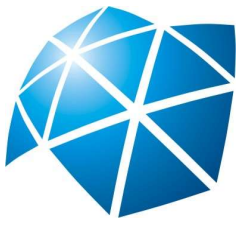


## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 04/08/2019.



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



Ana Carolina Becci de Souza

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  
HEXAMETAFOSFATO DE CLOREXIDINA EM PROPRIEDADES  
DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO DE ALTA  
VISCOSIDADE.**

Araraquara

2017



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



Ana Carolina Becci de Souza

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  
HEXAMETAFOSFATO DE CLOREXIDINA EM PROPRIEDADES  
DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO DE ALTA  
VISCOSIDADE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como pré requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara

2017

Souza, Ana Carolina Becci de

Efeito da incorporação de nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina em propriedades de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade / Ana Carolina Becci de Souza.-- Araraquara: [s.n.], 2017

104 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

1. Clorexidina 2. Cimentos de ionômeros de vidro  
3. Nanopartículas 4. Nanotecnologia 5. Antibacterianos I. Título

Ana Carolina Becci de Souza

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE  
HEXAMETAFOSFATO DE CLOREXIDINA EM PROPRIEDADES  
DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO DE ALTA  
VISCOSIDADE.

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e Orientador: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro

2º examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Cristina Cilense Zuanon

3º examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Lourenção Brighenti

4º examinador: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Hérica Adad Ricci Donato

5º examinador: Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo

## Dados Curriculares

### Ana Carolina Becci de Souza

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
2013-2017	Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - UNESP

## **DEDICATÓRIA**

À Deus, que me concede uma nova oportunidade de aprendizado a cada dia e me capacitou para a realização deste trabalho.

Ao meu esposo, amigo e companheiro Thiago. Agradeço por todos os dias em que estive ao meu lado, por todo apoio, amor, carinho e compreensão. Você foi parte essencial da concretização de um sonho.

Aos meus amados pais Lourdes e Flávio. Agradeço pelos ensinamentos e conselhos dados durante toda minha vida, por estarem ao meu lado em todas as situações e não medirem esforços para me verem feliz! Tudo que sou devo a vocês.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha querida irmã e seu esposo por me darem o melhor presente, aquele que ilumina meus dias, Francisco. Mesmo estando longe fisicamente, sempre coloco vocês em minhas orações e desejo profundamente que um dia possamos estar mais próximos.

Aos meus familiares e familiares do meu esposo. Gostaria de agradecer pelo apoio e compreensão, principalmente nas ocasiões em que gostaríamos de estar perto e nos reunirmos com mais frequência, no entanto, não podíamos. Obrigada por estarem sempre conosco mesmo que em pensamento.

Aos amigos Janaína e Cristiano. Depois de 25 anos de amizade sei que posso contar com vocês em qualquer momento. Obrigada por existirem em minha vida, vocês são especiais.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro. Nestes 6 anos como sua orientada passei a ser mais atenta e exigente comigo mesma. Por sua influência, comecei a olhar com outros olhos aqueles que estão ao meu redor e creio que aos poucos fui me tornando um ser humano melhor. Você ficará para sempre em minha história como exemplo de Mestre.



À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Lourenção Brighenti. Pela ampla participação neste projeto, por todos os conhecimentos compartilhados, pela amizade e por ser uma inspiração para mim.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Cristina Cilense Zuanon, pela valiosa colaboração dentro do nosso grupo de pesquisa em cimento de ionômero de vidro, pela amizade e por tornar as coisas rotineiras menos complicadas com sua espontaneidade.

Ao Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo. Agradeço pelo tempo despendido em me repassar um milésimo do seu conhecimento e pela agradável convivência. Pela participação ativa nas primeiras etapas deste projeto, que foram cruciais para que as posteriores pudessem ser executadas.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista - “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Vice-Reitor Prof. Dr. Sergio Roberto Nobre.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pela digníssima Diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Maria Sgavioli Massucato e pelo Vice Diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP representado pela Chefe de Departamento Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lídia Parsekian Martins e Vice-Chefe Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR – UNESP, Angela 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, pela convivência durante estes anos e pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representada pelas professoras Dr<sup>a</sup>. Fernanda Lourenção Brighenti e Dr<sup>a</sup>. Alessandra Nara Souza Rastelli.

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

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier pela atenção que sempre nos dispensaram.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de auxílio à pesquisa (processo 2015/00928-9).

