



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ana Carolina de Oliveira Becci

Efeito da adição de Clorexidina nas propriedades adesiva e antibacteriana de um Cimento de Ionômero de Vidro de alta viscosidade

Araraquara

2013



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ana Carolina de Oliveira Becci

Efeito da adição de Clorexidina nas propriedades adesiva e antibacteriana de um Cimento de Ionômero de Vidro de alta viscosidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a.Dr^a Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara

2013

Becci, Ana Carolina de Oliveira

Efeito da adição de clorexidina nas propriedades adesiva e antibacteriana de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade/
Ana Carolina de Oliveira Becci.-- Araraquara: [s.n.], 2013.
88 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Clorexidina 2. Cimentos de ionômeros de vidro 3. Biofilmes 4.
Dentina I. Título

Ana Carolina de Oliveira Becci

Efeito da adição de Clorexidina nas propriedades adesiva e antibacteriana de um Cimento de Ionômero de Vidro de alta viscosidade

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientador: Prof^a.Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

2º examinador: Prof^a. Dr^a. Ângela Cristina Cilense Zuanon

3º examinador: Prof^a. Dr^a. Renata Cristiane da Silva Molina

Araraquara, 23 de Julho de 2013

Dados Curriculares

Ana Carolina de Oliveira Becci

Nascimento 29/06/1987, Santos, SP

Filiação Flávio José Becci
Maria de Lourdes de Oliveira Becci

2006 - 2010 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP

2011-2013 Curso de Pós - Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP

A man with a beard, wearing a yellow robe and a hood, stands on a rocky cliff. He is looking out over a valley with a small town in the distance. The scene is bathed in a soft, golden light, suggesting a sunrise or sunset. The background features tall, thin trees and a hazy sky.

Salmo 121

*Levantarei os meus olhos para os montes
de onde vem o meu socorro*

*O meu socorro vem do Senhor que fez o
céu e a Terra*

*Não deixará vacilar o teu pé; aquele que
te guarda não tosquenejará*

*Eis que não tosquenejará nem dormirá o
guarda de Israel*

*O Senhor é quem te guarda; o Senhor é
a tua sombra à tua direita*

*O sol não te molestará de dia e nem a
lua de noite*

*O Senhor te guardará de todo mal;
guardará a tua alma*

*O Senhor guardará a tua entrada e a tua
saída, desde agora e para sempre.*

DEDICATÓRIA

À Deus. Senhor do céu e da Terra que me deu a vida e a capacidade para realizar este trabalho. O amor e a obediência aos seus ensinamentos estará sempre em primeiro lugar.

Aos meus pais Flávio José Becci e Maria de Lourdes de Oliveira Becci. De nada adiantaria meu esforço, não fosse para tornar orgulhosos aqueles que me ensinaram todos os valores e princípios, que acreditaram em mim desde o início, que me amaram incondicionalmente. Tudo o que faço nesta vida é por vocês. Amor sem fim!

À minha orientadora Elisa Maria Aparecida Giro. Um exemplo de mestre, pesquisadora e principalmente um exemplo de ser humano. Obrigada por todas as vezes em que, com muita paciência e sabedoria, me transmitiu seus conhecimentos sobre a Odontologia e sobre a vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha amada irmã Fernanda, meu cunhado Renan e ao mais novo integrante da família Francisco. Por serem meu refúgio durante os momentos de incerteza, pelo companheirismo, pelo incentivo, pelo afeto, por tudo. Amo vocês.

À minha afilhada Eduarda, que desde tão pequena ilumina meus dias com sua pureza e alegria .

À minha avó Aracy. Por me dar muitas das melhores lembranças que tenho na vida. Gostaria de estar mais perto da Sra. neste momento, para poder dar um grande abraço e agradecer pessoalmente. Obrigada por fazer a minha vida mais feliz.

Aos meus avós Therezinha, João Ricardo e Paulo. Vocês me proporcionaram momentos de muita alegria e foram grandes exemplos. Sei que hoje estão em um lugar muito melhor, olhando por nós.

Aos meus tios Francisco, Sônia, Vera e Yslei. Pelo carinho e atenção. Pelas sopinhas nas noites frias de inverno e os abraços nos dias difíceis. Sei que posso contar com vocês em todos os momentos.

À todos os meus primos e primas que são muito queridos e como irmãos para mim. Tenho muitas saudades do tempo em que podíamos conviver mais. Cada um de vocês está guardado em um lugar muito especial do meu coração.

À minha madrinha Marli, pessoa muito querida e presente em minha vida.

Às amigas Janaína e Camila. Vocês sabem que minha casa é a casa de vocês e que além da Fernanda tenho mais duas irmãs. Muito obrigada pela amizade verdadeira. Vocês são parte da minha família.

Aos amigos Bruno, Cristiano, Guilherme, Guilherme Furtado, Henrique, João Paulo, Paulo Vinícius, Renan, Renan Negrão. Crescemos juntos e vocês não imaginam o valor que essa amizade tem pra mim. Obrigada por estarem sempre do meu lado me apoiando apesar da distância.

Às amigas Chaiene, Liege, Luana, Rosa e Thamiris. Muito obrigada por todas as vezes em que me ajudaram e tornaram a minha vida em Araraquara muito mais agradável. Amizade verdadeira para sempre.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Lourenção Brighenti. Pela participação constante em todas as etapas deste trabalho. Por esclarecer minhas dúvidas sempre com muita paciência e de forma objetiva. Obrigada de coração!

À Prof^a.Dr^a. Angela Cristina Cilense Zuanon. Por fazer parte deste grupo de pesquisa, estando sempre solícita em ajudar e por ser sempre tão positiva. Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista - “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Júlio Cezar Durigan e Vice- Reitor Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pela digníssima Diretora Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice- Diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgaviolli Massucato.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu e Lima e Vice-Chefe Prof^a. Dr^a. Lídia Parsekian Martins.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Fernanda Lourenção Brighenti, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling e Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling pela ajuda com a análise estatística do primeiro estudo e ao Prof. Romeu Magnani pela ajuda com a análise estatística do segundo estudo.

Ao Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani pelo carinho, simplicidade e amizade durante esses anos.

Ao Prof. Dr. José Maurício Reis e ao pós graduando Felipe Abi Rached pelo auxílio com a máquina de ensaios mecânicos.

À Prof^a.Dr^a. Denise Madalena Palomari Spolidório, por ter permitido a realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia desta Faculdade.

Ao Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela Prof^a. Dr^a Denise Madalena Palomari Spolidorio.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Fisiologia e Patologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por toda a ajuda recebida e pelo convívio diário nos últimos meses.

Às voluntárias Ana Paula, Camila, Liege, Luana, Natália, Rosa e Thamiris. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos colegas de Pós Graduação: Ana Paula, Camila, Débora, Diego, Fabiano, Juliana, Juliana Feltrin, Leopoldina, Liege, Luana, Luciana, Manuel, Márcia, Marco, Marília, Renata, Rosa, Thalita e Thamiris. Os momentos vividos nesses dois últimos anos ficarão para sempre gravados na memória. Muito obrigada por tudo.

Aos funcionários da Seção de Pós - Graduação: Mara e Alexandre, por toda atenção e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Tânia, Dulce, Odete Soninha, Cristina, Márcia, Totó, Diego, Pedrinho e Regina .

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Marley, Cristina, Ceres, Maria, Sílvia, Odete, Eliane, Inês e Adriano.

RESUMO

Becci ACO. Efeito da adição de clorexidina nas propriedades adesiva e antibacteriana de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a resistência de união à dentina e a composição microbiana do biofilme formado sobre um CIV de alta viscosidade ao qual foi adicionado diacetato de CLX em diferentes concentrações. A CLX foi misturada ao pó do CIV nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%. O CIV sem CLX foi usado como controle. No primeiro estudo, foram utilizados 80 terceiros molares, que tiveram uma superfície de dentina exposta na face oclusal. Metade dos dentes foi mantida hígida e a outra metade foi submetida à indução artificial de cárie. Em cada superfície dentinária, foi confeccionado um espécime cilíndrico com 1mm de diâmetro x 1 mm de altura (n=10 por grupo). Estes foram mantidos a 37°C com 100% de umidade por 24 horas, e submetidos ao teste de microcisalhamento. Os resultados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann Whitney ($\alpha=0,05$). No segundo estudo, voluntários (n=8) usaram dispositivos palatinos contendo espécimes (4 mm de diâmetro x 1 mm de altura). Os materiais foram testados por todos os voluntários na ordem crescente de concentração de CLX por um período de 7 dias e com intervalo de descanso de 15 dias entre elas. O biofilme formado sobre os espécimes foi coletado e analisado. Os dados referentes às contagens de microrganismos anaeróbios totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi

de 5% . Não houve diferença estatística na resistência de união entre a dentina hígida e afetada ($p>0,05$). Os grupos CIV, CIV+CLX 0,5% e CIV+CLX 1% apresentaram resistência de união estatisticamente semelhante ($p>0,05$), e superior ao CIV+CLX 2% ($p\leq 0,025$). Houve diferença entre as médias de contagem de microrganismos apenas para o lactobacilos ($p<0,05$), sendo estas significativamente maiores para o grupo CIV+CLX 2% do que para os grupos CIV e CIV+CLX 0,5%. Pode-se concluir que: a adição de CLX nas concentrações de 0,5% e 1% não alterou a resistência de união de um CIV de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie, mas não foi capaz de melhorar sua atividade antibacteriana. A adição CLX na concentração de 2% ao CIV piorou suas propriedades de adesão e antibacteriana.

Palavras chave: clorexidina; cimentos de ionômeros de vidro; biofilmes; dentina

ABSTRACT

Becci ACO. Effect of chlorhexidine on the adhesive and antibacterial properties of a high-viscosity glass ionomer cement [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the bond strength to dentin and the microbial composition of the biofilm formed over a high-viscosity GIC to which chlorhexidine diacetate (CHX) was added at different concentrations. CHX was mixed with GIC powder at 0.5%, 1% and 2% (w/w). GIC without CHX was used as control. In the first study, eighty human third molars were used. They had an area of dentin exposed on the occlusal surface. Half of the specimens were kept sound and the other half was subjected to artificial caries induction. In each dentin surface a cylindrical specimen with 1 mm in diameter and 1 mm in weight (n=10 per group) was made. They were kept at 37°C and 100% humidity for 24 hours and tested for microshear. The results were analyzed using Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests ($\alpha = 0.05$). In the second study, volunteers (n=8) wore palatal appliances containing specimens with 4mm in diameter and 1mm in weight. The material with increasing concentrations of chlorhexidine were tested by all volunteers for a period of 7 days each, with a wasout period of 15 days. After each step, the biofilm formed on the specimens were collected and analyzed. Data from total anaerobic microorganisms, total streptococci, mutans streptococci and lactobacilli were analyzed by repeated measures ANOVA followed by Tukey test. The significance level was set at 5%. There were no statistical significant differences between bond strength of sound and caries-affected dentin ($p > 0.05$). Groups GIC, GIC+CHX 0.5% and GIC+CHX 1%

showed bond strength statistically similar ($p > 0.05$) and higher than GIC+CHX 2% group ($p \leq 0.025$). Microbial counts showed statistical significant differences among groups only for lactobacilli ($p < 0.05$). GIC+CHX 2% presented higher mean counts than GIC and GIC + CHX 0.5% ($p < 0.05$). In conclusion, the addition of CHX diacetate 0.5% and 1% did not change bond strength of a high-viscosity GIC in either caries-affected or sound dentin, but was not able to improve its antibacterial activity as well. The addition of 2% CHX to GIC showed inadequate adhesion and antibacterial properties.

