



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**LUANA MAFRA MARTI**

**INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO  
OU DIACETATO DE CLOREXIDINA EM UM  
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO DE ALTA VISCOSIDADE.**

**Araraquara**  
**2017**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**LUANA MAFRA MARTI**

**INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO  
OU DIACETATO DE CLOREXIDINA EM 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 Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do título de Doutor.

**Orientador: Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon**

**Co-orientador: Prof. Dr. Mário Cilense**

**Araraquara**  
**2017**

Marti, Luana Mafra

Incorporação de nanopartículas de óxido de zinco ou diacetato de clorexidina em um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade / Luana Mafra Marti.-- Araraquara: [s.n.], 2017

53 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon

1. Cimentos de ionômeros de vidro 2. Nanopartículas 3. Óxido de zinco 4. Propriedades físicas 5. Biofilmes 6. Clorexidina. Título

LUANA MAFRA MARTI

INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO  
OU DIACETATO DE CLOREXIDINA EM UM  
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO DE ALTA VISCOSIDADE.

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutor

**Presidente e Orientador:** Angela Cristina Cilense Zuanon

**2º examinador:** Profa Dra Alessandra Nara Souza Rastelli

**3º examinador:** Profa Dra Elisa Maria Aparecida Giro

**4º examinador:** Profa Dra Hérica Adad Ricci

**5º examinador:** Profa Dra Patrícia Aleixo dos Santos

Araraquara, 12 de setembro de 2017.

## **DADOS CURRICULARES**

### **LUANA MAFRA MARTI**

NASCIMENTO	19/11/1985
NATURALIDADE	Aguai – SP
FILIAÇÃO	Francisco Marti Gonzalez Leda Ap. Baldin Mafra Marti
2006 a 2010	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr –UNESP.
2011 a 2013	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.  Curso de Especialização em Odontopediatria na Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas (APCD) – Araraquara.
2013 a 2017	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao **meu pai**, pois mesmo sem saber bem o que significava fazer mestrado ou doutorado me apoiou, me ajudou, me conduziu e sempre esteve ao meu lado, hoje, talvez não consiga compreender a concretização desse sonho, talvez não esteja ali na plateia me aplaudindo, mas tenho certeza que de alguma forma se sentirá orgulhoso da minha, ou melhor, da nossa conquista.

À **minha mãe** que desde sempre me apoiou e me permitiu chegar até aqui. Que Deus me permita ser para minha família ao menos metade de tudo que ela é para mim hoje.

Ao **meu irmão** que me substituiu nos cuidados com meu pai, permitindo assim que eu pudesse realizar mais este sonho.

Ao **meu marido**, meu companheiro, meu braço direito, que muitos finais de semana cuidou sozinho de nossa pequena filha para que eu pudesse ir a laboratórios e escrever a tese, que cuidou de mim quando todo o mundo desabou, sem sua ajuda e presteza nada seria possível. Obrigada por essa linda família que estamos construindo juntos. Amo você.

*“...Para-raios em dia de sol  
Para mim  
Prenda minha parabólica  
Princesinha parabólica..”*

*Engenheiros do Hawaii*

À minha **querida orientadora, Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon, Cris**, que teve todo carinho e paciência comigo nos momentos difíceis enfrentados durante a realização desta tese; que me garantiu todos os embasamentos para o desenvolvimento do trabalho. Não foi apenas uma tese de doutorado, uma dissertação de mestrado, um estágio ...foram anos compartilhando o dia-a-dia, mais precisamente 7 anos, trabalhando juntas. Dedico tudo o que sou hoje, como profissional, a você, que me ensinou a ser professora, pesquisadora e principalmente família. Quando o mundo desabava você dizia, vai ficar com a sua família, eles precisam de você e eu ia. Ensinou que pesquisa é importante, que ser um bom profissional e cumprir os deveres é primordial para a realização de qualquer sonho, mas também mostrou que amor de mãe e de família vem em primeiro lugar. Obrigada, obrigada e mil vezes obrigada por construir comigo esse sonho. Espero que a nossa parceria continue por muitos e muitos anos ainda.