À técnica do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas e Microbiológicas (LPBM) no período de Agosto de 2015 a Maio de 2017, Gabriela Pereira. Agradeço profundamente pelo auxílio em todas as etapas do projeto, por ser sempre tão solícita com todos aqueles com projetos em andamento no laboratório. Agradeço pela amizade e por ser uma pessoa tão correta.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAr, pelo auxílio durante a etapa de síntese e caracterização das nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina.

À Dr<sup>a</sup>. Lidiane Patrícia Gonçalves, pelo empenho em sanar minhas dúvidas com relação às nanopartículas, por me auxiliar diversas vezes se locomovendo até Araraquara e estar sempre presente.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/ Câmpus Araraquara, pela disponibilidade de sua estrutura e equipamentos para a realização da etapa de análise da liberação de clorexidina.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti pelo auxílio na execução da metodologia da análise de liberação de clorexidina e por nos receber tão bem em seu laboratório.

À aluna Renata Pires de Assis pela paciência, colaboração e pelo tempo despendido em me ajudar a realizar as análises da liberação de clorexidina.

As professoras Dr<sup>a</sup>. Josimeri Hebling e Dr<sup>a</sup>. Livia Nordi Dovigo pela ampla colaboração na etapa de análise estatística dos dados.

Aos queridos colegas de pós-graduação Luana, Diego, Manuel, Camila, Thalita, Luciana, Ana Paula, Natália, Vinícius, Yasmin e Carol e a todos os alunos do Departamento de Clínica Infantil pelos momentos vividos, e conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Flávia, Odete, Dulce, Soninha,

Pedrinho, Diego e Totó pelo convívio amigável e ajuda em hora oportuna, bem como a Cris e Márcia por fornecerem um ambiente de trabalho agradável.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAr – UNESP, Maria Helena, Marley, Cristina, Ceres, Maria, Sílvia, Odete, Eliane, Inês e Adriano. Muito obrigada pela simpatia, carinho, atenção e ajuda constante.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Viva como se fosse morrer amanhã.  
Aprenda como se fosse viver para sempre”

Mahatma Gandhi

Souza ACB. Efeito da incorporação de nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina em propriedades de um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

## **RESUMO**

Lesões de cárie secundárias nas margens das restaurações tem sido a principal razão para a sua substituição. Portanto, o desenvolvimento de materiais com propriedades antibacterianas melhoradas e duradouras é desejável. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da incorporação de nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP) a um cimento de ionômero de vidro (CIV) de alta viscosidade, nas suas propriedades físico-químicas, mecânica e antibacteriana. Após a síntese e caracterização, as nanopartículas foram adicionadas ao CIV nas concentrações de 1%, 2% e 5%. O CIV sem adição de nanopartículas foi utilizado como controle. Espécimes cilíndricos (3mm x 6mm) foram confeccionados com os materiais (n=12/grupo) e mantidos em água deionizada por 30 dias. A liberação de CLX foi avaliada no eluato por espectrofotometria ultravioleta e a dosagem do flúor foi feita com auxílio de um eletrodo específico, nos períodos de 1 h e 1, 7, 15 e 30 dias. No 30º dia, os espécimes receberam uma aplicação tópica de flúor gel neutro 2% e a liberação de flúor foi reavaliada por mais 30 dias. Para avaliar a atividade antibacteriana, biofilmes polimicrobianos cresceram sobre espécimes dos materiais (n=10/grupo), utilizando um modelo de aderência ativa. Em seguida, foram coletados e inoculados em meios de cultura específicos para a quantificação de microrganismos totais, bactérias acidúricas totais e estreptococos do grupo mutans. A atividade metabólica foi analisada pelo ensaio de XTT e a biomassa pela coloração por cristal violeta. A resistência de união (RU) do material à dentina sadia e afetada por cárie foi avaliada nos períodos de 24 h e após 6 meses de armazenamento dos espécimes em saliva artificial (n=10/grupo e período), usando o ensaio de microcisalhamento. Os padrões de fratura foram avaliados com o auxílio de microscópio de luz. Testes estatísticos adequados foram aplicados, de acordo com a distribuição dos dados e homogeneidade de

