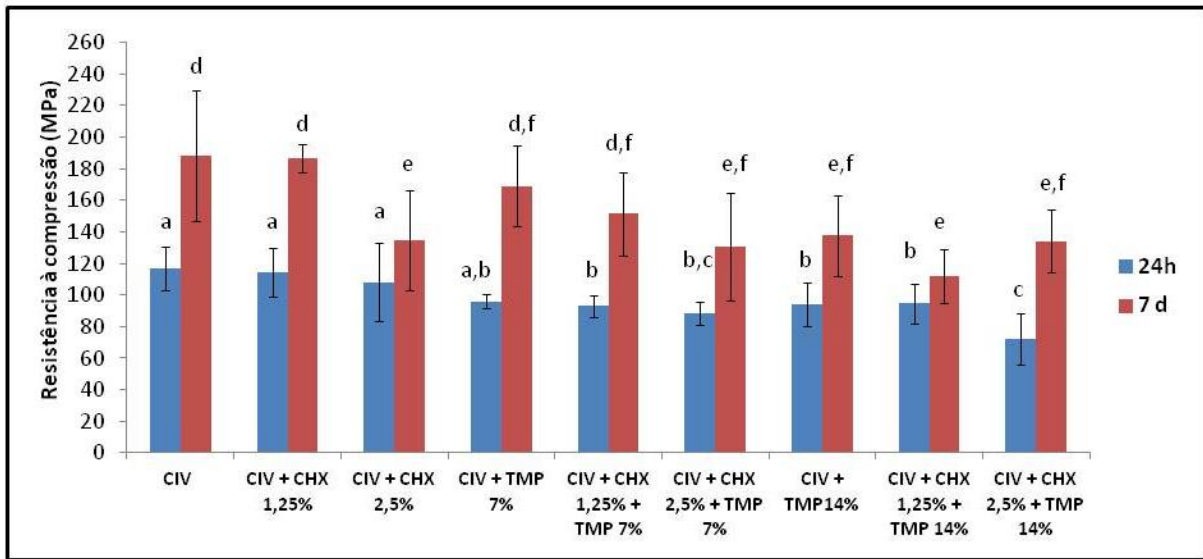


Figura 5. Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de resistência à compressão para os CIV testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e tempos de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).

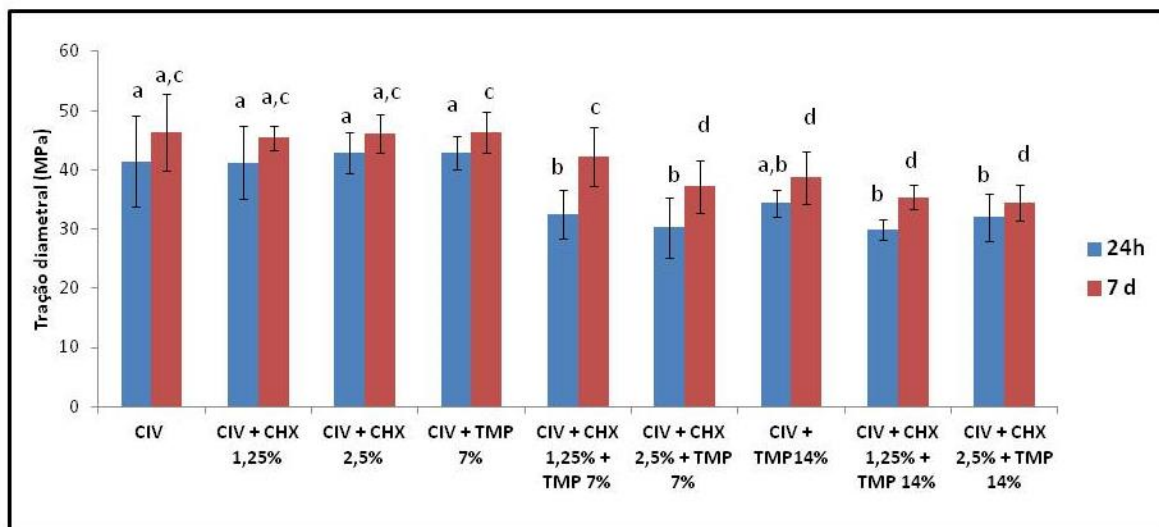


Figura 6. Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de resistência à tração diametral para os CIV testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e tempos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).