Keywords: chlorhexidine, glass ionomer cements, biofilms, dentin

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	24
PROPOSIÇÃO.....	28
ESTUDO I.....	30
ESTUDO II	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICES	79
ANEXO.....	84

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO GERAL

Conduas que adotam uma intervenção minimamente invasiva como a técnica de tratamento restaurador atraumático (TRA), inicialmente restrita a regiões onde não existia acesso ao tratamento odontológico convencional (Frencken, Makoni¹⁰, 1994), tem sido empregadas em clínicas modernas e bem equipadas para o atendimento principalmente de crianças pequenas (Tüzüner et al.²⁴, 2011). Neste caso, a finalidade desta técnica é também eliminar os procedimentos de anestesia e o barulho causado pelos instrumentos rotatórios (Massara et al.¹⁶, 2002), que são os principais responsáveis pela ansiedade e medo.

De acordo com a abordagem atual de remoção de cárie, o TRA consiste na retirada apenas da dentina mais amolecida, a dentina infectada, permanecendo então a dentina afetada. No entanto, estudos clínicos mostram que bactérias residuais alojadas sob a restauração se mantem viáveis por até dois anos, o que pode determinar o desenvolvimento de lesões de cárie secundárias e falhas nas restaurações com o passar do tempo (Deepalakshmi et al.⁷, 2010; van Amerogen²⁵, 1996, Weerheijm, Groen²⁶, 1999).

O material convencionalmente usado como restaurador nessa técnica é o cimento de ionômero de vidro (CIV). A reação de presa desse material é essencialmente uma reação ácido-base e as suas maiores vantagens são: seu potencial remineralizador atribuído a liberação de flúor (Dunne et al.⁸, 1996; Exterkate et al.⁹, 2005; Herrera et al.¹³, 1999; Wiegand et al.²⁷, 2007), coeficiente de expansão térmica compatível com a estrutura dentária, biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e adesão ao esmalte e à dentina (Cardoso et al.⁶, 2010; Moshaverinia et al.¹⁷, 2011). Os CIVs interagem quimicamente com os tecidos mineralizados

dentais, formando ligações iônicas entre os múltiplos grupos carboxílicos do ácido polialcenóico com o cálcio abundantemente disponível (Cardoso et al.⁶, 2010). Outra importante propriedade dos CIVs é a molhabilidade de superfície, que quando comparada à maioria dos compostos hidrófobos, mostra-se superior. Uma alta molhabilidade é desejável aos materiais restauradores para que estes se espalhem melhor sobre a estrutura dental e subseqüentemente realizem uma forte união (Moshaverinia et al.¹⁷, 2011).

Cimentos de ionômero de vidro com propriedades físicas melhoradas têm sido desenvolvidos especialmente para serem usados na técnica do TRA. No entanto, pesquisas mostram que esses materiais mais viscosos liberam menor quantidade de íons flúor do que os CIVs convencionais e os modificados por resina (Gao et al.¹¹, 2000, Smales, Yip²¹, 2002). Porém o efeito dessa menor liberação na capacidade de inibir a cárie dentária nos tecidos adjacentes ainda não está bem elucidado. Além disso, o uso dos CIVs para selar cavidades com dentina cariada remanescente, principalmente quando sujeitas a muito estresse mecânico, é questionável em decorrência de limitações associadas às suas propriedades físicas e possibilidade de microinfiltração (van Amerongen²⁵, 1996; Xie et al.²⁸, 2000). Os CIVs apresentam ainda aumentada rugosidade superficial em relação a outros materiais restauradores, o que favorece a formação de biofilme, além disso, cada microrganismo possui diferente sensibilidade ao flúor (Hamilton, Bowden¹², 1988), o que aumenta o interesse na sua associação com materiais que apresentam capacidade de inibir o crescimento bacteriano (Yesilyurt et al.²⁹, 2009).

A adição de clorexidina, um anti-séptico de amplo espectro de ação, aos CIVs, tem sido pesquisada há algum tempo, e, estudos in vitro apontam um

aumentado efeito antibacteriano desses cimentos quando comparados com os CIVs na sua formulação original (Hoszek, Ericson¹⁴, 2006; Palmer et al.¹⁹, 2004; Ribeiro, Ericson²⁰, 1991; Takahashi et al.²², 2006; Türkun et al.²³, 2008). Contudo, a grande maioria desses trabalhos avaliou a ação antibacteriana por meio de testes de difusão em ágar usando microrganismos isolados. As condições de estudo são muito diferentes daquelas encontradas na cavidade bucal, e, cada vez mais, aumenta o interesse por estudos que avaliem a atividade antibacteriana usando modelos experimentais *in situ*, nos quais o biofilme se forma sob condições mais próximas da realidade.

Além disso, o efeito antibacteriano da CLX parece ser concentração dependente (Hoszek, Ericson¹⁴, 2008) e altas concentrações desta podem determinar alterações nas propriedades físicas e mecânicas dos CIVs (Palmer et al.¹⁹, 2004; Takahashi et al.²², 2006; Türkun et al.²³, 2008). Assim, até o momento, não foi determinada a concentração ideal de CLX que pode ser adicionada ao CIV, sendo poucos os trabalhos que avaliaram a propriedade de adesão dessa associação de materiais à dentina (Takahashi et al.²², 2006) e nenhum trabalho fez esta avaliação em dentina afetada por cárie.

Portanto, é de extrema importância determinar a concentração ótima deste agente antimicrobiano para se obter uma adequada ação antibacteriana sem alterar as propriedades físicas e de adesão dos CIVs.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO GERAL

Avaliar as propriedades adesiva e antibacteriana de um CIV de alta viscosidade após adição de diferentes concentrações de diacetato de clorexidina.

Proposição específica

Estudo 1: Influência da adição do diacetato de clorexidina na resistência de união de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie.

Avaliar a resistência de união à dentina de um CIV de alta viscosidade após a adição de diacetato de clorexidina em diferentes concentrações , em função do substrato (dentina hígida e cariada) .

Estudo 2 : Análise do biofilme formado in situ sobre o Cimento de ionômero de vidro com diferentes concentrações de diacetato de clorexidina

Analisar a composição microbiológica do biofilme formado in situ sobre um CIV de alta viscosidade após a adição de diacetato de clorexidina em diferentes concentrações.

Influência da adição do diacetato de clorexidina na resistência de união de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie.

ESTUDO I

Influência da adição do diacetato de clorexidina na resistência de união de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie.

Influence of the addition of chlorhexidine diacetate on bond strength of a high-viscosity glass ionomer cement to sound and caries-affected dentin.

Ana Carolina de Oliveira BECCI^a, Luana Mafra MARTI^a, Angela Cristina Cilense ZUANON^b, Fernanda Lourenção BRIGHENTI^c, Elisa Maria Aparecida GIRO^b

^aMestranda em Odontopediatria, Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Faculdade de Odontologia, UNESP- Univ Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil.

^bProfessor Adjunto, Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia, UNESP Univ - Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

^cProfessor Assistente Doutor, Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia, UNESP Univ - Estadual Paulista, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil

Autor para correspondência:

Elisa Maria Aparecida Giro

email: egiro@foar.unesp.br

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Rua Humaitá nº 1680 Araraquara, SP, Brasil. CEP: 14801-903

Tel: (16) 33016336 fax: (16) 33016329

e-mail dos demais autores: acbecci@gmail.com; lu_mmarti@yahoo.com.br;

aczuanon@foar.unesp.br; fbrighenti@foar.unesp.br

Resumo

Introdução: A adição da clorexidina (CLX) ao cimento de ionômero de vidro (CIV) visa melhorar a sua propriedade antibacteriana, contudo pode interferir na adesão à dentina.

Objetivo: avaliar a influência da adição de diacetato de CLX em diferentes concentrações a um CIV de alta viscosidade, na sua adesão à dentina sadia e afetada por cárie. **Materiais e**

Métodos: Foram utilizados 80 terceiros molares, que tiveram a superfície de dentina exposta na face oclusal. Metade dos dentes foram mantidos hígidos e a outra metade foi submetida à indução artificial de cárie. A CLX foi misturada ao pó do CIV nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%. O CIV sem CLX foi usado como controle. Em cada superfície dentinária foi confeccionado um espécime com 1 mm de diâmetro e 1 mm de altura. Estes foram mantidos a 37°C com 100% de umidade por 24 horas, e, submetidos ao teste de microcisalhamento. Os resultados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann Whitney ($\alpha=0,05$).

Resultados: Não houve diferença estatística entre os valores de resistência de união para dentina hígida e afetada ($p>0,05$). Para as duas condições do substrato, os grupos CIV, CIV+CLX 0,5% e CIV+CLX 1% apresentaram resistência de união estatisticamente semelhante ($p>0,05$), e superior ao CIV+CLX 2% ($p\leq 0,025$). Houve predominância de fraturas mistas e coesivas do material para todos os grupos. **Conclusões:** A adição de CLX nas concentrações de 0,5% e 1% não influenciou negativamente na resistência de união de um CIV de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie.

Descritores: Cimentos de ionômeros de vidro; clorexidina; propriedades físicas; dentina

Abstract

Introduction: The addition of chlorhexidine (CHX) to glass ionomer cements (GIC) aims to improve their antibacterial property, but can interfere with their adhesion to dentin.

Objective: To evaluate the influence of the addition of chlorhexidine diacetate at different concentrations to a high-viscosity GIC in its adhesion to sound and caries-affected dentin.

Materials and Methods: Eighty human third molars were used. They had an area of dentin exposed on the occlusal surface. Half of the specimens were kept sound and the other half was subjected to artificial induction of caries. CHX was mixed with GIC powder at 0.5%, 1% and 2% (w/w). GIC without CHX was used as control. In each dentin surface a specimen with 1 mm in diameter and 1 mm in height was made. They were kept at 37°C and 100% humidity for 24 hours and tested for microshear. The results were analyzed using Kruskal-Wallis and Mann Whitney tests ($\alpha = 0.05$). **Results:** There was no significant difference between bond strength of sound and caries-affected dentin ($p > 0.05$). For both substrate conditions, groups GIC, GIC + CHX 0.5% and GIC + CHX 1% showed bond strength statistically similar ($p > 0.05$), and higher than GIC + CHX 2% ($p \leq 0.025$). Coesive and mixed failures were predominant in all groups. **Conclusions:** The addition of chlorhexidine at 0.5% and 1% did not determine negative changes in the bond strength of GIC to caries-affected and sound dentin.

Keywords: Glass ionomer cements; chlorhexidine; physical properties; dentin

Introdução

A técnica de mínima intervenção para o tratamento de lesões de cárie tem sido amplamente utilizada nas últimas décadas. Nessa técnica é recomendada a remoção da camada de dentina infectada, mais desorganizada e a preservação da dentina afetada que tem potencial de remineralização.^{1,2}

Como a dentina cariada não é totalmente removida, o cimento de ionômero de vidro (CIV) tem sido indicado como material restaurador devido as suas propriedades de adesão química às estruturas mineralizadas do dente, coeficiente de expansão térmica similar à dentina, adequada biocompatibilidade e liberação de íons flúor que contribuem no processo de remineralização.^{3,4} No entanto, a baixa resistência mecânica das formulações convencionais desse material⁵ é um fator limitante para o seu uso em cavidades sujeitas a muito estresse mastigatório como as restaurações de classe I extensas e de classe II. Isso levou ao desenvolvimento de uma nova categoria de CIVs com propriedades físicas melhoradas.