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”*  
*Mahatma Gandhi*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço **a DEUS** por ter me dado coragem, sabedoria e principalmente por ter me dado a chance de continuar nesse mundo, perfeita e poder chegar até aqui.

À minha filha, **Alice**, razão disso tudo, é por você, minha querida, que luto todos os dias. Seu sorriso espanta qualquer tristeza, medo ou angústia.

*A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível.”*

*Alice no País das Maravilhas*

À **minha família** pai, mãe, irmão e cunhada que foram alicerce e força para que eu pudesse realizar este sonho de vida. Estar longe torna tudo mais difícil, e vocês conseguiram compreender minha distância física, mas jamais estaremos longe em pensamento e coração.

À minha pequena e doce sobrinha-afilhada, **Helena**, que chegou para alegrar a alma, o coração e a vida.

“

À minha **avó, tias, tios e primas, família Mafra, família Marti** que entenderam minhas ausências e muitas vezes supriram meu papel como filha, cuidando um pouco dos meus pais por mim. Sei que minha vitória é também a vitória de vocês.

À **minha sogra** que cuidou de mim, da minha filha e do meu marido no momento em que mais tivemos medo. Obrigada por abandonar seus afazeres e ficar ali, do lado dela, tão pequenina, tão frágil e tão amada.



À **família Tahan** que me acolheu e faz meus dias mais felizes.

À minha amiga **Thalita** que esteve ao meu lado em momentos bons e ruins, nas chegadas e nas partidas. Um lindo e doce presente que a vida acadêmica me deu para a vida real.

À minha amiga **Carol Becci**, desde o mestrado dividindo os dias de laboratório, os dias exaustivos, as risadas, com você tudo ficou mais fácil.

Ao amigo **Rafael Amorim**, que me ajudou na realização deste trabalho, fez pesagens, testes e me deixou extremamente feliz e orgulhosa quando passou de orientado da graduação para aluno de mestrado, aluno dedicado, com um caminho lindo pela frente.

À técnica do laboratório **Gabi**, que me ajudou, ensinou e fez os dias mais divertidos.

Aos meus amigos **Liege, Camila, Pops, Luciana, Carolzinha, Vinicius, Diego, Manuel, Natália, Rafael, Yasmin, Luis Felipe, Matheus, Rosa, Leopoldina** e todos os antigos e novos alunos do Departamento de Clínica Infantil. Agradeço todos os momentos compartilhados, risadas, aprendizados, viagens, cada um de vocês esteve presente em algum momento dessa estrada.

As professoras doutoras **Fernanda e Tia Elisa**, que ajudaram na elaboração e realização deste trabalho, sempre dispostas a ensinar.

À professora doutora **Alessandra** que nos forneceu o material para a realização de parte deste trabalho e também sempre nos colaborou com a execução deste.

Ao professor doutor **Mário Cilense** que me auxiliou na realização das microscopias, me ensinou sobre o cultivo de orquídeas e me ensinou muito sobre a vida e sobre o amor à profissão.

*Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir.  
Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida  
e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos.  
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades  
para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E  
esperança suficiente para fazê-la feliz.  
Clarice Lispector*

## AGRADECIMENTOS

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

A Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representada pela digníssima Diretora Profa Dra 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 pelo Chefe de Departamento Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins e Vice-Chefe, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro.

Aos Professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Fábio Cesar Braga de Abreu e Lima, Elisa Maria Aparecida Giro, Fernanda Lourenção Brighenti, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto, Rita de Cássia Loyola Cordeiro, Fabiano Jeremias pela convivência diária e saber compartilhado.

A Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representada pelos Professores Dra. Fernanda Lourenção Brighenti - Coordenadora e Profa. Alessandra Nara de Souza Rastelli - Vice-Coordenadora

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier pela atenção que sempre nos deram.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante o doutorado.