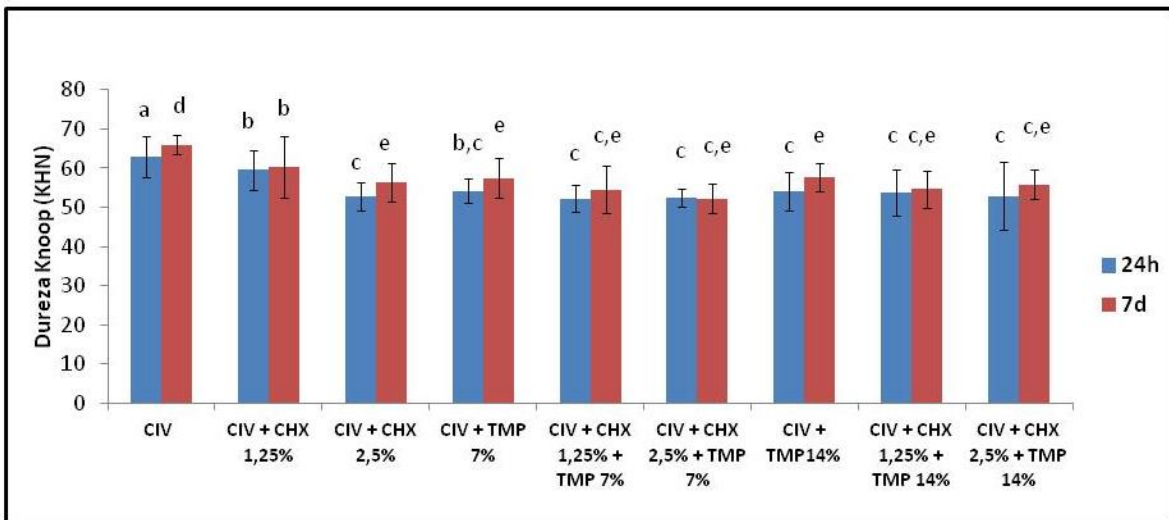


Figura 7. Médias (desvios-padrão – barras) dos valores obtidos de dureza dos CIV testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e tempos, de acordo com os testes de ANOVA/Bonferroni ($p \leq 0,05$).

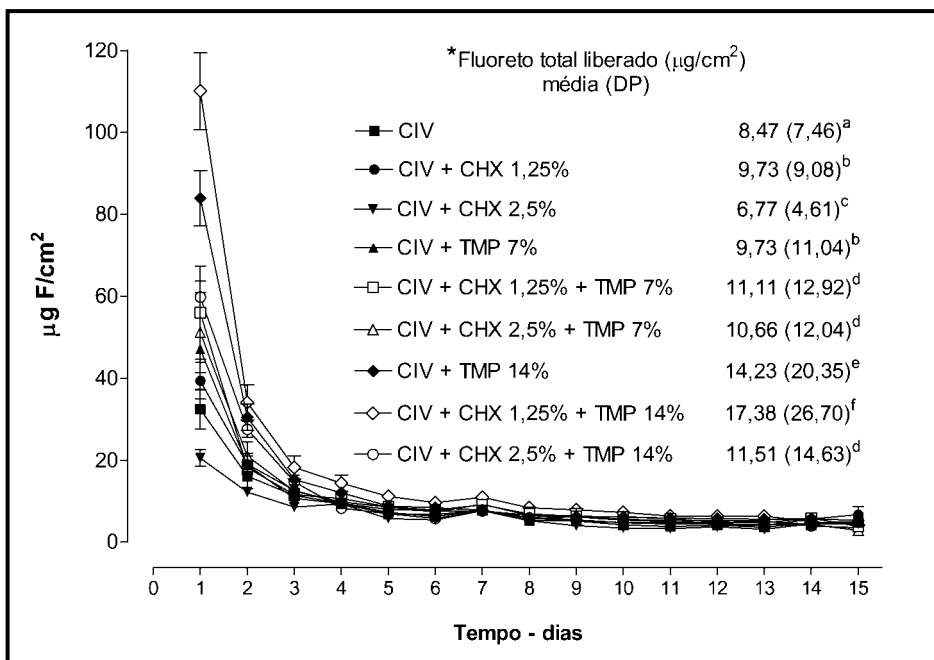


Figura 8. Fluoreto total liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelos CIV nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão das médias. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