Esses CIVs apresentam maior molhabilidade do pó pelo componente líquido do que os CIVs convencionais, o que resulta em uma manipulação mais fácil e rápida e em maior viscosidade.⁶ Como desvantagem, apresentam menor liberação cumulativa de íons flúor.^{7,8,9} Apesar de os efeitos dessa menor liberação de íons flúor na inibição de lesões de cárie residual ainda não serem conhecidos, vários pesquisadores^{10,11,12,13,14} têm proposto a associação de agentes anti-sépticos aos CIVs, a fim de melhorar suas propriedades antibacterianas.

A clorexidina (CLX) tem sido utilizada em associação aos CIVs, principalmente nas formas de digluconato^{10,13} e de diacetato.^{12,13,15} Contudo, o seu efeito antibacteriano é concentração-dependente¹¹ e, em altas concentrações a CLX pode interferir nas propriedades físicas e mecânicas do CIV.^{10,11}

Para que o sucesso clínico de uma técnica restauradora seja alcançado é importante ressaltar que o material modificado deve apresentar propriedades físicas adequadas, e não ter a sua propriedade de adesão às estruturas dentárias alterada, uma vez que o efeito anticariogênico depende de uma combinação da liberação do agente antibacteriano e do tempo de retenção do material na cavidade.¹¹ Como os trabalhos estudando a adesão da associação do CIV com a clorexidina à dentina são escassos¹² e não existem trabalhos testando essa propriedade na dentina afetada por cárie, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da adição de diacetato de CLX em diferentes concentrações na resistência de união de um CIV de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie.

Materiais e Métodos

Seleção e distribuição dos dentes

Oitenta terceiros molares humanos hígidos extraídos foram obtidos junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (Parecer 68.388, de 07 de agosto de 2012). Após a remoção dos restos teciduais, profilaxia e lavagem, foram selecionados apenas os dentes sem defeitos anatômicos e estruturais. Estes foram armazenados em solução de timol a 0,1% sob refrigeração (4^oC) até o momento da sua utilização. Os dentes foram aleatoriamente divididos em oito grupos (n=10) de acordo com a condição do substrato (dentina afetada por cárie e dentina sadia) e com a concentração de diacetato de clorexidina adicionada ao material (0%, 0,5%, 1% e 2%). O material usado foi um CIV de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix - 3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA), Tabela 1.

Obtenção da superfície de dentina

Os dentes foram cortados transversalmente no terço oclusal da coroa, com a finalidade de produzir uma superfície plana em dentina. O corte foi realizado com o auxílio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd., Lake Bluf, IL, EUA) equipada com disco diamantado (n.11-4254, Buehler LTD., Lake Bluf IL, EUA), com velocidade de 300 rpm e força de 200 gf, sob refrigeração constante. As superfícies foram inspecionadas em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) com 40 vezes de aumento para comprovar a ausência de remanescentes de esmalte sobre a superfície dentinária.

Indução artificial de lesão de cárie

Metade dos dentes selecionados (n=40) teve uma das raízes perfurada e transfixada com um fio ortodôntico para permitir que os mesmos ficassem suspensos. Estes foram impermeabilizados com duas camadas de esmalte ácido resistente, deixando apenas a superfície dentinária exposta, e foram esterilizados com óxido de etileno. Em seguida, os dentes foram suspensos em solução cariogênica (caldo BHI suplementado com 2% de sacarose, 1% de glicose e 0,5% de extrato de levedura; 25 mL/ dente) e inoculada com 10^5 UFC/mL de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo). O conjunto foi incubado em microaerofilia por 14 dias a 37 °C, com trocas da solução cariogênica a cada 48 horas, sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, o biofilme foi removido com gaze e o material isolante com o auxílio de lâminas de bisturi. Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada e foi constatada uma superfície de dentina escurecida e amolecida ao toque com sonda exploradora aplicada sem pressão¹⁶.

Remoção do tecido cariado e obtenção dos troqueis

Nos dentes artificialmente cariados, a dentina infectada foi manualmente removida com lixas de carbetto de silício de granulação 320, até a obtenção de uma dentina endurecida e resistente ao toque com sonda exploradora afiada sem pressão (dentina afetada). Na tentativa de obter uma profundidade dentinária semelhante entre os dentes afetados por cárie e os dentes mantidos hígidos, os últimos também foram desgastados com a mesma lixa.

Na sequência, os dentes foram lavados em cuba ultrasônica, incluídos em resina acrílica autopolimerizável, usando como matriz um tubo cilíndrico de PVC com 20 mm de diâmetro externo por 18 mm de altura, de forma que a superfície de dentina ficasse centralizada e paralela à base do tubo. Após a completa polimerização da resina acrílica, todos os dentes foram novamente lixados manualmente com lixas de carbetto de silício 320 lubrificadas com água, por 15 segundos, com o objetivo de produzir uma camada de smear layer. Todos os procedimentos foram realizados por um único operador previamente treinado.

Confecção dos corpos - de - prova

Na superfície dentinária de cada dente foi confeccionado um corpo-de-prova. Inicialmente, foi realizada a delimitação da área adesiva utilizando-se fita adesiva dupla face ácido resistente (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil) com uma perfuração (diâmetro de 1,0 mm) confeccionada com o auxílio de um perfurador de lençol de borracha (modelo Ainsworth, Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Em seguida, as superfícies de dentina foram condicionadas com ácido poliacrílico por 10 segundos e depois lavadas com jato de água-ar por 10 segundos e secas com bolinhas de algodão. Uma matriz cilíndrica transparente de silicone de 1 mm de altura com orifício de 1 mm de diâmetro obtido de uma sonda uretral descartável (Embramed, São Paulo, SP, Brasil) foi posicionado de forma que seu diâmetro interno fosse coincidente com a perfuração da fita adesiva e este foi utilizado como matriz para a confecção dos corpos-de-prova. O material foi manipulado

em temperatura ambiente controlada (24 ± 1 °C), conforme as recomendações do fabricante (3M – ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA) e inserido nos microtubos com o auxílio de uma seringa Centrix (DFL, Indústria e Comércio S.A, Jacarepaguá, RJ, Brasil). Os corpos-de-prova foram protegidos com vaselina na sua porção superior e o conjunto (troquel + microtubo + corpo-de-prova) foi armazenado em estufa a 37°C com 100% de umidade durante 24 horas. Em seguida, os microtubos foram removidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Embramed, Jurubatuba, SP, Brasil). Os corpos - de - prova foram observados em lupa estereoscópica com 40 vezes de aumento para certificação de ausência de defeitos na interface adesiva.

Determinação da resistência de união por meio de teste de microcisalhamento

O ensaio mecânico de microcisalhamento foi realizado em máquina para testes mecânicos (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil), previamente ajustada para forças de tração. Para a execução do teste, foi usado um fio metálico de 0,2 mm de diâmetro laçando simultaneamente o corpo-de-prova o mais próximo possível da união material/dentina e o prolongamento da célula de carga. Os movimentos de tração foram realizados a uma velocidade de 0,5 mm/min. Os testes foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script, EMIC Equipamentos de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e prosseguiram até a fratura. Os valores de tensão máxima em MegaPascal suportada pela união dentina/material foram anotados.

Análise dos padrões de fratura

O padrão de fratura de cada espécime foi avaliado por um único examinador treinado, com o auxílio de microscópio de luz (Modelo SZX7 Olympus, São Paulo, Brasil) e aumento que permitisse a análise adequada (aproximadamente 40x). As fraturas foram classificadas como adesivas (falha entre substrato e material restaurador), coesivas em dentina ou em

material (falha em dentina ou em material, respectivamente) e mistas (combinação de falhas adesiva e coesiva). O operador desconhecia o grupo ao qual pertencia cada corpo-de-prova.

Análise dos resultados

Os dados de resistência de união (em MPa) foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variância. Como estas condições não foram obedecidas, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado para tomada de decisão foi de 5%. A análise dos padrões de fratura foi feita de forma descritiva.

Resultados

Os valores de resistência de união em função das variáveis concentração de diacetato de CLX e condição do substrato estão apresentados na Tabela 2. Na dentina afetada, dois espécimes (um do grupo CIV e outro do grupo CIV+CLX 2%) fraturaram durante a remoção da matriz plástica e foram excluídos das análises.

A condição do substrato (dentina hígida e afetada por cárie) não influenciou os valores de resistência de união imediata ($p > 0,05$). Para ambas as condições, a adição de diacetato de clorexidina ao CIV nas concentrações de 0,5% e 1% mostrou resultados de resistência de união estatisticamente semelhantes ao do grupo controle sem adição de clorexidina (CIV) ($p > 0,05$), e, todos os grupos apresentaram resistência de união superior ao grupo no qual foi adicionado o diacetato de CLX na concentração de 2% ($p \leq 0,025$), (Tabela 2).

A distribuição dos tipos de fratura para cada grupo de estudo pode ser observada na Figura 1. As fraturas coesivas e mistas foram predominantes para todos os grupos, independente da condição do substrato. Nenhuma falha coesiva foi observada na dentina.

Também pode ser observado que quando o diacetato de CLX foi adicionado ao CIV houve um aumento da porcentagem de fraturas do tipo adesiva na dentina afetada por cárie, e

este foi proporcional ao aumento da concentração. Para a dentina sadia, aumento da porcentagem de fraturas adesivas ocorreu apenas quando se utilizou o diacetato de CLX a 2%.

Discussão

A adesão é o fenômeno pelo qual duas superfícies se mantêm unidas por meio de interações químicas ou químico-físicas. Os CIVs têm como uma de suas características principais a adesão às estruturas dentais sem nenhum pré tratamento da superfície.¹⁴ No entanto, esta propriedade pode ser afetada pelas condições do substrato.^{17,18,19}

Estudos prévios mostram que os valores de resistência de união ao cisalhamento dos CIVs à dentina sadia é baixo, geralmente entre 1 e 3 MPa e raramente excedem 5 MPa.^{20,21,22} Esses valores tendem a ser mais altos nos testes de microtração devido à diferenças na distribuição do stress e redução da área adesiva, quando comparado com os testes de cisalhamento.^{23,24} No presente estudo, optou-se pela utilização do teste de microcisalhamento, com o intuito de se obter espécimes com área reduzida, sem que houvesse a necessidade de grande manipulação dos mesmos, como ocorre durante a sua obtenção para o teste de microtração. Apesar disso, as medianas de resistência de união foram inferiores a 5 MPa.

A influência da adição de diacetato de CLX em diferentes concentrações na resistência de união de um CIV de alta viscosidade foi avaliada, neste estudo, em dentina sadia e afetada por cárie. Os resultados mostraram que a condição do substrato não influenciou de forma significativa a resistência de união imediata do material, independente da adição ou não do diacetato de CLX.