variâncias. O nível de significância adotado foi de 5%. As nanopartículas sintetizadas apresentaram forma globular e diâmetros que variaram de 60-100 nm. Apenas os grupos contendo 2% e 5% de nanopartículas liberaram CLX em pequena quantidade e não houve diferença significativa entre eles ( $p=0,072$ ). A liberação de flúor antes e após o recarregamento sofreu influência da concentração de nanopartículas e do período de análise ( $p\leq 0,001$ ), sendo uma maior liberação observada no grupo contendo 5% de nanopartículas, dos 7 dias até o final do experimento. A análise da atividade antibacteriana demonstrou que não houveram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Por fim, a resistência de união foi afetada pela condição do substrato, pelo tempo de armazenagem dos espécimes e pela concentração de nanopartículas ( $p\leq 0,001$ ). Independentemente do tempo, o grupo contendo 5% de nanopartículas apresentou valores significativamente inferiores de RU comparado com o grupo controle ( $p=0,014$ ). A análise dos padrões de fratura revelou que as fraturas do tipo mistas foram predominantes, independente do período de análise e da condição do substrato. A associação de NPs CLX-HMP ao CIV em concentração de até 2%, não afetou negativamente suas propriedades, porém não foi capaz de potencializar o efeito antibacteriano do material.

Palavras chave: Clorexidina. Cimentos de ionômeros de vidro. Nanopartículas. Nanotecnologia. Antibacterianos.



Souza ACB. Effect of the incorporation of chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles on properties of a high viscosity glass ionomer cement [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

## **ABSTRACT**

Secondary caries on the margins of restorations have been the main reason for their replacement. Therefore, the development of materials with improved and long-lasting antibacterial properties is desirable. The objective of this study was to evaluate the influence of the incorporation of chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles (CHX-HMP NPs) to a high viscosity glass ionomer cement (GIC) in its physicochemical, mechanical and antibacterial properties. After synthesis and characterization, the nanoparticles were added to the GIC at concentrations of 0%, 1%, 2% and 5%. Cylindrical specimens (3 mm x 6 mm) made with the materials were kept in deionized water for 30 days. The CHX release was evaluated in the eluate by ultraviolet spectrophotometry and the fluoride dosage was done with the help of a specific electrode, in the periods of 1 h and 1, 7, 15 and 30 days. On the 30th day, the specimens received a topical application of neutral fluorine gel 2% and the fluoride release was reevaluated for another 30 days. To evaluate the antibacterial activity, polymicrobial biofilms grew on the specimens of the materials, using an active adherence model. The biofilms formed were collected, inoculated in specific culture media and thereafter, the quantification of total microorganisms, total acid bacteria and streptococci of mutans group was made. The metabolic activity was analyzed by the XTT assay and the biomass by violet crystal staining. Finally, it was evaluated the bond strength of the material to the sound and caries-affected dentin, after 24 h and 6 months of storage of the specimens in artificial saliva, using the microshear test. The fracture patterns were evaluated with the aid of light microscope. Adequate statistical tests were applied according to the distribution of the data and the homogeneity of variances. The level of significance was set at 5%. The synthesized nanoparticles presented globular shape and diameters ranging from 60-100 nm. CHX was released in small amounts only by groups containing 2% and 5% of nanoparticles and there was no significant difference between them ( $p=0.072$ ). The release of fluoride before and after recharging was

influenced by the nanoparticle concentration and the analysis period ( $p \leq 0.001$ ), with a higher release observed in the group containing 5% of nanoparticles from 7 days until the end of the experiment. The analysis of the antibacterial activity showed that there were no statistically significant differences between the groups. Finally, the bond strength was affected by the substrate condition and the storage time of the specimens ( $p \leq 0.001$ ). The group containing 5% of nanoparticles presented significantly lower values of bond strength than the control group ( $p = 0.014$ ). Analysis of fracture patterns revealed that mixed type fractures were predominant, regardless of the period of analysis and the condition of the substrate. The association of CHX-HMP NPs to the GIC in concentrations of up to 2% did not negatively affect their properties, but was not able to improve the antibacterial effect of the material.