Ao Laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representado pelo Profa. Dra. Fernanda Lourenção Brighenti, e todos os seus integrantes, pela disponibilidade de sua estrutura e equipamentos, e por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Flávia, Dulce, Soninha, Pedro, Diego, Totó, Marcia e Cris por toda ajuda e atenção.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, muito obrigada pela colaboração e ensinamentos.

Ao Grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo – USP, que sintetizou as nanopartículas utilizadas nesse projeto.

Ao instituto de Química desta Univerdidade por permitir a realização das microscopias eletrônicas

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

*“Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade.”*

*Yoko On*

Marti LM. Incorporação de nanopartículas de óxido de zinco ou diacetato de clorexidina em um cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

**RESUMO:** Avaliou-se a dureza superficial, rugosidade, porosidade, resistência a compressão, atividade antibiofilme, atividade metabólica do biofilme (XTT) e observou-se a aderência e formação do biofilme em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um cimento de ionômero de vidro (CIV) de alta viscosidade (Ketac Molar Easy Mix), associado a nanopartículas de óxido de zinco (NPZnO) a 2% ou ao diacetato de clorexidina (CLX) nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%. Como grupo controle utilizou-se o próprio CIV. Para os testes físicos, mecânicos e atividade antibiofilme foram confeccionados 10 corpos de prova por grupo, para o teste de XTT e MEV, foram utilizados 5 e 2 corpos de prova por grupo respectivamente. A atividade antibiofilme foi avaliada para biofilme monoespécie de *Streptococcus mutans*, no período de incubação de 1, 7, 14 e 21 dias. Realizou-se contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e a atividade metabólica do biofilme, assim como a observação em MEV foram avaliadas nos os períodos de 1 e 7 dias . Os dados foram analisados estatisticamente e atenderam quanto à normalidade e a homogeneidade de variâncias. Realizou-se análise paramétrica de variância (ANOVA) para verificar diferença estatística seguida pelo teste de Tukey. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%. Avaliação qualitativa em MEV foi realizada para a observação da aderência e formação de biofilme. No teste de dureza superficial todos os grupos apresentaram diminuição dos valores, sendo, dos grupos com CLX, os menores valores. Para a rugosidade superficial, apenas o grupo com NPZnO apresentou aumento significativo, sendo os demais grupos, semelhantes ao controle. A CLX 0,5% apresentou redução do número ( $p=0,001$ ) e área de poros ( $p=0,035$ ) e o teste de resistência à compressão não demonstrou diferença significativa entre os grupos. Nas primeiras 24 h todos os grupos apresentaram redução da atividade metabólica do biofilme em relação ao controle e após 7 dias apenas a CLX 1% conseguiu manter essa redução. A atividade antibiofilme foi aumentada no 14º dia de avaliação para os grupos de CLX a 1% e 2%. A MEV demonstrou a aderência e formação de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre a superfície dos espécimes no primeiro e sétimo dia de experimento. Conclui-se que o diacetato de CLX a 1% foi o material

com resultados antibacterianos mais promissores e embora tenha diminuído a dureza superficial do CIV não causou prejuízos as demais propriedades estudadas.

**Palavras-chave:** Cimentos de ionômeros de vidro. Nanopartículas. Óxido de zinco. Propriedades físicas. Biofilmes. Clorexidina.

Marti LM. Incorporation of nanoparticles of zinc oxide or chlorhexidine diacetate in a high viscosity glass ionomer cement [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