Poucos trabalhos, até o momento, avaliaram a resistência de união do CIV a dentina cariada. Assim como demonstrado no presente estudo, Way et al.²⁵ (1996) usando CIV modificado por resina e Palma-Dibb et al.²⁶ (2003) usando CIVs convencionais e modificados

por resina, também não observaram diferença significativa na resistência de união à dentina cariada e à dentina sadia. Por outro lado, Choi et al.²³ (2006) usando um CIV convencional e outro modificado por resina verificaram resistência de união a microtração significativamente inferior em dentina cariada. Apesar de o mecanismo de adesão dos CIVs às estruturas dentárias ainda não estar bem elucidado, estes autores consideram que a perda de íons cálcio na dentina cariada desfavorece a adesão, uma vez que em um primeiro momento a união química dos CIVs aos tecidos mineralizados dentários envolve a quelação dos grupos carboxílicos do ácido polialcenóico com o cálcio da hidroxiapatita.²⁷

Além disso, a superfície da dentina afetada é mais porosa e capaz de reter traços de ácido láctico envolvido na lesão de cárie.^{22,28} Os CIVs reagem rapidamente com esses ácidos²⁹ e esta pode ser a razão pela qual a adesão de alguns cimentos é diferente na dentina sadia e afetada por cárie. No presente estudo, a dentina amolecida foi removida até se obter uma superfície bem resistente ao toque usando sonda exploradora afiada. Portanto, considera-se que a perda de íons cálcio nessa dentina não tenha sido suficiente para determinar redução significativa na resistência de união com o CIV. Comparando a resistência de união do CIV à dentina sadia e à dentina após processo de erosão, Cruz et al.³⁰ (2012) também não observaram diferenças estatisticamente significantes. Embora a dentina que passou por processo de erosão seja altamente desmineralizada, com baixo conteúdo de cálcio e de hidroxiapatita, esta condição não afetou a adesão do material, mas pode estar relacionada a alterações nos padrões de fratura.³⁰

Cimentos de ionômero de vidro de alta viscosidade, como o Ketac Molar Easymix foram especialmente desenvolvidos para serem usados na técnica do Tratamento Restaurador Atraumático. Esses materiais apresentam propriedades físicas com desempenho elevado⁶ quando comparados aos CIVs convencionais, no entanto tem demonstrado uma menor

liberação de flúor com relação aos CIVs convencionais.^{8,9} Uma vez que o efeito desta menor liberação de flúor sobre as bactérias residuais ainda não está bem elucidado, tem sido proposta a associação desses CIVs com agentes antimicrobianos como a clorexidina, ciprofloxacino, metronidazol e minociclina^{10,11,12,13,14} a fim de se aumentar as suas propriedades antibacterianas. Neste estudo, o diacetato CLX foi escolhido por ser a forma mais pesquisada, mais estável, não propensa à decomposição e por ser facilmente adicionada ao pó do CIV¹⁵. Misturado ao CIV nas concentrações de 0,5% e 1% apresentou resultados de resistência de união a dentina semelhantes aos do CIV sem nenhuma associação e superiores aqueles apresentados pela concentração de 2%. Estes resultados são compatíveis com aqueles obtidos no estudo de Takahashi et al.¹² (2006), no qual diferenças estatisticamente significantes na resistência de união de um CIV adicionado de várias concentrações de CLX só foram encontradas nos grupos com CLX 2% e 3%. Os autores demonstraram que a incorporação do diacetato de CLX 1% foi ótima para aumentar a atividade antibacteriana, sem afetar as propriedades mecânicas e capacidade de adesão. Jedrychowski et al.¹⁰ (1983) também relataram que a força de união de um CIV convencional à dentina não foi comprometida pela adição de CLX 1% e que grande deterioração pode ocorrer com a adição de concentrações superiores a 5%.

A adição de CLX em altas concentrações parece interferir com a liberação de flúor. Segundo Hoszek & Ericson¹¹ (2008), CIVs adicionados de CLX em concentrações de 3% liberam até 30% a menos de flúor em 60 dias do que o CIV sem CLX. Uma possível explicação é que as moléculas de CLX podem interagir com os íons flúor, resultando na precipitação de sais com baixa solubilidade e levando a menor liberação do mesmo.¹¹ Este fator, associado às propriedades catiônicas dos sais de CLX, que interferem na reação do ácido poliacrílico com as partículas de vidro,¹² pode prejudicar as propriedades mecânicas do material quando elevadas concentrações de CLX são adicionadas. Sugere-se, então, que as

propriedades mecânicas do material dependem da concentração de CLX adicionada ao mesmo, e que concentrações iguais ou superiores a 2% podem provocar uma redução significativa na resistência de união do CIV com a dentina sadia e afetada por cárie.

Análise dos Padrões de Fratura

Neste estudo, as fraturas coesivas e mistas foram predominantes. Para Cruz et al.³⁰ (2012), os padrões de fratura estão relacionados às propriedades de todos os componentes da adesão: material, interface de união e substrato, além da mecânica do teste utilizado. Maior prevalência de fraturas coesivas também foi observada em outros estudos^{10,23,26} e tem sido relacionada à baixa resistência à tração e baixa resistência coesiva dos CIVs, bem como à baixos valores de resistência de união, principalmente na dentina cariada, não representando, na maioria das vezes, a real resistência adesiva do material à dentina.²³

No presente estudo, apesar de não ter sido detectada diferença estatística significativa entre a mediana dos valores de resistência de união do CIV à dentina sadia (4,55 MPa) e à dentina afetada (3,25 MPa), a última mostrou-se numericamente inferior. Quando a adesão foi estabelecida com dentina afetada houve um aumento da porcentagem de fraturas adesivas proporcional ao aumento da concentração do diacetato de CLX adicionado ao CIV, enquanto que para a dentina sadia aumento na porcentagem de fraturas adesivas ocorreu apenas para a CLX 2%. Isso pode ser explicado por uma menor adesão do material modificado à dentina, principalmente quando esta é afetada por cárie.

Embora baixos valores de resistência adesiva tenham sido observados tanto para a dentina sadia como para a dentina afetada por cárie quando se utilizou o CIV de alta viscosidade modificado ou não pela adição de diacetato de CLX, estes resultados ainda não podem ser considerados conclusivos e mais trabalhos são necessários utilizando outros testes,

inclusive com determinação da real vantagem na redução de microrganismos determinada por essa modificação do material.

Conclusões:

A adição de diacetato de CLX nas concentrações de 0,5% e 1% não influenciou negativamente a resistência de união de um CIV de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie, podendo ser uma boa opção para melhorar a atividade antibacteriana deste cimento.

Referências

1. Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. *Quintessence Int.* 2000 Sep; 31(8):527-33.
2. Peters MC, McLean ME. Minimally invasive operative care. II. Contemporary techniques and materials: an overview. *J Adhes Dent.* 2001 Spring; 3(1):17-31.; 3: 17-31
3. Moshaverinia A, Chee WW, Brantley WA, Schricker SR. Surface properties and bond strength measurements of N-vinylcaprolactam (NVC) containing glass-ionomer cements. *J Prosthet Dent.* 2011 Mar; 105(3):185-93.
4. ten Cate JM, van Duinen RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *J Dent Res.* 1995 Jun; 74(6):1266-71.
5. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mat.* 2000 Mar;16(2):129-38.

6. Peez R, Frank S. The physical-mechanical performance of the new Ketac Molar Easymix compared to commercially available glass ionomer restoratives. *J Dent.* 2006 Sep; 34(8):582-7.
7. Frencken JE, Makoni F. A treatment technique for tooth decay in deprived communities. *World Health.*1994; 1: 15-7.
8. Gao W, Smales R J, Gale M S. Fluoride release/uptake from newer glass ionomer cements used with the ART approach. *Am J Dent.* 2000 Aug; 13(4):201-4.
9. Smales RJ, Yip HK. The atraumatic restorative treatment (ART) approach for the management of dental caries. *Quintessence Int.* 2002 Jun; 33(6):427-32.
10. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983 Sep; 10(5):373-81.
11. Hoszek A, Ericson D. In vitro fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine gluconate. *Oper Dent.* 2008 Nov-Dec;33(6):696-701.
12. 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 Mat.* 2006 22(7):647-52.
13. Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent.* 2011 Feb; 23(1):46-55.

14. Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent.* 2009 Jan-Feb; 34(1):18-23.
15. Türkun LS, Turkun 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):29-44.
16. Ricci HA, Scheffel DLS, Santos FJ, Jafelicci-Junior M, Hebling J. Influência da clorexidina na capacidade de umectabilidade da dentina hígida e afetada por cárie por um sistema adesivo. *ROBRAC.* 2011; 20 (53): 119-124.
17. Glasspole EA, Erickson RL, Davidson CL. Effect of surface treatments on bond strength of glass ionomers to enamel. *Dent Mater.* 2002 Sep; 18(6):454-62.
18. Gordan VV. Effect of conditioning times on resin-modified glass-ionomer bonding. *Am J Dent.* 2000 Feb; 13(1):13-6.
19. Kobayashi CA, Fujishima A, Miyasaki T, Kimura Y, Matsumoto K, Osada T, Fukunaga H, Kawawa T. Effect of Nd:YAG laser irradiation on shear bond strength of glass-ionomer luting cement to dentin surface. *Int J Prosthodont.* 2003 Sep-Oct; 16(5):493-8.
20. Berry EA, Powers JM. Bond strength of glass ionomers to coronal and radicular dentin. *Oper Dent.* 1994 Jul-Aug; 19(4):122-6.
21. Cattani-Lorente MA, Godin C, Meyer JM. Early strength of glass ionomer cements. *Dent Mater.* 1993 Jan; 9(1):57-62.
22. Czarnecka B, Deregowska-Nosowicz P, Limanowska-Shaw H, Nicholson JW. Shear bond strengths of glass-ionomer cements to sound and to prepared carious dentine. *J Mater Sci: Mater Med.* 2007 May; 18(5):845-9.

23. Choi K, Oshida Y, Platt JA, Cochran MA, Matis BA, Yi K. Microtensile bond strength of glass ionomer cements to artificially created carious dentin. *Oper Dent*. 2006 Sep-Oct; 31(5):590-7.
24. Garcia FCP, Terada RSS, Carvalho RM. Testes mecânicos para a avaliação laboratorial da união resina /dentina. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002; 10(3): 118-27.
25. Way JL, Caputo AA & Jedrychowski JR. Bond strength of light-cured glass ionomers to carious primary dentin. *J Dent Child*. 1996 Jul-Aug; 63(4):261-4.
26. Palma-Dibb RG, de Castro CG, Ramos RP, Chimello DT , Chinelatti MA. Bond strength of glass-ionomer cements to carious-affected dentin. *J Adhes Dent*. 2003 Spring; 5(1):57-62.
27. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellemans L, Lambrechts P, et al. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res*. 2000 Feb; 79(2):709-14.
28. Sano H. Relationship between caries detector staining and structural characteristics of carious dentin. *J. Stomatol. Soc. Jpn*. 1987 Mar; 54(1):241-70.
29. Nicholson JW, Aggarwal A, Czarnecka B, Limanowska-Shaw H. The rate of change of pH of lactic acid exposed to glass-ionomer dental cements. *Biomaterials*. 2000 Oct; 21(19):1989-93.
30. Cruz JB, Lenzi TL, Tedesco TK, Guglielmi Cde A, Raggio DP. Eroded dentin does not jeopardize the bond strength of adhesive restorative materials. *Braz Oral Res*. 2012 Jul-Aug; 26(4):306-12.