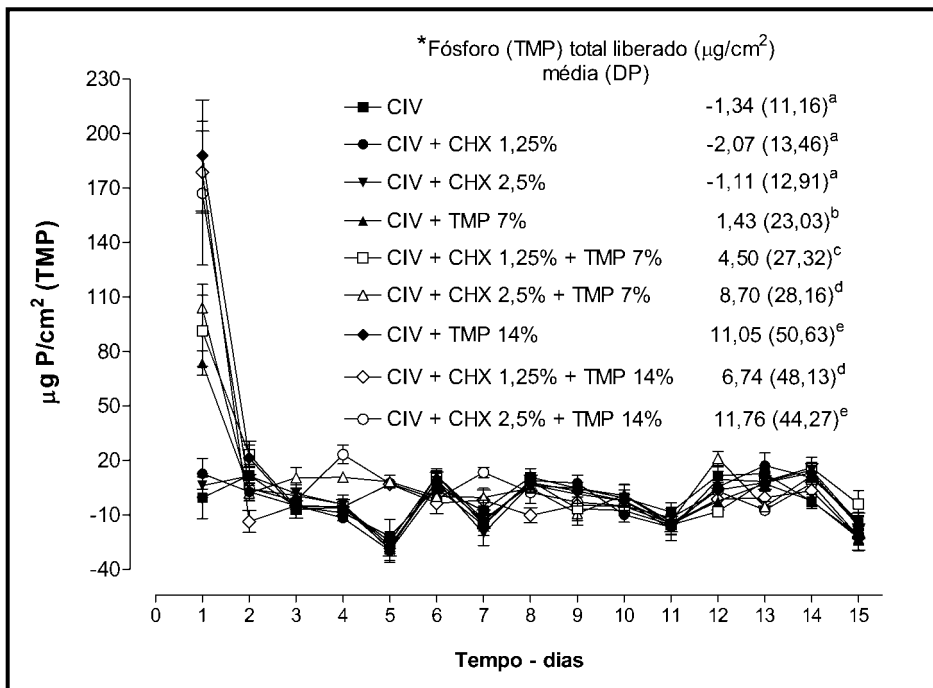


Figura 9. Fósforo (TMP) total liberado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pelos CIV nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão das médias.^a Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

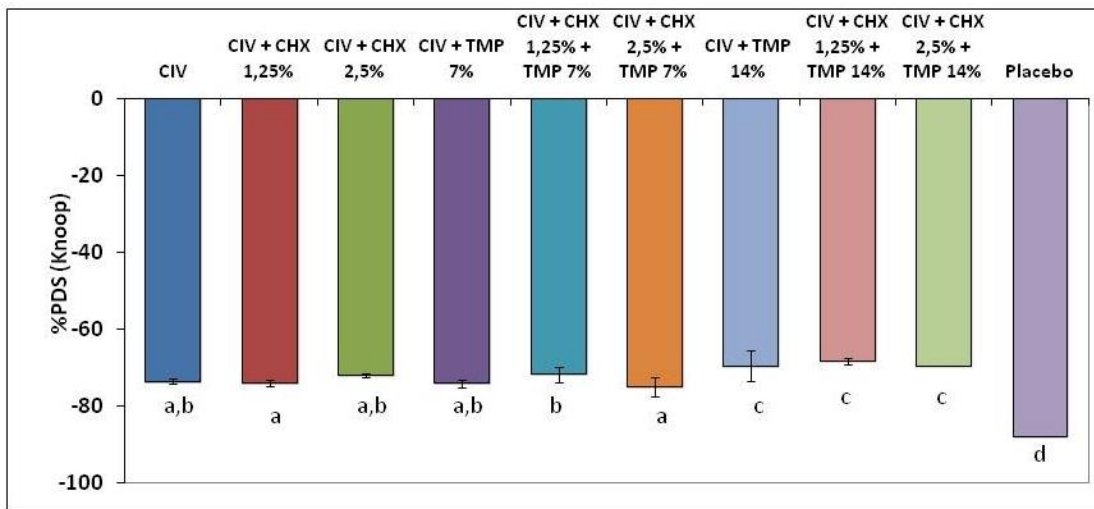


Figura 10. Médias das porcentagens (desvios-padrão – barras) obtidas para a perda de dureza superficial de esmalte bovino em contato com os CIVs testados. ^aLetras distintas mostram diferença estatística entre os grupos, de acordo com os testes de ANOVA/Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

ANEXO A

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Caries Research

Guidelines for Authors
www.karger.com/cre_guidelines

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online:

Should you experience problems with your submission, please contact:

Prof. David Beighton

(Editor-in-Chief, Caries Research)

Department of Microbiology

The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research

KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower

London Bridge SE1 9RT (UK)

Tel. +44 2071887465

Fax +44 2071887466

david.beighton@kcl.ac.uk

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e-mail addresses of three potential reviewers for your manuscript.