Keywords: Chlorhexidine. Glass ionomer cements. Nanoparticles. Nanotechnology. Antibacterials.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1 Materiais restauradores e a ocorrência da cárie dentária.....	21
2.2 Cimentos de ionômeros de vidro associados a agentes antibacterianos.....	27
2.3 Desenvolvimento de nanopartículas de clorexidina.....	39
3 PROPOSIÇÃO .....	48
4 MATERIAL E MÉTODO .....	49
4.1 Síntese e preparo das nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP).....	49
4.2 Caracterização das nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP).....	49
4.3 Determinação da quantidade de nanopartículas acrescentada ao cimento.....	50
4.4 Avaliação da liberação de clorexidina e da liberação de flúor antes e após o recarregamento.....	51
4.5 Análise microbiológica, da atividade metabólica e da biomassa do biofilme formado sobre a superfície do material .....	53
4.6 Avaliação da resistência de união à dentina sadia e afetada por cárie, nos períodos imediato e após seis meses .....	56
4.7 Análise estatística .....	61
5 RESULTADOS .....	64
5.1 Caracterização das nanopartículas CLX-HMP .....	64
5.2 Liberação de CLX e liberação de flúor antes e após recarregamento .....	66
5.3 Análise microbiológica, atividade metabólica e biomassa do biofilme .....	70
5.4 Resistência de união do material à dentina sadia e afetada por cárie nos períodos imediato e após seis meses .....	72
6 DISCUSSÃO.....	76
6.1 Liberação de clorexidina e de flúor antes e após recarregamento .....	78
6.2 Composição microbiológica, atividade metabólica e biomassa do biofilme formado sobre a superfície do material .....	83
6.3 Resistência de união à dentina sadia e afetada por cárie, nos períodos imediato e após seis meses .....	86
7 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética .....	102

## 1 INTRODUÇÃO

O acúmulo de biofilme nas margens das restaurações torna estes locais susceptíveis ao surgimento de lesões de cárie secundária (Nedeljkovic et al.<sup>47</sup>, 2015), que constituem a principal razão para a substituição de restaurações na prática odontológica (Lai et al.<sup>39</sup>, 2013; Naik et al.<sup>46</sup>, 2017; Askar et al.<sup>3</sup>, 2017).

Os cimentos de ionômero de vidro (CIV) são efetivos como material restaurador (Vermeersch et al.<sup>66</sup>, 2001) por promoverem a remineralização dos tecidos duros dentais principalmente devido à sua capacidade de liberação e recarregamento de flúor (Wiegand et al.<sup>67</sup>, 2007; Hoszek, Ericson<sup>33</sup>, 2008). Após serem liberados do material, os íons flúor participam dos fenômenos de des/remineralização. Contudo, não existe evidência científica suficiente que comprove um efeito anticariogênico duradouro dos CIVs (Wiegand et al.<sup>67</sup>, 2007; Yengopal et al.<sup>69</sup>, 2009).

Sendo assim é de grande interesse concentrar esforços para aumentar as propriedades antibacterianas desses materiais, adicionando substâncias capazes de reduzir ou inibir o crescimento bacteriano. Agentes antimicrobianos como a clorexidina, ciprofloxacina, metronidazol e minociclina são alguns exemplos de substâncias estudadas (Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006; Yesilyurt et al.<sup>70</sup>, 2009; Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011).

A clorexidina é um fármaco amplamente pesquisado devido as suas inúmeras características favoráveis, dentre elas a ação antimicrobiana imediata e o amplo espectro antimicrobiano sobre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, além de atuar sobre leveduras e fungos (Lenet et al.<sup>42</sup>, 2000). A clorexidina possui, também, a característica da substantividade, atividade resultante da adsorção e subsequente liberação,

devido à sua capacidade de ligação de forma reversível às superfícies orais. Assim, interfere na colonização bacteriana, e conseqüentemente no desenvolvimento do biofilme (Basrani et al.<sup>7</sup>, 2002; Gomes et al.<sup>26</sup>, 2006; Soares et al.<sup>56</sup>, 2007).

Quando adicionada ao CIV na forma de diacetato de clorexidina, a liberação se manteve em níveis significativos por cerca de uma semana (Sanders et al.<sup>54</sup>, 2002) oferecendo efeito antibacteriano bastante limitado. Além disso, quando adicionada em concentrações superiores a 2%, as quais apresentam um maior potencial antibacteriano, o material apresentou alterações nas suas propriedades físicas e mecânicas (Palmer et al.<sup>50</sup>, 2004; Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006; Türkun et al.<sup>62</sup>, 2008).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos que utilizam a nanotecnologia podem ser de grande auxílio neste cenário, uma vez que apresentam vantagens sobre o sistema convencional. Entre essas vantagens, destacam-se a maior eficácia terapêutica, proporcionada pela liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição significativa da toxicidade e aumento do tempo de ação. Além disso, esses sistemas evitam a instabilidade e a decomposição prematura do fármaco (Nhung et al.<sup>48</sup>, 2007).