**ABSTRACT:** It was evaluated the surface hardness, roughness, porosity, compressive strength, antibiofilm activity, metabolic activity of the biofilm (XTT) and the adherence and formation of the biofilm in Scanning Electron Microscopy (SEM) of a glass ionomer cement (GIC) of high viscosity (Ketac Molar Easy Mix), associated with 2% zinc oxide (NPZnO) nanoparticles or chlorhexidine diacetate (CLX) at concentrations of 0.5%, 1% and 2%. As a control group, the GIC itself was used. For the physical, mechanical and antibiofilm activity tests, 10 specimens were prepared per group, for the XTT and MEV test, 5 and 2 specimens were used per group, respectively. The antibiofilm activity was evaluated for monospecific biofilm of *Streptococcus mutans*, during the incubation period of 1, 7, 14 and 21 days. The colony forming units were counted per milliliter (CFU / mL) and the metabolic activity of the biofilm, as well as the SEM observation, were evaluated in the 1 and 7 day periods. The data were analyzed statistically and attended to the normality and homogeneity of variances. We performed a parametric analysis of variance (ANOVA) to verify statistical difference followed by the Tukey test. All tests were performed with a significance level of 5%. Qualitative evaluation in SEM was performed for the observation of adhesion and biofilm formation. In the superficial hardness test, all groups showed decreased values, being the lowest values of the CLX groups. For the surface roughness, only the group with NPZnO presented a significant increase, the other groups being similar to the control. The CLX 0.5% presented reduction of number ( $p = 0.001$ ) and pore area ( $p = 0.035$ ) and the compressive strength test showed no significant difference between the groups. In the first 24 h, all groups presented a reduction in the metabolic activity of the biofilm in relation to the control and after 7 days only CLX 1% managed to maintain this reduction. The antibiofilm activity was increased on the 14th day of evaluation for the 1% and 2% CLX groups. SEM showed the adherence and biofilm formation of *Streptococcus mutans* on the surface of the specimens on the first and seventh day of the experiment. It was concluded that 1% CLX diacetate was the material with the most promising antibacterial results and although it has decreased the surface hardness of the GIC, it did not cause damage to the other properties studied.

**Key-words:** Glass ionomer cements. Nanoparticles. Zinc oxide. Physical properties. Biofilms. Chlorhexidin.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	36
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46
<b>APÊNDICE</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O cimento de ionômero de vidro (CIV) é o material de escolha para muitas técnicas restauradoras em odontopediatria, já que, favorece a remineralização e reorganização da dentina afetada, possibilitando a interrupção do desenvolvimento da lesão de cárie, além de possuir efeito antibacteriano importante para evitar o aparecimento de recidivas de lesões de cárie e aumentar a longevidade das restaurações<sup>9,21,34,49</sup>.

Estudos demonstram que a taxa de lesões de cárie secundárias ainda é bastante elevada<sup>24,55</sup> sendo estas, as maiores responsáveis pelas falhas das restaurações de resina composta, CIV e outros materiais que favorecem a deposição de biofilme<sup>8,15,45,69,79</sup>. Sabe-se que o *Streptococcus mutans* possui boa capacidade de aderir aos materiais restauradores, e a atribuição ou a potencialização do efeito antibacteriano dos materiais odontológicos representa grande importância para a prevenção da lesão de cárie<sup>58,72,80</sup>, diminuição do número de lesões de cárie secundárias<sup>28,56</sup> e favorecimento de reparo do tecido dentinário afetado<sup>9,10,20,77</sup>.

Materiais antibacterianos como cetrimida, clorexidina (CLX)<sup>4,5,15,18,26,28,37,50,51,65,67,73,74,75</sup> e nanopartículas (NP) como as de óxido de zinco (ZnO)<sup>30,71</sup> tem sido associados ao CIV na busca da potencialização desta propriedade.

A CLX destaca-se por sua comprovada eficácia contra amplo espectro de patógenos da cavidade bucal<sup>22,43</sup>, porém sua associação aos materiais restauradores pode provocar alterações em suas propriedades físicas e mecânicas<sup>4,5,43, 50,51,62</sup>.

Assim, tem-se estudado as NP formuladas a partir de óxidos de metais, como àquelas de ZnO, as quais, apresentam boa atividade antibacteriana e são eficientes em reduzir ou evitar a formação de biofilmes sobre materiais restauradores<sup>1,33</sup>. Sua associação com estes materiais resultam na formação de íons Zn<sup>+</sup> e espécies reativas de oxigênio, incluindo o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o qual pode destruir a membrana celular e resultar em morte da célula bacteriana<sup>11,12</sup>. A NPZnO é encontrada na forma de pó e tem sido bastante utilizada em medicamentos de aplicação dermatológica devido a sua atividade antibacteriana<sup>44,71</sup>.