Tabela 1- Nome comercial, fabricante, classificação e principais componentes dos materiais usados no estudo

Nome Comercial (Fabricante)	Classificação	Composição (porcentagem em peso)
Ketac Molar Easymix (3M- ESPE Dental Products, St Paul, MN,EUA)	CIV de alta viscosidade	Pó: pó de vidro (cristais de flúor- aluminio-silicato) 85%-95 %; ácido poliacrílico 5%-15%. Líquido: água - 55%-65%; ácido polietileno policarbonico - 25%- 35%; ácido tartárico - 5%-10%.
Diacetato de Clorexidina (Sigma Aldrich,Steinheim, Alemanha)	Antibacteriano	Diacetato de Clorexidina - 98%

Tabela 2 - Resistência de união (MPa) em função da concentração de diacetato de clorexidina (CLX) adicionada ao cimento de ionômero de vidro (CIV) e da condição do substrato

Substrato	Material			
	CIV	CIV+CLX0,5%	CIV+CLX1%	CIV+CLX2%
Dentina Sadia	4,55 (3,30-5,77)Aa n=10	4,70 (2,27-6,28)Aa n=10	4,62 (3,01-6,68)Aa n=10	2,42 (1,79-3,23)Ab n=10
Dentina Afetada	3,25 (2,36-3,94)Aa n= 9	3,96 (1,98-5,89)Aa n=10	3,62 (3,30-3,74)Aa n=10	2,15 (1,44-2,50)Ab n=9

Valores correspondem a mediana, percentil 25 e percentil 75

Letras maiúsculas diferentes denotam diferença estatisticamente significativa na comparação entre linhas e letras minúsculas diferentes denotam diferença estatisticamente significativa na comparação entre colunas (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Análise do biofilme formado *in situ* sobre o
Cimento de ionômero de vidro com diferentes
concentrações de diacetato de clorexidina

Resumo

Introdução: A adesão bacteriana ocorre de diferentes formas nos materiais restauradores utilizados em Odontologia. A clorexidina (CLX) tem sido associada à esses materiais com a finalidade de aumentar suas propriedades antibacterianas.

Objetivo: este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a composição microbiana do biofilme formado sobre um CIV de alta viscosidade ao qual foi adicionado diacetato de CLX em diferentes concentrações. **Materiais e Métodos:** A CLX foi misturada ao pó do CIV nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%. O CIV sem CLX foi usado como controle. Voluntários (n=8) usaram dispositivos palatinos contendo espécimes medindo 4 mm de diâmetro por 1 mm de espessura. Os materiais foram testados por todos os voluntários na ordem crescente de concentração de CLX por um período de 7 dias e com intervalo de descanso de 15 dias entre elas. O biofilme formado sobre os espécimes foi coletado e analisado. Os dados referentes às contagens de microrganismos anaeróbios totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Houve diferença entre as médias de contagem de microrganismos apenas para o lactobacilos ($p < 0,05$), sendo estas significativamente maiores para o grupo CIV+CLX 2% do que para os grupos CIV e CIV+CLX 0,5%. **Conclusões:** Pode-se concluir que a adição de CLX nas concentrações estudadas não melhorou a propriedade antibacteriana do CIV.

Palavras chave: clorexidina; cimentos de ionômeros de vidro; biofilme

Introdução

O estudo sobre os diversos microrganismos presentes na cavidade oral tem se mostrado um real desafio aos pesquisadores. No entanto, o conhecimento sobre essas espécies evoluiu muito desde a sua primeira observação. O biofilme dental é atualmente descrito como uma comunidade bacteriana estruturada embebida em uma matriz de polímeros originários das próprias bactérias e da saliva (de Fúcio et al.¹³, 2009). Estes microrganismos se aderem às superfícies duras da cavidade oral, como o esmalte, implantes e materiais restauradores (de Fúcio et al.¹³, 2009; Steinberg, Eyal²⁹, 2002), por meio de um mecanismo complexo que se inicia com a colonização primária de cocos Gram-positivos, principalmente *Streptococcus* do grupo *mutans* (Nyvad, Killian.¹⁸, 1987; Nyvad, Killian.¹⁹, 1990). Receptores presentes nas membranas dessas bactérias permitem que microrganismos Gram negativos que não possuem capacidade de adesão direta ao dente realizem um processo denominado co-adesão (Sbordone, Bortolaia²⁵, 2003). Com o passar do tempo e o aumento no número desses microrganismos, ocorre a formação de um gradiente de oxigênio nas camadas mais internas do biofilme que propicia um ambiente favorável à multiplicação de microrganismos anaeróbios estritos (Almeida et al.², 2006).

O processo de adesão bacteriana ocorre de diferentes formas nos materiais restauradores utilizados em Odontologia. Os CIVs, por exemplo, possuem entre outras vantagens, características que permitem a inibição da aderência e crescimento bacteriano, como o baixo pH inicial e a liberação de constituintes encontrados no pó do material como alumínio, cálcio, magnésio e flúor (Ribeiro, Ericson.²⁴, 1991; Seppa et al.²⁶, 1992). Neste material, a formação do biofilme ocorre

principalmente devido à sua aumentada rugosidade superficial com relação aos outros materiais restauradores (Smales²⁷, 1981).

Com a evolução no campo dos materiais restauradores, houve o desenvolvimento dos CIVs de alta viscosidade, que são de fácil manipulação e possuem propriedades físicas melhoradas (Peez, Frank²³, 2006). Devido a todas essas vantagens, esses cimentos têm sido indicados principalmente para o uso na técnica do Tratamento Restaurador Atraumático (TRA). Estudos demonstram, no entanto, que estes materiais apresentam menor liberação de flúor do que os cimentos convencionais (Smales, Yip²⁸, 2002), o que justifica a adição de um agente antibacteriano que auxilie na redução da formação de biofilme sobre os mesmos.

Vários agentes antibacterianos têm sua efetividade testada contra os principais microrganismos responsáveis pelas doenças cárie e periodontal. A clorexidina (CLX) na sua forma líquida ou em pó tem mostrado grande efetividade contra certos microrganismos nas concentrações de 1% a 5% em estudos in vitro (Botelho⁵, 2003; Botelho⁶, 2005). No entanto, as condições da microflora bacteriana do biofilme na cavidade oral são diferentes daquelas encontradas in vitro, o que aumenta o interesse por estudos nos quais o biofilme possa se desenvolver sob condições que se aproximem da realidade.

Sendo assim, este estudo objetivou analisar a composição microbiológica do biofilme formado in situ sobre um CIV de alta viscosidade após a adição de diacetato de clorexidina em diferentes concentrações.

Materiais e Métodos

Delineamento Experimental

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Parcer nº113.850 de 03/10/2012) (Anexo 2) e consistiu de um experimento cego, *in situ* conduzido em 4 fases de 7 dias cada e com intervalo de 15 dias entre uma e outra fase.

Para a realização do mesmo, foram selecionados oito voluntários (n=8) que utilizaram dispositivos acrílicos palatinos contendo 4 espécimes circulares (2 de cada lado) medindo 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, todos do mesmo grupo experimental. Os grupos foram assim constituídos: CIV (Controle); CIV + CLX 0,5; CIV + CLX 1%; CIV + CLX 2%.

No final de cada fase, o biofilme formado sobre cada um dos espécimes de cada dispositivo palatino foi analisado quanto à quantidade de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e *Lactobacillus* spp.

Seleção dos Voluntários

Para participar da pesquisa, os candidatos tiveram que preencher os seguintes pré-requisitos: residir em Araraquara; ter entre 25 e 35 anos; apresentar boa saúde geral e bucal, bem como fluxo salivar não estimulado normal. Os critérios de não inclusão foram: uso de medicamentos ou alterações fisiológicas que modificassem o fluxo salivar; uso de antibióticos nos últimos 3 meses; etilistas e fumantes; edentados e portadores de prótese; uso de aparelho ortodôntico e placas miorelaxantes. Os critérios de exclusão durante o experimento foram: desistência voluntária; alteração do quadro de saúde com consequente alteração do fluxo salivar

ou necessidade do uso de antibióticos; uso de soluções para bochechos orais ou dentifrícios fluoretado e descumprimento do delineamento experimental.

Confecção dos espécimes e dos dispositivos palatinos

O material testado foi um CIV de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix - 3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) com adição de diacetato de CLX (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). A quantidade em peso de diacetato de CLX necessária para se obter as concentrações finais de 0,5%, 1% e 2% foram determinadas tomando-se como base o peso médio de uma colher medida do pó do CIV. A proporção pó-líquido em peso recomendada pelo fabricante do cimento de ionômero de vidro foi mantida. A manipulação do material foi realizada conforme as indicações do fabricante (3M – ESPE Dental Products, St. Paul, MN,EUA), em ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Imediatamente após a mistura, os materiais foram introduzidos com o auxílio de seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio S.A., Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil) em matrizes de silicone medindo 4 mm de diâmetro interno e 1 mm de altura. Sobre a superfície do material, foram colocadas uma tira matriz de poliéster, uma lâmina de vidro de 1 mm de espessura e um peso de 1 kg, por um período de 30 segundos, para auxiliar na eliminação dos excessos de material e garantir uma superfície plana e lisa. Após a presa do material, os espécimes foram removidos das matrizes, e permaneceram em estufa com 100% de umidade a 37°C durante 24 horas.

Os voluntários tiveram o arco superior moldado e os dispositivos palatinos foram confeccionados em resina acrílica (Jet – Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil) sobre os modelos de gesso. Nestes dispositivos foram confeccionados dois nichos de cada lado, onde os espécimes foram fixados com

cera pegajosa. Estes foram cobertos com tela plástica (peneira grande, ref. 0041, Plásticos Gonçalves Ltda., São Paulo, Brasil), fixada com resina acrílica, deixando um espaço de 1 a 2 mm para permitir que o biofilme se acumulasse sobre o espécime protegido da perturbação mecânica.

Experimento *in situ*

Após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar da pesquisa (Apêndice 1), os oito voluntários selecionados foram orientados a não utilizar nenhum produto fluoretado (exceto água) ou solução antimicrobiana durante o período experimental, a utilizar o dispositivo durante todo o dia (inclusive para dormir), exceto às refeições, manter seus hábitos dietéticos normais e não escovar os espécimes durante todo o experimento. Dentifrício sem fluoreto (Cocóricó, Bitufo, Itupeva, SP, Brasil) foi fornecido pelos pesquisadores e foi utilizado a partir de uma semana antes do início do experimento até o final deste. Os voluntários foram orientados também a gotear solução de sacarose 20%, oito vezes (Aires et al.¹, Brighenti et al.⁷, Tenuta et al.³²) ao dia sobre os espécimes (Apêndice 2).

Todos os voluntários participaram das quatro etapas do experimento. Em cada etapa, foram fixados no dispositivo espécimes pertencentes ao mesmo grupo, com concentrações crescentes de CLX (CIV, CIV + CLX 0,5%, CIV+ CLX 1%, CIV + CLX 2%), de forma a minimizar o efeito da substantividade da clorexidina na fase subsequente. Entre uma etapa e outra, houve um período de descanso de 15 dias, no qual os voluntários não usaram os dispositivos palatinos. Novos espécimes foram confeccionados e fixados nos dispositivos palatinos para cada etapa do experimento.