Materiais funcionais ou estruturas em escala nanométrica podem ser utilizados para controlar a formação de biofilmes cariogênicos. Assim sendo, as principais considerações sobre as nanopartículas utilizadas são as suas características físico-químicas tais como carga de superfície, hidrofobicidade, e a capacidade de serem absorvidas e liberadas da superfície do biofilme (Allaker<sup>1</sup>, 2010).

O uso da clorexidina em nanopartículas foi descrito primeiramente por Lboutounne et al.<sup>41</sup> (2002). Esses pesquisadores incorporaram a clorexidina em nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona e avaliaram sua atividade bactericida residual in vivo, como agente antisséptico, comparado à um detergente desinfetante. Como resultado obtiveram uma ação bactericida sustentada por mais de 8 horas do detergente que continha nanocápsulas de clorexidina.

Atualmente, a associação das nanopartículas de clorexidina ao CIV tem sido explorada. Hook et al.<sup>31</sup> (2014) sintetizaram nanopartículas misturando o digluconato de clorexidina ao hexametáfosfato de sódio (HMP), um fosfato inorgânico cíclico amplamente utilizado na indústria alimentícia como agente antimicrobiano devido à sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular bacteriana (Vaara, Jaakkola<sup>65</sup>, 1989; da Camara et al.<sup>11</sup>, 2014). Além disso, da Camara et al.<sup>12</sup>, 2015 demonstraram em um estudo recente que o HMP 1% associado à um creme dental convencional reduziu significativamente a desmineralização do esmalte in situ.

No estudo de Hook et al.<sup>31</sup> (2014), os autores observaram que quando substituíram 1%, 2%, 5%, 10% e 20% em massa do CIV por nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina a liberação de clorexidina foi dose-dependente e a liberação de flúor não foi significativamente afetada. Além disso, a estrutura interna do material permaneceu inalterada até a incorporação de 10% de nanopartículas e substituições de 10 e 20% promoveram uma redução numérica da resistência à tração diametral.

Apesar deste estudo<sup>31</sup> ter contribuído para o esclarecimento de várias questões relacionadas à essa nova tecnologia, é de grande interesse atentarmos para o impacto da liberação controlada de clorexidina sobre biofilmes

polimicrobianos, uma vez que os trabalhos existentes avaliaram o efeito antibacteriano dessas nanopartículas apenas em microrganismos na forma planctônica e em biofilme monoespécie (Barbour et al.<sup>5</sup>, 2013; Bellis et al.<sup>9</sup>, 2016). É também relevante observar a influência que a modificação da estrutura do cimento pode ter sobre a capacidade de liberação e recarregamento de flúor e sobre suas propriedades físicas e mecânica.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pudemos concluir que:

- Apenas os espécimes contendo as maiores concentrações (2% e 5%) de NPs CLX–HMP associadas ao CIV tiveram capacidade de liberar pequena quantidade de clorexidina para o meio de armazenagem durante o período de 30 dias.
- O padrão de liberação de flúor antes e após o recarregamento não foi negativamente afetado pela associação das diferentes concentrações de NPs CLX-HMP ao CIV, no entanto, no período mais longo de armazenagem, os espécimes contendo 5% de nanopartículas liberaram maior quantidade de flúor.
- As análises da atividade antibacteriana demonstraram que a associação das NPs CLX–HMP ao CIV não foi capaz de aumentar o potencial antibacteriano e interferir na formação de biofilmes polimicrobianos na superfície do material.
- A resistência de união do CIV à dentina foi afetada pela condição do substrato dentinário, pelo tempo de armazenagem e pela concentração de NPs CLX–HMP associadas ao CIV, sendo a menor RU observada no grupo contendo NPs CLX-HMP 5%, em dentina afetada por cárie, após seis meses de armazenagem.



**REFERÊNCIAS\***

1. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res.* 2010; 89 (11): 1175–86.
2. 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.
3. Askar H, Brouwer F, Lehmensiek M, Paris S, Schwendicke F. The association between loading of restorations and secondary caries lesions is moderated by the restoration material elasticity. *J Dent.* 2017; 58: 74-9.
4. Attar N, Turgut MD. Fluoride release and uptake capacities of fluoride-releasing restorative materials. *Oper Dent.* 2003; 28(4): 395-402.
5. Barbour ME, Maddocks SE, Wood NJ, Collins AM. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 3507-19
6. Barkvoll P, Rølla G, Bellagamba S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96(1): 30-3.
7. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94 (2): 240-5.