O efeito antibacteriano presente nas NP, representa uma propriedade que resulta em uma boa opção para os materiais restauradores<sup>44,55,76</sup>. Considerado sua

dimensão de 1 a 100 nm, proporciona boa relação entre sua área de superfície e seu volume<sup>33</sup>, além de apresentar propriedades favoráveis como boa biocompatibilidade<sup>46</sup>. O tamanho das partículas de ZnO também resulta em inibição de biofilme mais efetiva quando comparadas às micropartículas ou ao pó ultra fino<sup>44</sup>.

Baseando-se no fato de que tanto a CLX quanto as NPZnO possuem efeito antibacteriano, que existem poucos estudos na literatura associando NPZnO a um CIV de alta viscosidade e que é interessante a obtenção de um material restaurador com efeitos antibacterianos promissores, que não alterem suas propriedades físicas e mecânicas originais, este estudo, teve como objetivo avaliar propriedades físicas, mecânicas e antibacterianas de um CIV de alta viscosidade associado a NPZnO ou ao diacetato de CLX.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A partir da utilização de discos de CLX e testes de diluição e difusão em ágar, Emilson<sup>23</sup>, em 1977, estudou a resistência de bactérias aeróbias, anaeróbias e aeróbias facultativas a este material. Entre os isolados anaeróbios testados, as cepas mais suscetíveis à CLX foram *Propionibacterium* e *Selenomonas*, enquanto as cepas menos suscetíveis foram cocos Gram-negativos.

Jedrychowski et al.<sup>43</sup> em 1983 avaliaram a resistência à compressão, à tração, ao cisalhamento e à atividade antibacteriana após adição 1, 2, 3, 5 e 10% de gluconato de CLX ou de dihidroclorido de CLX a uma resina e a um CIV. A atividade antibacteriana foi medida por inibição do crescimento de *S. viridans*, *S. pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *L. acidophilus* e *E. colli* durante 4 dias. A adição de gluconato ou de dihidroclorido de CLX aumentou a atividade antibacteriana dos materiais testados, sendo o último capaz de manter as propriedades mecânicas mais próximas daquelas apresentadas pelo grupo controle. Em geral, houve prejuízo nas propriedades de resistência à tração, compressão e forças de cisalhamento com a adição do gluconato de CLX em concentrações superiores a 3%. Após análise dos resultados, os autores concluíram que a adição de pequenas concentrações de CLX aumentaram a atividade antibacteriana sem comprometer as propriedades testadas de ambos os materiais.

Xie et al.<sup>79</sup> (2000) estudaram propriedades mecânicas como a resistência à flexão, à compressão, à tração diametral, ao desgaste e dureza Knoop de CIV modificados por resina e convencionais. Os pesquisadores observaram que a relação entre composição, estrutura e propriedade mecânicas dos CIV apontaram que microestruturas mais integradas com melhor ligação entre matriz e partículas de vidro resultaram em valores mais altos de resistência à flexão, tração diametral e ao desgaste. Os CIV modificados por resina apresentaram valores maiores de resistência a flexão e a tração diametral, e os convencionais, valores mais altos de dureza e resistência ao desgaste. Observaram também que a resistência ao desgaste aumentou na presença de partículas de vidro maiores, já que as partículas de vidro menores foram relacionadas com menor porosidade microestrutural.

Após adição de 5 % de diacetato de CLX a um CIV, Sanders et al.<sup>67</sup> (2002) avaliaram a resistência a tração, dureza superficial, erosão, liberação de CLX e atividade antibacteriana nas primeiras 24 h e em 6 semanas de estudo. Houve redução dos valores de dureza após 6 semanas, a resistência à tração não apresentou diferença significativa, houve aumento significativo de erosão e a liberação de CLX foi mais efetiva na primeira semana do teste, com redução nas 5 semanas seguintes. Observaram redução do número de *Streptococcus mutans* nas primeiras semanas de avaliação, o que representou melhora da atividade antibacteriana do material quando comparado ao CIV controle.