Análise microbiológica do biofilme

Ao final de cada fase do experimento, a tela plástica que recobria os espécimes foi removida e os biofilmes foram coletados e pesados. Os biofilmes foram re-suspensos em solução fosfatada salina (PBS: NaCl 0,138 M, KCl 2,7 mM, pH 7.4) 1 mL PBS/ mg de biofilme e sonicados no gelo com auxílio de um disruptor de células (Sonicador Unique, Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil) com 500 W de potência na amplitude de 20% e com a realização de seis pulsos de 5 segundos cada. As suspensões foram seqüencialmente diluídas e inoculadas em duplicata nos seguintes meios de cultura: Ágar BHI (Brain Heart Infusion- HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) para análise de microrganismos totais; Ágar Mitis Salivarius (Hi Media Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) para análise de estreptococos totais; Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (Hi Media Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) suplementado com 0.25U/mL de bacitrina e 20% de sacarose para análise de estreptococos do grupo mutans e Ágar Rogosa (Hi Media Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, Índia) para análise de *Lactobacillus* spp.

As placas de BHI foram incubadas a 37°C em condições de microaerofilia por 24 horas e as de Ágar Mitis Salivarius, Ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (MSBS), e Ágar Rogosa foram incubadas nas mesmas condições por 48 horas. Em seguida, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de um contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix Indústria de Equipamentos Científicos, Araraquara, SP, Brasil). No caso de dúvida na identificação das colônias de estreptococos do grupo mutans foram observadas as características morfotintoriais por meio da coloração de Gram. Colônias típicas do grupo mutans são escuras com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com aspecto

rugoso, com ou sem presença de uma gota na superfície, constituída por cocos Gram - positivos dispostos em cadeias. Os dados foram convertidos em UFC/ mg de peso úmido.

Metodologia estatística

A avaliação dos quatro grupos experimentais deste estudo, quanto às contagens de cada microrganismo, em UFC/mg, foi realizada por uma análise de variância de medidas repetidas. Essa foi complementada, quando necessário, por comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey. As contagens de microrganismos foram transformadas em logaritmos para viabilizar a análise de variância, tendo sido adotado o nível de significância de 5% para a tomada de decisão. Além disso, construíram-se intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais, os quais permitem estimar a precisão sobre as médias obtidas.

Resultados

Na Tabela 1 são apresentadas as médias e desvios padrão de logaritmos de contagens de microrganismos em UFC/mg, para cada grupo experimental (CIV- controle, CIV + CLX 0,5%, CIV + CLX 1% e CIV + CLX 2%), de acordo com o microrganismo em estudo: microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e lactobacilos.

As análises de variância somente apontaram diferença significativa entre médias de grupos para o lactobacilos ($p < 0,05$). O resultado da aplicação do teste de Tukey para identificar as médias de grupos diferentes entre si está resumido na Tabela 1. Observa-se que as médias de contagens de lactobacilos aumentaram conforme o aumento da concentração de diacetato de CLX. Entretanto, por procedimentos estatísticos, somente na concentração de 2% a média de contagens

se mostrou significativamente maior do que a média na concentração de 0,5% e do controle (CIV sem CLX).

Na Figura 1 estão representadas graficamente as médias amostrais de contagens de microrganismos em UFC/mg, juntamente com intervalos de confiança de 95%. Esses intervalos fornecem estimativas da precisão sobre as médias, além de permitirem quantificar as diferenças entre médias apontadas pelos critérios estatísticos.

Tabela 1 – Média (Desvio padrão) de logaritmos de contagens de microrganismos em UFC/mg de biofilme formado sobre o cimento de ionômero de vidro (CIV) contendo diferentes concentrações de diacetato de clorexidina (CLX)

Grupo	Microrganismos				
	Lactobacilos ¹		S. mutans ²	S. totais ²	Micr. totais ²
CIV	3,36 (1,28)	a	5,77 (0,88)	6,84 (0,34)	6,67 (0,27)
CIV+CLX 0,5%	3,55 (1,05)	a	5,97 (0,91)	6,67 (0,36)	6,69 (0,29)
CIV+CLX 1%	4,39 (1,06)	ab	5,97 (0,53)	6,90 (0,40)	6,77 (0,42)
CIV+CLX 2%	5,13 (1,16)	b	6,39 (0,59)	6,75 (0,41)	6,63 (0,50)

¹Médias com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

²Não houve evidência de diferença significativa entre médias pela Anova

al.³,2008; Busscher et al.⁸, 2010;). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da adição de CLX ao CIV utilizando um modelo in situ.

Vários estudos in vitro têm analisado as propriedades antibacterianas dos CIVs associados à CLX utilizando testes de difusão em ágar (Botelho⁵, 2003; de Castilho et al.⁹, 2013; Hoszek, Ericson¹⁵, 2008; Ribeiro, Ericson²⁴, 1991; Türkun et al.³³, 2008; Takahashi et al.³⁰, 2006). Estes mostraram que a mistura apresentou-se efetiva na redução de microrganismos, usando concentrações de CLX que variaram de 0,5 a 10%. Contudo, a adição da CLX na concentração de 2% ou superior altera importantes propriedades físicas e mecânicas do material, como a resistência à compressão, o tempo de presa, a dureza superficial e a resistência de adesão à dentina (de Castilho et al.⁹, 2013; Palmer et al.²², 2004; Takahashi et al.³⁰, 2006; Türkün et al.³³, 2008). Por esse motivo, a concentração máxima de CLX utilizada no presente estudo foi de 2%. No entanto, observou-se que, embora concentrações de até 2% tenham resultado em uma boa atividade antimicrobiana in vitro (Takahashi et al.³⁰, 2006. Deepalaskshmi et al.¹¹, 2010), essa concentração não é capaz de reduzir significativamente a quantidade de bactérias no biofilme formado in situ. A principal diferença entre os estudos in vitro e o presente trabalho é que os primeiros avaliaram a atividade antimicrobiana por meio do teste de difusão em ágar, um teste que apenas permite uma avaliação preliminar. A melhor maneira de se comprovar a atividade antimicrobiana de um material é por meio da utilização de microrganismos organizados em biofilmes, um arranjo que se aproxima mais da realidade do ambiente da cavidade bucal. Segundo ten Cate³¹, 2006, microrganismos organizados em biofilmes possuem comprovadamente maior resistência a agentes antimicrobianos do que aqueles em suspensão.

Os estudos *in vivo* realizados para avaliar os efeitos antibacterianos da adição de clorexidina aos CIVs mostraram redução do número de colônias de microrganismos aeróbios e anaeróbios sobre a dentina afetada (de Castilho et al.⁹, 2013; Frencken et al.¹², 2007), o que limita a comparação com os resultados do presente trabalho, que avaliou o biofilme formado na superfície do material.

Desse modo, antes da realização de estudos clínicos que demandam a participação de um número maior de voluntários e um custo maior de execução, é importante comprovar a ação antimicrobiana da adição de CLX ao CIV utilizando modelos de estudo que mimetizem as condições encontradas na cavidade bucal. O modelo de estudo *in situ* é uma excelente opção para essa finalidade, pois representa um nível de pesquisa intermediário entre os estudos *in vitro* e *in vivo*, e são de grande importância, por serem desenvolvidos em condições muito próximas da realidade. Não observamos na literatura consultada, estudos *in situ* avaliando a composição biológica do biofilme formado sobre CIVs associados à CLX. O modelo escolhido para este estudo tem sido amplamente utilizado na análise da composição biológica e bioquímica do biofilme, sendo considerado adequado para avaliar agentes antibacterianos sob condições de alto desafio cariogênico (Aires et al.¹, 2008; Brighenti et al.⁷, 2012; Tenuta et al.³², 2009)

A análise microbiológica do biofilme formado sobre o material após um período de 7 dias na cavidade oral mostrou que não houveram diferenças significativas entre os grupos CIV (controle), CIV + CLX 0,5% , CIV + CLX 1% e CIV + CLX 2% quando foram analisadas as quantidades de microrganismos anaeróbios totais, estreptococos totais e esteptococos do grupo mutans. Portanto, a adição de CLX não determinou aumento da atividade antibacteriana independente da

concentração. A ausência da relação dose-resposta já foi anteriormente relatada por Jedrychowski et al.¹⁶ (1983) e Takahashi et al.³⁰ (2006).

A semelhança do presente estudo, Takahashi et al.³⁰ (2006), usaram um CIV de alta viscosidade, que apresenta aumentada dureza superficial em ambiente úmido quando comparado com o CIV convencional (Okada et al.²⁰, 2001). Essas características (alta viscosidade e dureza superficial) do material interferem com a liberação de flúor (Smales, Yip²⁸, 2002) e também podem limitar a liberação de CLX, independente do sal utilizado e da concentração adicionada (Takahashi et al.³⁰, 2006).

Por outro lado, alguns autores (Botelho⁵, 2003; Deepalakshmi et al.¹¹, 2010; Ribeiro, Ericson²⁴, 1991; Türkun et al.³³, 2008), observaram que a atividade antimicrobiana dos CIVs associados à CLX foi concentração-dependente. Todos estes estudos, no entanto, usaram o teste de difusão em ágar, método que não permite a distinção entre os efeitos bactericida e bacteriostático do agente antimicrobiano. Além disso, este teste não consegue simular condições próximas da situação clínica, na qual múltiplas espécies de bactérias crescem em biofilmes extremamente complexos (Deepalakshmi et al.¹¹, 2010; Türkun et al.³³, 2008;).

Neste estudo, a ação antibacteriana dos materiais foi testada sobre microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos, sendo os dois últimos intimamente relacionados com o início e a progressão da lesão de cárie, respectivamente (Türkun et al.³³, 2008). Os lactobacilos têm se mostrado mais resistentes aos efeitos dos CIVs (Herrera et al.¹⁴, 1999; Palenik et al.²¹, 1992) e, segundo de Castilho et al.⁹ (2013), *L. acidophilus* foi o microrganismo mais resistente ao CIV contendo digluconato de CLX.

A média de contagens do número de colônias de lactobacilos aumentou de forma estatisticamente significativa, quando os espécimes de CIV contendo 2% de CLX, foram comparados com o CIV sem CLX e com o CIV + CLX 0,5%. Uma possível explicação para esse aumento é que as moléculas catiônicas de CLX reagem com ânions presentes no CIV, como fosfatos, silicatos e flúor, resultando na precipitação de sais de baixa solubilidade (Barkvoll et al.⁴, 1988; Ribeiro, Ericson²⁴, 1991). Essa precipitação provoca uma diminuição na disponibilidade tanto da CLX como dos íons flúor, resultando em uma redução dos efeitos inibidor de desmineralização e antibacteriano. Os resultados deste trabalho diferem daqueles observados por Botelho⁵, (2003) e Türkun et al.³⁰,(2008). Além de esses dois estudos terem utilizado o teste de difusão em ágar, cujas limitações já foram discutidas, o modelo de estudo in situ usado neste estudo permite que o biofilme formado sobre os espécimes fique protegido de distúrbios mecânicos. Além disso, os espécimes sofrem ação da saliva, responsável pela remoção de substâncias da cavidade bucal (Wiegand et al.³⁴, 2007), o que pode dificultar a manutenção de concentrações efetivas do agente antibacteriano.

O presente estudo traz importantes informações sobre a limitada atividade antimicrobiana da adição de CLX ao CIV. Como ainda existem muitas controvérsias na literatura com relação à efetividade antibacteriana, bem como em relação às alterações que a adição de CLX pode estabelecer na estrutura do material, outros estudos devem ser desenvolvidos para otimizar a adição de clorexidina a materiais odontológicos e melhorar sua liberação, tomando o cuidado de utilizar modelos cada vez mais próximos da realidade clínica.