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca:  
<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

8. Becci ACO, Marti LM, Zuanon ACC, Brighenti FL, Spolidório DMP, Giro EMA. Analysis of the biofilm formed on the surface of a glass-ionomer cement associated with different concentrations of chlorhexidine diacetate. *Am J Dent.* 2016; 29(5): 277-81.
9. Bellis CA, Nobbs AH, O'Sullivan DJ, Holder JA, Barbour ME. Glass ionomer cements functionalised with a concentrated paste of chlorhexidine hexametaphosphate provides dose-dependent chlorhexidine release over at least 14 months. *J Dent.* 2016; 45: 53-8.
10. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res.* 2003; 37(2): 108-14.
11. da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. *J Dent.* 2014; 42(3): 256-62.
12. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. *J Dent.* 2015; 43(10): 1249-54.
13. Carvalho AS, Cury JA. Fluoride release from some dental materials in different solutions. *Oper Dent.* 1999; 24(1): 14.
14. de Castilho AR, Duque C, Negrini T de C, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA, et al. 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.

15. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006; 94(1): 1-9.
16. Chawner JA, Gilbert P. Adsorption of alexidine and chlorhexidine to *Escherichia coli* and membrane components. *Int J Pharm*. 1989; 55 (2-3): 209-15.
17. 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; 31(5): 590-7.
18. Colucci V, de Araújo Loiola AB, da Motta DS, do Amaral FL, Pécora JD, Corona SA. Influence of long-term water storage and thermocycling on shear bond strength of glass-ionomer cement to Er:YAG laser-prepared dentin. *J Adhes Dent*. 2014; 16(1): 35-9.
19. 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; 26(4): 306-12.
20. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl*. 1973; 12: 68-75.
21. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by streptococcus mutans and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010; 44(4): 372–9.
22. Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, et al. Antibacterial effect of chlorhexidine- containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study. *Caries Res*. 2007; 41(2): 102-7.

23. 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.
24. Garner S, Barbour ME. Nanoparticles for controlled delivery and sustained release of chlorhexidine in the oral environment. *Oral Dis.* 2015; 21(5): 641-4.
25. Glasspoole EA, Erickson RL, Davidson CL. Demineralization of enamel in relation to the fluoride release of materials. *Am J Dent.* 2001; 14(1): 8-12.
26. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102 (4): 544-50.
27. Hara AT, Turssi CP, Ando M, González-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL Jr, et al. Influence of fluoride-releasing restorative material on root dentine secondary caries in situ. *Caries Res.* 2006; 40(5): 435-9.
28. Haseeb R, Lau M, Sheah M, Montagner F, Quiram G, Palmer K, et al. Synthesis and characterization of new chlorhexidine-containing nanoparticles for root canal disinfection. *Materials.* 2016; 9(6): 452.
29. Heintze SD. Clinical relevance of tests on bond strength, microleakage and marginal adaptation. *Dent Mater.* 2013; 29(1): 59-84.
30. Hicks MJ, Flaitz CM. Resin-modified glass-ionomer restorations and in vitro secondary caries formation in coronal enamel. *Quintessence Int.* 2000; 31(8): 570-8.

31. Hook ER, Owen OJ, Bellis CA, Holder JA, Sullivan DJO, Barbour ME. Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. *J Nanobiotechnology*. 2014; 23: 12-3.
32. Hoshika S, De Munck J, Sano H, Sidhu SK, Van Meerbeek B. Effect of conditioning and aging on the bond strength and interfacial morphology of glass-ionomer cement bonded to dentin. *J Adhes Dent*. 2015; 17(2): 141-6.
33. 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.
34. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil*. 1983; 10(5): 373-81.
35. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(10): 789-98.
36. Kim YS, Kang SM, Lee ES, Lee JH, Kim BR, Kim BI. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *J Biomed Opt*. 2016; 21(10): 101409.
37. Kuhn AT, Wilson AD. The dissolution mechanisms of silicate and glass-ionomer dental cements. *Biomaterials* 1985; 6(6): 378-82.
38. Kucukyilmaz E, Savas S, Kavrik F, Yasa B, Botsali MS. Fluoride release/recharging ability and bond strength of glass ionomer cements to sound and caries-affected dentin. *Niger J Clin Pract*. 2017; 20(2): 226-34.