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.

If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of Caries Research and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications. Authors of papers describing research on human subjects are required to state that they have adhered to the Declaration of Helsinki.

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must be numbered consecutively from the title page until the last page. Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;

- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the

start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript.

Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at clinicaltrials.gov or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the first patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number].

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation).

Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surfacesoftened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 960.00 per page.

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research

under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Examples

(a) *Papers published in periodicals*: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.

(b) *Papers published only with DOI numbers*: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) *Monographs*: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*. Basel, Karger, 1985.

(d) *Edited books*: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) *Patents*: Diggins AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) *World Wide Web*: Chaplin M: Water structure and behavior. www.lsbu.ac.uk/water, 2004.

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional information which is directly pertinent to the content and conclusion of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The editors reserve the right to reject or limit the scope and length of supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. Acceptable file formats are word or pdf, excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a pdf file), video files (.mov, .avi, .mpeg), and audio files (.wav), either free standing or incorporated into html or ppt files in each case to illustrate the sound. Accepted supplementary material will be published as submitted and no proofs will be provided to the authors.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

*Author's Choice*TM

Karger's Author's ChoiceTM service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium Author's ChoiceTM service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the

following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's Author's Choice™ feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted seven printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 21 typescript pages (including tables, illustrations and references).

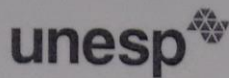
Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.

ANEXO B
COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Influência da incorporação de nanopartículas de trimetrafosfato de sódio associado ou não à clorexidina nas propriedades biológicas, físico-mecânicas e de redução da desmineralização de cimento de ionômero de vidro" sob responsabilidade da Pesquisadora **CRISTIANE DUQUE** e colaboração de Márjully Eduardo Rodrigues da Silva está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-00884-2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Influence of incorporation of nanoparticles trimetrafosfato sodium with or without chlorhexidina in biological properties, physico-mechanical and reducing demineralization cement glass ionomer", process number **FOA-00884-2013**, under responsibility of **CRISTIANE DUQUE** and with collaboration of Márjully Eduardo Rodrigues da Silva agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

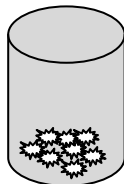
Prof. Adj. MARY MARCONDES
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

ANEXO C

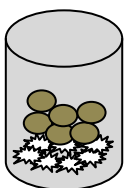
Preparo do trimetafosfato de sódio nanoparticulado

Lavagem das esferas de zircônia com água

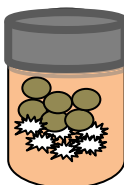
Pesar o TMP e colocar tubo de polietileno



Adicionar as esferas de zircônia sobre o TMP e o isopropanol até recobrir as esferas