Palmer et al.<sup>62</sup> (2004) observaram liberação de diacetato de CLX em concentrações que variaram de 0,5% a 13% quando associada a um CIV. A liberação de concentração mais alta ocorreu até 20 dias após o início do experimento. Nas primeiras 22,5 h de estudo ocorreu liberação de toda CLX mensurável, sendo esta quantidade inferior a 10% da massa total incorporada aos espécimes. Concluíram que a maior parte da CLX adicionada ficou retida no espécime, que sofreu aumento no tempo de presa e diminuição da resistência à compressão.

Utilizando CLX a 2% como controle positivo, Duque et al.<sup>20</sup> (2005) observaram atividade antibacteriana significativa de dois CIV convencionais (Fuji IX e Ketac Molar) e um modificado por resina (Vitrebond) para *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus*. A atividade antibacteriana foi verificada utilizando-se o teste de difusão em ágar com meio de cultura BHI e após 24 horas de incubação os halos de inibição foram avaliados. A análise estatística utilizada foi teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. Os autores verificaram que todos os materiais estudados apresentam halo de inibição sendo o Vitrebond o que exibiu maior atividade antibacteriana.

Para avaliar a resistência à compressão, tempo de presa, adesão à dentina e a atividade antibacteriana, Takahashi et al.<sup>72</sup> (2005) adicionaram diacetato de CLX combinado com dihidroclorato de CHX, nas concentrações de 0, 1%, 2% e 3% a um CIV. Atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* ou

*Actinomyces naeslundii* foi examinada utilizando método de difusão em ágar. Observaram que todos os grupos estudados apresentaram halo de inibição significativa e que a concentração de CLX liberada não foi dose dependente. Valores superiores a 2% levaram a diminuição da resistência a compressão e desfavoreceram a adesão à dentina. Os autores concluíram que a adição de CLX a 1%, de maneira geral, favoreceu as propriedades estudadas.

Beyth et al.<sup>8</sup> em 2006, avaliaram o efeito antibacteriano e a biocompatibilidade de uma resina composta Flow associada a 1% e 2% de NP de polietilenoamina de amônia quaternária (PEI). Os microorganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis* e as análises foram realizadas em 48 horas, 1 e 4 semanas. Os testes antibacterianos realizados foram de difusão em ágar e de contato direto. Para avaliar a biocompatibilidade fez-se viabilidade de macrófagos e secreção de citocinas TNF $\alpha$ . As amostras que incorporaram NP a 2% inibiram o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas. A NP 1% resultou em inibição completa de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e diminuição do crescimento de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. O teste de contato direto não mostrou halo de inibição para os microrganismos testados, indicando que as NP não se difundiram no meio de ágar. Quanto a biocompatibilidade os testes mostraram viabilidade dos macrófagos e a secreção de TNF $\alpha$  não foi alterada. Concluíram que a incorporação de nanopartículas de PEI garantiu diminuição no crescimento de todos os microrganismos testados não afetando a biocompatibilidade da resina.

Ao restaurar a região oclusal de molares permanentes de 50 crianças de 6 a 11 anos de idade, Frencken et al.<sup>28</sup> (2007) adicionaram CLX a 1% a um CIV convencional. As restaurações foram realizadas sobre dentina afetada e infectada e após 7 dias foram removidas. Observou-se diminuição significativa na contagem de bactéria anaeróbias e aeróbias ( $p = 0,0001$ ), além de menor número de lactobacilos anaeróbios ( $p = 0,02$ ) e lactobacilos aeróbicos, mas não de *Streptococcus mutans*. Redução significativa nos lactobacilos aeróbicos na dentina infectada tratada com CIV associado à CLX ( $p = 0,05$ ) foi observada, enquanto que na dentina afetada, *Streptococcus mutans* anaeróbios e aeróbios mutans foram significativamente

menores no grupo de teste 7 dias após o tratamento ( $p = 0,01$ ). Observaram também diferença significativa na redução de todos os microorganismos para ambas as situações.