Conclusões:

Considerando os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que a adição de diacetato de CLX ao CIV de alta viscosidade não aumentou a atividade antibacteriana do CIV, independente da concentração utilizada.

Referências

1. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008; 42(5):380-6.
2. Almeida VG, Trein PM, Oppermann RV, Rosing CK. Formação in situ de biofilme sobre esmalte e cimento de ionômero de vidro em diferentes tensões de oxigênio. *Rev Odonto Ciênc.* 2008; 23(1): 48-52.
3. Al-Naimi OT, Itota T, Hobson RS, McCabe JF. Fluoride release for restorative materials and its effect on biofilm formation in natural saliva. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(3):1243-8.
4. Barkvoll P, Rølla G, Bellagamba S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96(1):30-3.

5. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res* 2003; 37(2):108 -14.
6. Botelho MG. The antimicrobial activity of a dentin conditioner combined with antibacterial agents. *Oper Dent* 2005; 30(1):75–82.
7. Brighenti FL, Gaetti-Jardim E Jr, Danelon M, Evangelista GV, Delbem AC. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(8):1034-40.
8. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res.* 2010; 89(7):657-65.
9. de 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; 41(2):155-63.
10. Czarnecka B, Limanowska-Shaw H, Nicholson JW. Buffering and ion-release by a glass-ionomer cement under near-neutral and acidic conditions. *Biomaterials.* 2002; 23(13):2783-8.
11. Deepalakshmi M, Poorni S, Miglani R, Rajamani I, Ramachandran S. Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: an in-vitro study. *Indian J Dent Res.* 2010; 21(4):552-6.
12. Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, Ebisu S. Antibacterial effect of chlorhexidine- containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study. *Caries Res.* 2007; 41(2):102-7.

13. de Fúcio SB, Puppini-Rontani RM, de Carvalho FG, Mattos-Graner Rde O, Corrêa-Sobrinho L, Garcia-Godoy F. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent.* 2009; 22(3):131-6.
14. Herrera M, Castillo A, Baca P, Carrión P. Antibacterial activity of glass-ionomer restorative cements exposed to cavity-producing microorganisms. *Oper Dent.* 1999; 24(5):286-91.
15. Hoszek A, Ericson D. In vitro fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine gluconate. *Oper Dent.* 2008; 33(6): 696-701.
16. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983; 10(5): 373-81.
17. Nakajo K, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Ebisu S, Takahashi N. Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. *Dent Mater.* 2009; 25(6):703-8.
18. Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res.* 1987; 95(5):369-80.
19. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 1990; 24(4):267-72.
20. Okada K, Tosaki S, Hirota K, Hume WR. Surface hardness change of restorative filling materials stored in saliva. *Dent Mater.* 2001;17(1):34-9.
21. Palenik CJ, Behnen MJ, Setcos JC, Miller CH. Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers in vitro. *Dent Mater.* 1992; 8(1):16-20.
22. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004; 25(23):5423-31.

23. Peez R, Frank S. The physical-mechanical performance of the new Ketac Molar Easymix compared to commercially available glass ionomer restoratives. *J Dent.* 2006; 34(8): 582-7.
24. Ribeiro J, Ericson D. *In vitro* antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res.* 1991; 99(6): 533-40.
25. Sbordone L, Bortolaia C. Oral Microbial Biofilms and Plaque-Related Diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig.* 2003; 7(4): 181-8.
26. Seppa L, Torppa-Saarinen E, Luoma H. Effect of different glass ionomers on the acid production and electrolyte metabolism of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Caries Res.* 1992; 26 (6):434-8.
27. Smales RJ. Plaque growth on dental restorative materials. *J Dent.* 1981; 9 (2): 133-40.
28. Smales RJ, Yip HK. The atraumatic restorative treatment (ART) approach for the management of dental caries. *Quintessence Int.* 2002; 33 (6):427-32.
29. Steinberg D, Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent.* 2002; 30(1):47-51.
30. 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 Mat.* 2006; 22(7): 647-52.
31. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.* 2006; 94(1):1-9.
32. Tenuta LM, Cenci MS, Cury AA, Pereira-Cenci T, Tabchoury CP, Moi GP, Cury JA. Effect of a calcium glycerophosphate fluoride dentifrice formulation on enamel demineralization in situ. *Am J Dent.* 2009; 22(5):278-82.

33. Türkun LS, Türkun 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): 29-44.
34. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater.* 2007; 23(3):343-62.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por materiais que apresentem características que favoreçam a redução dos microrganismos cariogênicos e uma maior longevidade das restaurações tem resultado no desenvolvimento de produtos com propriedades físicas e antibacterianas superiores.

Os cimentos ionômero de vidro (CIVs) são um exemplo de material restaurador amplamente utilizado após a remoção da dentina infectada. Esses cimentos apresentam reação de presa ácido-base entre as partículas de flúor-alumínio-silicato de vidro e o ácido poliacrílico, resultando em uma estrutura dimensionalmente estável, com adequada adesão à estrutura dentária, reduzida microinfiltração e capacidade de liberar vários íons, entre eles o flúor que apresenta efeito remineralizador e potencial impacto no biofilme que se forma sobre a restauração (Auschill et al.², 2002; Nakajo et al.¹⁸, 2009).

Entretanto, a liberação de flúor apresenta um pico inicial entre 1,6 e 1,8 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$, seguido de uma baixa liberação por um longo período de tempo (Wiegand et al.²⁷, 2007). Esta liberação, segundo Al-Naimi et al.¹ (2008) e Busscher et al.⁵ (2010) pode não ser suficiente para promover uma redução significativa no crescimento bacteriano e na formação de biofilme. Desta forma, torna-se de grande importância associar aos CIVs, agentes que possam aumentar a sua capacidade de inibição do crescimento bacteriano.

A incorporação da clorexidina (CLX) como agente antibacteriano parece ser promissora, visto que trabalhos usando testes de difusão em ágar mostraram sua eficácia em inibir o crescimento bacteriano (Hoszek, Erickson¹⁴, 2008; Ribeiro, Erickson²⁰, 1991; Takahashi et al.²², 2006; Türkun et al.²³, 2008). Este agente é

geralmente adicionado aos CIVs nas formas de digluconato e diacetato, e três principais efeitos podem ser observados quando esses sais são incorporados ao material: (1) pequena proporção (entre 3 e 10%) da CLX incluída é liberada (Palmer et al.¹⁵, 2004), (2) a CLX tem uma grande liberação inicial, seguida de uma drástica redução, provavelmente devido à exaustão da CLX livre no interior do cimento (Palmer et al.¹⁹, 2004) e; (3) as propriedades físicas do material são afetadas (Jedrychowski et al.¹⁵, 1983; Takahashi et al.²², 2006; Türkun et al.²³, 2008). No primeiro trabalho deste estudo, foi verificado que o diacetato de CLX a 2% determina uma redução significativa na resistência adesiva do CIV Ketac Molar Easymix à dentina, mostrando que a concentração é um fator limitante neste processo.

Com relação à atividade antibacteriana contra bactérias cariogênicas, Takahashi et al.²² (2006) observaram que a adição de CLX ao CIV aumentou a atividade antibacteriana, mas o tamanho das zonas de inibição não estava relacionado com a concentração e nem com o grau de solubilidade do sal de CLX. Além disso, verificaram que não existia diferença significativa na concentração de CLX liberada, independente da concentração incorporada ao cimento. Esses resultados concordam com aqueles obtidos por Jedrychowski¹⁵ (1983), e conflitam com outros trabalhos (Botelho⁴, 2003; Ribeiro, Ericson²⁰, 1991; Türkun et al.²³, 2008), que mostraram uma relação dose-resposta entre a atividade antibacteriana, e a concentração e o sal de CLX usado.

No estudo in situ, não constatamos diferença na atividade antibacteriana contra microrganismos totais, estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans quando o diacetato de CLX foi adicionado ao Ketac Molar Easymix em diferentes concentrações. Uma explicação para esse achado é o fato deste ser um CIV de alta

viscosidade e dureza, que pode determinar a liberação de limitada quantidade de CLX independente da concentração que é adicionada ao material (Takahashi et al.²², 2006). Além disso, a saliva atua fazendo um *wash-out* (Wiegand et al.²⁷, 2007), o que pode dificultar a manutenção de concentrações efetivas do agente antibacteriano na cavidade bucal.

As moléculas de CLX também podem interferir com a reação entre o ácido poliacrílico e o pó de vidro, alterando a lixiviação de íons e causando um colapso na estrutura do cimento, o que é mais evidente em maiores concentrações de CLX (Palmer et al.¹⁹, 2004; Takahashi et al.²², 2006). Somado a isso, existe uma interação entre a molécula catiônica da CLX com o silicato, o fosfato e o flúor, resultando na precipitação de sais de baixa solubilidade (Barkvoll et al.³, 1988; Ribeiro, Ericson²⁰, 1991). Desta forma, tanto a CLX como os íons flúor ficam menos disponíveis e, portanto, a sua liberação é menor, causando a redução dos efeitos inibidor de desmineralização e antibacteriano. Isso pode ser uma possível explicação para o fato de termos observado um aumento na contagem de lactobacilos no CIV contendo CLX 2% quando comparado com CIV original.

Embora no presente estudo a concentração de CLX nas concentrações de 0,5% a 2%, ao CIV de alta viscosidade não tenha aumentado sua atividade antibacteriana, ainda há muitas controvérsias na literatura com relação a este assunto. Portanto, mais pesquisas são necessárias para otimizar a incorporação de CLX ao CIV antes que estudos in vivo possam comprovar os reais benefícios dessa mistura para a sua posterior indicação para uso clínico.

REFERÊNCIAS

Referências*

1. Al-Naimi OT, Itota T, Hobson RS, McCabe JF. Fluoride release for restorative materials and its effect on biofilm formation in natural saliva. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(3):1243-8.
2. Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110(1):48-53.
3. Barkvoll P, Rølla G, Bellagamba S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96(1):30-3.
4. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res.* 2003; 37(2):108–14.
5. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res.* 2010; 89(7):657-65.
6. Cardoso MV, Delmé KI, Mine A, Neves Ade A, Coutinho E, De Moor RJ, Van Meerbeek B. Towards a better understanding of the adhesion mechanism of resin-modified glass-ionomers by bonding to differently prepared dentin. *J Dent.* 2010; 38(11): 921-9.
7. Deepalakshmi M, Pooni S, Miglani R, Rajamani I, Ramachandran S. Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: an in-vitro study. *Indian J Dent Res.* 2010; 21(4): 552-6.