Passar veda rosca na tampa do frasco de polietileno



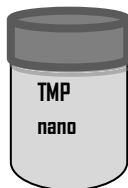
Moer por 48 horas



Filtrar e secar



Triturar e armazenar



ANEXO D

Preparo do cimento de ionômero de vidro



CIV Fuji II LC



Pesagem dos CIVs, TMP e CHX



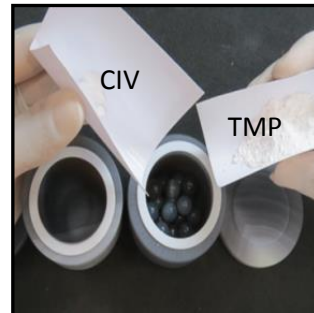
Esferas de Zircônia



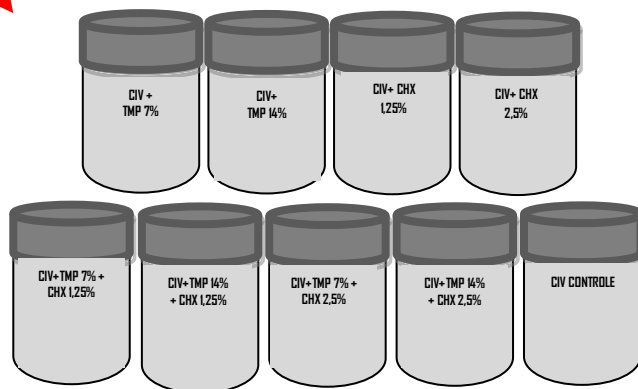
Moinho de Bola em agitação



Moinho de Bola

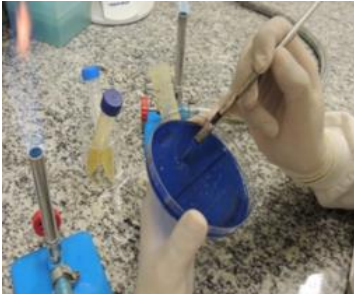


**CIV + CHX
CIV + TMP
CIV + CHX + TMP**



ANEXO E

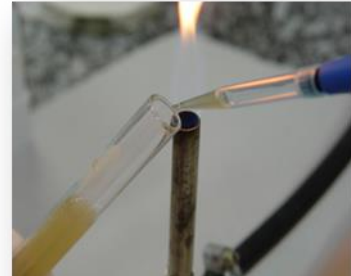
Teste de difusão em ágar



Cultivo microbiano em placas de ágar



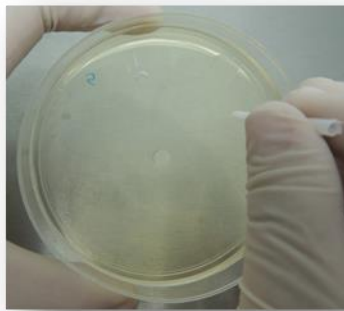
Transferência de colônias para BHI caldo e incubação por 24h



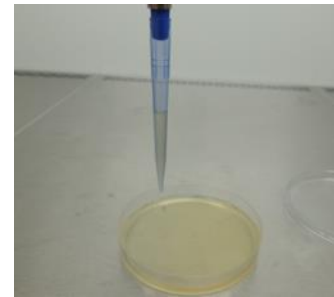
300µl de cada cultura microbiana



Manipulação dos CIVs



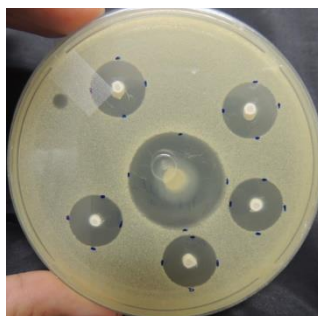
Confecção dos poços com cilindro plástico



Mistura em BHI Ágar e aguardo da geleificação (20 min)



Inserção do material nos poços com auxílio de uma seringa Centrix



Formação dos halos de inibição no ágar

ANEXO F

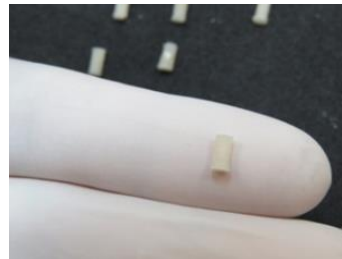
Teste de resistência à compressão



Manipulação do material



Inserção do material nas matrizes e fotoativação



Corpos-de-prova de 24h e 7 dias



Força aplicada sobre os corpos-de-prova em máquina de ensaios Instron

**Velocidade 1mm/min
Posição vertical
Carga de 500N**

ANEXO G

Teste de resistência à tração diametral



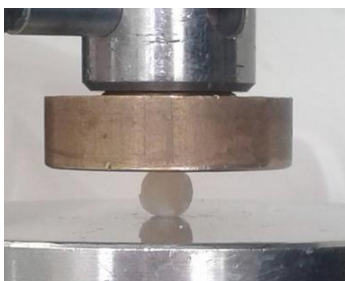
Manipulação do material



Inserção do material nas matrizes e fotoativação



Corpos-de-prova de 24h e 7 dias



Força aplicada sobre os corpos-de-prova em máquina de ensaios Instron

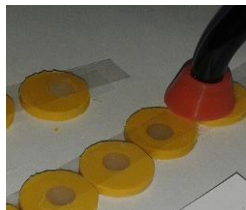
**Velocidade 1mm/min
Posição horizontal
Carga de 500N**

ANEXO H

Teste de dureza de superfície dos materiais



Manipulação do material



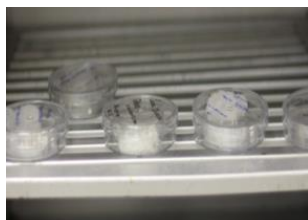
Inserção do material na matrix e fotoativação