A partir da realização de testes para concentração mínima inibitória (MIC) e para a concentração mínima bactericida (MBC), Hernández-Sierra et al.<sup>35</sup> em 2008, estudaram o efeito bactericida e bacteriostático de NP de prata, óxido zinco e ouro sobre *Streptococcus mutans*. Os resultados mostram que houve diferença significativa entre todos os materiais. A NP de prata, por inibir *Streptococcus mutans* a partir de menor concentração quando comparada com as outras NP testadas, mostrou-se mais efetiva para o controle do microrganismo.

Com o objetivo de avaliar a liberação de flúor assim como a atividade antibacteriana, Hoszecz e Ericson<sup>37</sup> (2008) adicionaram ácido tartárico (11%) e gluconato de CLX (10%) a um CIV. Durante 60 dias de observação, notou-se diminuição gradativa da liberação de flúor, estabilização após 10 dias e diminuição lenta do mesmo até o último dia de estudo. A liberação de flúor no grupo com CLX foi de cerca de 27% menor quando comparado ao controle, e 30% menor que o grupo com ácido tartárico. Observou-se também redução do número de *Streptococcus mutans* para ambos os materiais. Os autores concluíram que a liberação de flúor e o efeito antibacteriano dos materiais estudados diminuíram com o tempo, mas permaneceram mensuráveis por 60 dias.

Huang et al.<sup>38</sup>, em 2008 estudaram o efeito das NPZnO sobre a superfície química das membranas bacterianas de *Streptococcus agalactiae* e do *Staphylococcus aureus*. Foram utilizadas concentrações de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  M, cultivadas em placas de ágar e incubadas por 24 h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Observaram que as células bacterianas foram danificadas após o contato com as NPZnO e concluíram que essas nanopartículas podem ser um efetivo agente biocida.

Em estudo de efeito antibacteriano, Jones et al.<sup>44</sup> em 2008 avaliaram cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escheria coli*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* a partir da utilização de nanopartículas de MgO, TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, CeO<sub>2</sub> e ZnO. Observaram

que as NP de MgO, TiO<sub>2</sub>, CuO, CeO<sub>2</sub> não resultaram em inibição significativa de crescimento bacteriano, enquanto que as de ZnO mostraram-se efetivas. O Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostrou-se altamente tóxico para a maior parte das células vivas e foi retirado do estudo. Os autores concluíram que o ZnO tem potencial bacteriostático na luz visível e que a NPZnO tem este potencial aumentado devido ao tamanho reduzido de suas partículas. Asseguraram ainda que no futuro, as NPZnO poderão ser utilizadas como agentes antibacterianos, loções e revestimentos de superfície em diferentes substratos para prevenir contaminação por microrganismos.

Turkun et al.<sup>74</sup> (2008) associaram gluconato e diacetato de CLX a um CIV nas concentrações de 0,5%, 1,25%, 2,5% e avaliaram propriedades físicas, mecânicas e antibacterianas. Observaram que o maior efeito antibacteriano foi propiciado pelo diacetato de CLX a 2,5%, sendo este efeito efetivo até 90 dias para *Streptococcus mutans* e de até 60 dias para *Lactobacillus acidophilus*, acompanhado de diminuição da resistência à compressão. Os autores indicaram a concentração de 1,25% de diacetato de CLX a mais apropriada para associação com o CIV, pois aumentou o efeito antibacteriano do material sem deterioração de suas propriedades físicas e mecânicas.

Liu et al.<sup>48</sup> (2009), investigaram as propriedades antibacterianas de diferentes concentrações de NPZnO e seu modo de ação contra a *Escherichia coli* O157:H7, por meio de teste antibacteriano. Ao microscópio eletrônico de transmissão pode-se observar efeitos inibitórios no crescimento de *Escherichia coli* O157: H7 diretamente proporcional ao aumento de concentração, tendo a eliminação completa do microrganismo em 12 mmol l<sup>-1</sup>. Considerou-se também o tamanho e formato das partículas ao realizar a análise em microscopia eletrônica de varredura. Os autores sugeriram que o mecanismo antibacteriano da NP de ZnO pode estar relacionado com a destruição dos lipídeos e das proteínas da membrana celular das bactérias, causando o extravasamento do conteúdo celular. Concluíram que as NPZnO tem o potencial para ser considerada um agente antibacteriano efetivo.