8. Dunne SM, Goolnik JS, Millar BJ, Seddon RP. Caries inhibition by a resin-modified and a conventional glass ionomer cement, in vitro. *J Dent.* 1996; 24 (1-2): 91-4.
9. Exterkate RA, Damen JJ, Ten Cate JM. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro. *Caries Res.* 2005; 39 (6):509-13.
10. Frencken JE, Makoni F. A treatment technique for tooth decay in deprived communities. *World Health.* 1994; 1(2):15-7.
11. Gao W, Smales RJ, Gale MS. Fluoride release/uptake from newer glass ionomer cements used with the ART approach. *Am J Dent.* 2000; 13(4): 201-4.
12. Hamilton I, Bowden G. Effect of fluoride on oral microorganisms. In: Ekstrand J, Fejerskov O, Silverstone LM. *Fluoride in dentistry.* Copenhagen: Munksgard; 1988. p. 77-103.
13. Herrera M, Castillo A, Baca P, Carrion P. Antibacterial activity of glass-ionomer restorative cements exposed to cavity-producing microorganisms. *Oper Dent.* 1999; 24(5): 286-9.
14. Hoszek A, Ericson D. In vitro fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine gluconate. *Oper Dent.* 2008; 33(6): 696-701.
15. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983; 10(5): 373-81.
16. Massara MLA, Alves JB, Brandão PRG. Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Res.* 2002; 36(6): 430-6.

17. Moshaverinia A, Chee WW, Brantley WA, Schricker SR. Surface properties and bond strength measurements of N-vinylcaprolactam (NVC)-containing glass-ionomer cements. *J Prosthet Dent.* 2011; 105(3): 185-93.
18. Nakajo K, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Ebisu S, Takahashi N. Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. *Dent Mater.* 2009; 25(6):703-8.
19. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004; 25(23):5423-31.
20. Ribeiro J, Ericson D. In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res.* 1991; 99(6): 533-40.
21. Smales RJ, Yip HK. The atraumatic restorative treatment (ART) approach for the management of dental caries. *Quintessence Int.* 2002; 33(6):427-32.
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 Mat.* 2006; 22(7): 647-52.
23. Türkun LS, Trkun 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): 29-44.
24. Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent.* 2011; 23(1):46-55
25. Van Amerongen WE. Dental caries under glass ionomer restorations. *Public Health Dent.* 1996; 56(3):150-4.

26. Weerheijm KL, Groen HJ. The residual caries dilemma. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999; 27(6): 423-30.
27. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater.* 2007; 23(3):343-62.
28. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mat.* 2000; 1 (2): 129-38.
29. Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent.* 2009; 34(1): 18-23.

APÊNDICES

Apêndice 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que _____ eu, (nome) _____, (nacionalidade) _____, portador do RG nº _____, residente à _____, na cidade de _____, Estado de _____, participarei voluntariamente da pesquisa “Efeito da adição de Clorexidina nas propriedades de adesão e antibacterianas de um Cimento de Ionômero de Vidro de alta viscosidade” e declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

Fui esclarecido que a referida pesquisa tem por objetivo estudar a composição bioquímica e biológica do biofilme formado sobre o Cimento de Ionômero de Vidro com diferentes concentrações de clorexidina. Para isso, cada participante da pesquisa passará por um exame clínico odontológico de rotina, será submetido à análise do fluxo salivar não estimulado além de responder à um questionário para que sejam avaliadas as condições gerais de saúde. Permito que sejam realizados esses procedimentos para o desenvolvimento da pesquisa. Sei que o participante não sofrerá por passar pelo exame clínico e que não há nenhum risco para o mesmo.

Fui esclarecido que as amostras obtidas serão analisadas em laboratório, e que a realização da pesquisa não implica em riscos para o participante, pois serão utilizados materiais descartáveis.

Estou ciente que a minha permanência na pesquisa depende da minha colaboração no uso correto do dispositivo palatino e no seguimento de todas as instruções dadas aos voluntários.

Estou ciente que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.

Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, porém, será mantido a todo instante o sigilo da identidade do voluntário, assegurando a sua privacidade.

Estou ciente que a participação na pesquisa será voluntária e não será oferecido nenhum tipo de remuneração.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, _____ de _____ de 20

Telefone do Pesquisador Responsável (16) 3301-6336

Assinatura do Voluntário

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa - FOAr (16) 3301-6432/6434

Professor Responsável: Elisa Maria Aparecida Giro

Apêndice 2- Instruções aos voluntários

Instruções gerais

1. O dispositivo intrabucal deve ser utilizado durante todo o dia e à noite, inclusive para dormir. Deve ser removido da boca apenas durante as refeições ou quando você for ingerir alguma coisa.
2. Procure evitar que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a alimentação (máximo de 1 hora).
3. Quando estiver fora da boca, em nenhum momento o dispositivo deve ser deixado à seco. Guarde-o no porta-aparelho, com uma gaze umedecida em água deionizada. Isso é muito importante para não ressecar os espécimes e manter a placa dental (biofilme) formada sobre esses blocos em condições adequadas.
4. Utilize apenas o dentifrício fornecido.
5. Realize a higiene bucal normalmente (veja abaixo - Escovação).
6. Não utilize produtos para bochecho ou outros agentes tópicos de qualquer natureza na cavidade bucal durante a fase experimental. Não utilizar fio dental com flúor.
7. Não utilize vitaminas ou suplementos sistêmicos que contenham flúor durante a fase experimental.
8. Não utilize alimentos que possam ser fonte de flúor, como frutos do mar, peixes, chá preto e chá verde.
9. Quando o dentifrício ou a gaze estiverem acabando, entre em contato com a pesquisadora responsável para que sejam repostos.
10. O acúmulo de placa dental sob a tela plástica é desejável; não tente removê-la.
11. A sacarose deve ser gotejada (1 gota/corpo-de-prova) 8 vezes ao dia entre os períodos da manhã e da tarde.

ESCOVAÇÃO:

- Utilize somente o dentifrício fornecido.
- Realize a escovação dos dentes no mínimo 3 vezes ao dia. Retornar o aparelho na boca imediatamente após a escovação.

- Sempre que escovar os dentes, escove também o dispositivo intrabucal. Você pode escovar todo o aparelho, exceto a área da telinha. Enxágüe o dispositivo com água deionizada. Tome cuidado para não perturbar a placa.
- Ao enxaguar o dispositivo, tome cuidado para que jatos de água não atinjam diretamente a tela plástica, causando a perda da placa dental acumulada.

INSTRUÇÕES PARA O TÉRMINO DE CADA FASE:

Você deverá comparecer nos horários determinado sem ter higienizado os dentes ou aparelho no 7º dia após o início do experimento.

Obrigada pela colobaração !!! Ela será indispensável para a realização deste trabalho.

QUALQUER DÚVIDA ENTRE EM CONTATO!!

ANEXO

1- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Influência da adição do diacetato de clorexidina na resistência de união de um CIV de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie.

Área Temática:

Pesquisador: Elisa Maria Aparecida Giro

Versão: 1

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

CAAE: 05526312.1.0000.5416

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 68388

Data da Relatoria: 07/08/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto é intitulado "Influência da adição de diacetato de clorexidina na resistência de união de um CIV de alta viscosidade à dentina sadia e afetada por cárie". O trabalho utilizará 80 terceiros molares do banco de dentes da FOAR-UNESP, os quais serão divididos em quatro grupos de 20 dentes cada um: CIV (controle); CIV + CLX 0,5%; CIV + CLX 1%; CIV + CLX 2%. Nestes grupos, dez dentes serão mantidos hígidos e dez terão cárie induzida. Sobre a dentina serão confeccionados corpos de prova com 1 mm de diâmetro e 1 mm de altura. Testes de microcissalhamento e padrões de fratura e microscopia eletrônica de varredura.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a resistência de união à dentina de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade, adicionado de diacetato de clorexidina em diferentes concentrações e sob dentina hígida e cariada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os dentes serão obtidos em banco de dentes e esterilizados em óxido de etileno e os pesquisadores se comprometeram em utilizar todos os equipamentos de proteção individual durante o experimento laboratorial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trabalha com características físicas do material. Sendo assim, a possível toxicidade da clorexidina parece não ser problema pois não estão descritos experimentos clínicos. Entretanto, é conveniente salientar que as concentrações utilizadas no experimento são altas e potencialmente tóxicas aos pesquisadores, notadamente para os olhos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Recomendo que os pesquisadores verifiquem a possibilidade de toxicidade da Clorexidina nas concentrações do estudo e que, caso seja constatada, que modifiquem os "riscos" e que, se for o caso, acrescentem cuidados com esta exposição (ex.: manipulação em fluxo laminar).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está bem escrito, com objetivos claros e metodologias pertinentes.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado em sessão de 7 de agosto de 2012

ARARAQUARA, 07 de Agosto de 2012

Assinado por:
Maurício Meirelles Nagle

2- Parecer Consubstanciado do C omite de  tica em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE



PROJETO DE PESQUISA

Título: Análise do biofilme formado in situ sobre um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade com diferentes concentra es de diacetato de clorexidina

 rea Temática:

 rea 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 06152612.9.0000.5416

Pesquisador: Elisa Maria Aparecida Giro

Institui o: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 113.850

Data da Relatoria: 02/10/2012

Apresenta o do Projeto:

A presente pesquisa será desenvolvida em 4 fases de 7 dias cada com intervalo de 30 dias entre uma e outra e terá a participa o de 10 (dez) voluntários que utilizarão um dispositivo palatino. O material testado será um Cimento de Ionômero de Vidro de alta viscosidade (Ketac Molar Easymix - 3M-ESPE Dental Products) que terá o Diacetato de Clorexidina (Sigma Aldrich) adicionado ou não ao p . Após o período experimental in situ, o biofilme de cada dispositivo palatino será analisado quanto   sua acidogenicidade, quanto a quantidade de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans e Lactobacillus spp., e, também será realizada a análise dos polissacarídeos intra e extracelulares.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a composi o bioquímica e biológica do biofilme formado in situ sobre um CIV de alta viscosidade com diferentes concentra es de diacetato de clorexidina.

Avalia o dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Em rela o aos materiais usados na pesquisa, não haverá riscos aos participantes, pois tanto o Cimento de Ionômero de Vidro como a Clorexidina nas concentra es estudadas são materiais aprovados para uso e disponíveis no comércio. O uso dos dispositivos palatinos pode causar algum desconforto decorrente da não adapta o adequada de grampos de reten o, contudo caso isso venha a ocorrer, o voluntário será totalmente assistido pelo pesquisador responsável e demais pesquisadores.

Benefícios: Após concluídas as quatro etapas do experimento todos os 10 voluntários receberão Profilaxia dental e instru es de higiene bucal, realizada por um dos colaboradores da pesquisa.

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo consistirá de um experimento cego do tipo cruzado in situ conduzido em 4 fases distintas com duração de 7 dias cada e com intervalo de 30 dias entre uma e outra fase e espera-se que com a adição de diferentes concentrações de diacetato de clorexidina a um cimento de ionômero de vidro se consiga reduzir a quantidade e a complexidade do biofilme formado sobre a sua superfície.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos foram apresentados adequadamente.

Recomendações:

Projeto analisado em sessão de 04/09/2012. O CEP deliberou solicitar ao pesquisador responsável que acrescente literatura que comprove a segurança e a efetividade da mistura Clorexidina + Flúor no polímero proposto em testes *in vitro* e/ou em animais, uma vez que se sabe da inefetividade por incompatibilidade físico-química destes dois elementos. O CEP entende que justifica-se estudos em humanos desta natureza após estudos *in vitro* pré-clínicos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Encaminhe-se para análise em Reunião.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Pendência da Reunião de 04/09/2012.
Analisado em sessão de 02 de outubro de 2012. Considerada atendida a solicitação.
Aprovado.

ARARAQUARA, 03 de Outubro de 2012

Assinado por:
Maurício Meirelles Nagle

(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 23 de Julho de 2013

Ana Carolina de Oliveira Becci