Corpos-de-prova de 24h e 7 dias

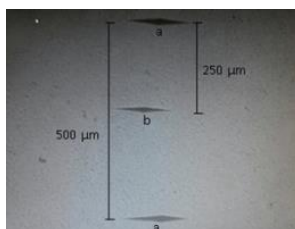


Armazenamento em ambiente úmido



Estufa a 37°C

Armazenamento de 24h e 7 dias



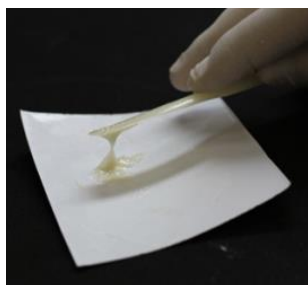
5 edentações com 500µm de distância entre cada uma



Microdurâmetro Shimadzu
Carga estática de 100g
Velocidade de 10 segundos

ANEXO I

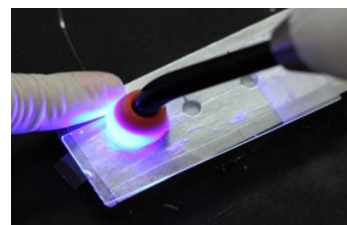
Preparo dos corpos-de-prova e ciclagem de pH



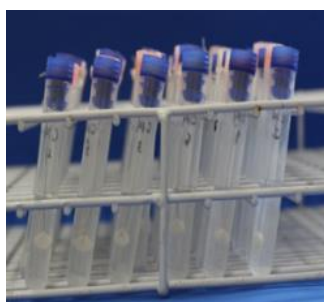
Manipulação do material



Inserção do material (5mm de diâmetro e 2mm de espessura) e fio de aço na matrix metálica



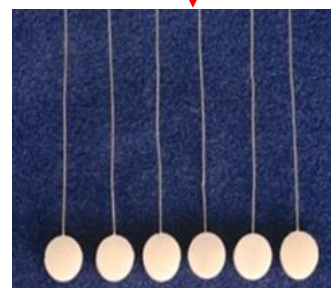
Fotopolimerização do material com o fio de aço



Tubos em grade para agitação



Corpos-de-prova inseridos em tubo de ensaio com 2ml de solução DES/RE



6 corpos-de-prova de cada grupo



Agitadora: tubos ficaram em agitação constante por 15 dias em 37°C

ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CICLAGEM DE pH

CICLAGEM DOS MATERIAIS PARA DOSAR A CONCENTRAÇÃO DE F E TMP DAS SOLUÇÕES DES E RE



Silva et al., 2007.

ANEXO J

Análise de liberação de F

DOSAGEM DAS SOLUÇÕES DES / RE



**Eletrodo específico
combinado para íon
fluoreto**



**Soluções padrão para calibração
do eletrodo**



**Para cada dosagem foram
pipetadas 0,5 ml das
soluções DES/RE + 0,5 ml
de TISSAB II**



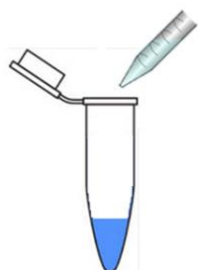
**Leituras realizadas sob
agitação constante**



ANEXO K

Análise de liberação de TMP dos materiais

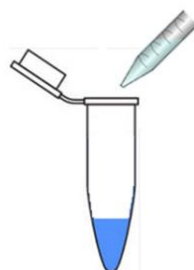
DOSAGEM DE TMP DAS SOLUÇÕES DES / RE



0,2 ml de solução
DES / RE +
0,2 ml de HCL



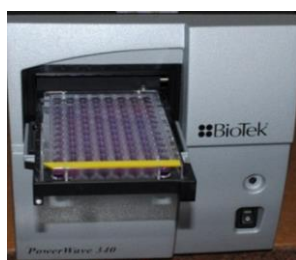
Banho fervente em
100°C por 1 hora



0,2 ml da solução foi utilizada
para leitura



Placa de 96 poços com
as soluções



Leitor de microplacas (Eon
Microplate Spectrophotometer, Bio
Tek, Winooski, USA)