39. Lai GY, Zhu LK, Li MY, Wang J. An in vitro study on the secondary caries-prevention properties of three restorative materials. *J Prosthet Dent.* 2013; 110(5): 363-8.
40. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics.* 1977; 33(2): 363-74.
41. Lboutounne H, Chaulet JF, Ploton C, Falson F, Pirot F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (epsilon-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J Control Release.* 2002; 82(2-3): 319-34.
42. Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, et al. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod.* 2000; 26(11): 652-5.
43. Lenzi TL, Bonifácio CC, Bönecker M, Amerongen WE, Nogueira FN, Raggio DP. Flowable glass ionomer cement layer bonding to sound and carious primary dentin. *J Dent Child (Chic).* 2013; 80(1): 20-4.
44. Lin A, McIntyre NS, Davidson RD. Studies on the adhesion of glass-ionomer cements to dentin. *J Dent Res.* 1992; 71 (11): 1836– 41.
45. Meyer B, Cookson B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *J Hosp Infect.* 2010; 76(3): 200–5.
46. Naik NS, Subba Reddy VV, Shashikiran ND. Comparative evaluation of secondary caries formation around light-cured fluoride-releasing restorative materials. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2017; 35(1): 75-82.

47. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater.* 2015; 31(11): 247-77.
48. Nhung DTT, Freydiere AM, Constant H, Falson F, Pirot F. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocápsulas (Nanoclhorex®). *Int J Pharm.* 2007; 334(1-2): 166-72.
49. 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; 21(19): 1989-93.
50. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004; 25(23): 5423–31.
51. Papagiannoulis L, Kakaboura A, Eliades G. In vivo vs in vitro anticariogenic behavior of glass-ionomer and resin composite restorative materials. *Dent Mater.* 2002; 18(8): 561-9.
52. Ribeiro J, Ericson D. In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res.* 1991; 99(6): 533-40
53. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011; 27(9): 1057-63.
54. Sanders BJ, Gregory RL, Moore K, Avery DR. Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with chlorhexidine. *J Oral Rehabil.* 2002; 29(6): 553-8.

55. Signori C, van de Sande FH, Maske TT, de Oliveira EF, Cenci MS. Influence of the inoculum source on the cariogenicity of in vitro microcosm biofilms. *Caries Res.* 2016; 50(2): 97-103.
56. Soares JA, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Ito IY. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated p-monochlorophenol in calciumhydroxide-based root canal dressings. *Braz Dent J.* 2007; 18(1): 8-15.
57. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2010; 358(14): 135-8.
58. 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.
59. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* 2003; 31 (3):161–71.
60. Tosun G, Koyuturk AE, Sener Y, Sengun A. Bond strength of two total-etching bonding systems on caries-affected and sound primary teeth dentin. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18 (1): 62–9.
61. Touzel RE, Sutton JM, Wand ME. Establishment of a multi-species biofilm model to evaluate chlorhexidine efficacy. *J Hosp Infect.* 2016; 92(2): 154-60.
62. 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.



63. 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.
64. Tyas MJ. Cariostatic effect of glass ionomer cement: a five-year clinical study. *Aust Dent J.* 1991; 36(3): 236-9.
65. Vaara M, Jaakkola J. Sodium hexametaphosphate sensitizes *Pseudomonas aeruginosa*, several other species of *Pseudomonas*, and *E. coli* to hydrophobic drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989. 33(10); 1741-7.
66. Vermeersch G, Leloup G, Vrenen J. Fluoride release from glass ionomer cements, compomers and resin composites. *J Oral Rehabil.* 2001; 28(1): 26-32.
67. 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.
68. Wood NJ, Jenkinson HF, Davis SA, Mann S, O'Sullivan DJ, Barbour ME. Chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles as a novel antimicrobial coating for dental implants *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(6): 201.
69. Yengopal V, Mickenautsch S, Bezerra AC, Leal SC. Caries-preventive effect of glass ionomer and resin-based fissure sealants on permanent teeth: a meta-analysis. *J Oral Sci.* 2009; 51(3): 373-82.
70. 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.

71. 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; 79(2) 709-14.
72. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111(3): 243-52.