ANEXO L

OBTENÇÃO E PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

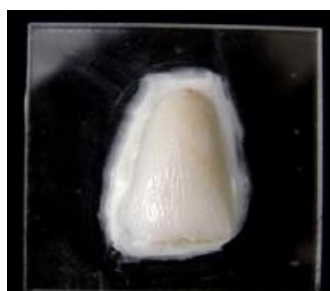
Confecção dos blocos de esmalte bovino



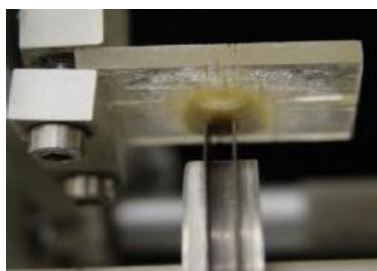
1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



2. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



3. Face vestibular fixada na placa de acrílico.

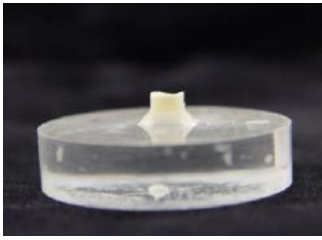


4. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond –n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Em seguida, foi realizado o corte no sentido transversal.



5. Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário.

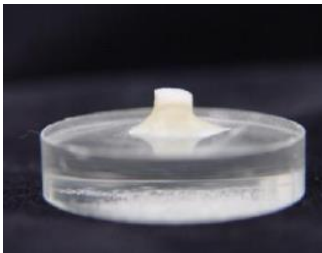
Planificação da dentina e polimento do esmalte



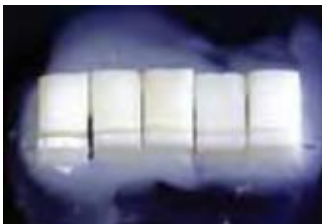
6. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (□ 3 cm de diâmetro por □ 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.



7. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz e lixas de granulação 320 (Polishing Cloth Buehler 40-7618, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), 2 pesos, durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



8. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual foi polida para análise de dureza.



9. Secção transversal de 1mm / bloco em cortadeira elétrica, obtendo-se blocos com 4x3x3 mm.

SEQÜÊNCIA DO POLIMENTO DE ESMALTE

1. Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
2. Na Politriz (Polishing Cloth Buehler 40-7618, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) usou lixa de granulação 600, 800 e 1200 (30 segundos – 2 pesos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/deionizada por 2 minutos, entre cada lixa.
3. Na Politriz (Polishing Cloth Buehler 40-7618, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) deu acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) (1 minuto – 2 pesos) e suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
4. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) diluída 20:1 em água destilada/deionizada (2 minutos);
5. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

ANEXO M

CONFEÇÃO DOS CORPOS-DE-PROVA, CICLAGEM DE pH (DES>RE)



1. Confecção dos espécimes de todos os grupos de cimento de ionômero de vidro modificado por resina. Remoção dos corpos-de-prova da matriz após 40 segundos de fotoativação.



2. União do bloco de esmalte bovino ao corpo-de-prova com auxílio de cera pegajosa.



Bloco de esmalte e espécies isolados com esmalte de unha e fixados à haste metálica com cera.



3. Lavagem de 30 segundos a cada troca de soluções, com água deionizada.



4. Estufa para cultura bacteriológica (Olidef cz Ribeirão Preto – SP, Brasil) utilizada para manter os blocos de esmalte nas soluções de Des e Re em temperatura 37°C, durante o período da ciclagem.

ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CICLAGEM DE pH

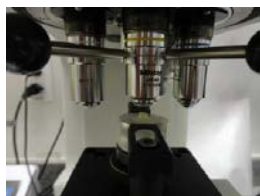


ANEXO N

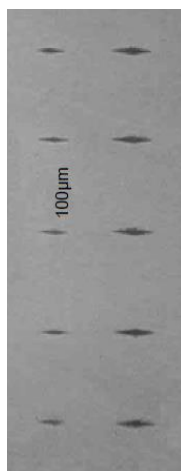
ANÁLISE DE DUREZA SUPERFICIAL INICIAL E FINAL



Microdurômetro Micromet 5114 Hardness Tester (Buehler, Lake Bluff, USA e Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem Buehler OminMet (Buehler, Lake Bluff, USA).



2. Bloco de esmalte sendo submetido à determinação de dureza no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da dureza de superfície.



3. Fotomicrografia das impressões para análise de dureza de superfície inicial e final (SHi, SHf) (Aumento: 100x).