Ao avaliar a resistência ao cisalhamento e atividade antibacteriana de um CIV modificado por resina (Fuji Orto LC) e de um adesivo ortodôntico (TransBond XT) após adição de ZnO a 13% e 23,1%, Spencer et al.<sup>71</sup> em 2009, observaram que os



efeitos antibacterianos foram 1,6 vezes maiores quando utilizado o ZnO a 23,1%. Não houve diferença entre o Transbond e o CIV. Encontraram também que a incorporação do ZnO no Fuji Ortho LC adicionou propriedades antimicrobianas ao composto original sem alterar significativamente a resistência ao cisalhamento. Concluíram que à medida que a concentração de ZnO aumentou, a atividade antibacteriana também aumentou permanecendo até pelo menos um mês, embora em níveis menores.

Deepalakshmi et al.<sup>18</sup> em 2010, avaliaram a resistência à compressão, tempo de presa e propriedades antibacterianas de um CIV (FUJI IX) associado à 1% e 2% de diacetato de CLX ou cefrimida. A atividade antibacteriana foi avaliada para *Lactobacillus casei* por meio do teste de difusão em ágar. O CIV contendo 2% cefrimida exibiu inibição significativamente maior do microrganismo seguida pelo CIV com 1% de cefrimida e com 2% de CLX. A maior resistência à compressão foi exibida pelo grupo controle seguido do CIV com 1% de cefrimida, e o menor valor foi exibido pelo CIV com 2% de CLX. O tempo de presa para todos os grupos testados foi maior que para o grupo controle. Os autores observaram que o CIV adicionado à materiais antibacterianos resulta na inibição de bactérias associadas à lesão cárie. A adição de 1% de CLX foi a melhor opção para reduzir o número de bactérias sem afetar as propriedades físicas do material.

A partir da adição de NP à diferentes compósitos, Sevinç e Hanley<sup>68</sup> (2010) avaliaram a ação antibacteriana de resinas compostas microhíbrida e nanoparticuladas. Confeccionaram corpos de prova com a incorporação de NP a 1% de prata, 10% de dióxido de titânio, 10%, 5%, 1% de ZnO e realizaram os testes de contagem de UFC/mL, concentração mínima inibitória, concentração mínima bactericida, contagem de células viáveis no terceiro dia de formação de biofilme do *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces naeslundii*, inibição pelo contato direto das resinas utilizando MEV e microscópio confocal à laser. Como resultados verificaram que houve redução significativa de até 80% na contagem bacteriana quando associado 10% de NPZnO. Após acompanhamento por 3 dias, observaram que a adição da NP em todas as concentrações não foi efetiva para reduzir significativamente o número de microorganismos. Os autores acreditam que

a insolubilidade das NPZnO impediu a difusão de quantidade suficiente de  $Zn^{2+}$  para o ambiente circundante, resultando em menor efeito antibiótico.

A resistência à compressão, à fratura, à flexão, a microdureza superficial, o tempo de presa, a liberação de flúor e a atividade antibacteriana foram estudados por Elsaka et al.<sup>22</sup> (2011) após a adição de NP de dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) a 3%, 5% e 7% a um CIV. Os autores observaram que em todas as concentrações das NP houve efeito antibacteriano eficaz. No entanto, nas concentrações de 5% e 7% as propriedades físicas foram afetadas. Concluíram que o CIV contendo 3% de  $NPTiO_2$  mostrou ser um material restaurador promissor, com melhoras em suas propriedades mecânicas e antibacterianas.

Farret et al.<sup>26</sup> (2011) adicionaram gluconato de CLX a 10% e 18% a dois CIV utilizados para cimentação de banda para tratamento ortodôntico e avaliaram a resistência à tração diametral, à compressão e ao cisalhamento, assim como a atividade antibacteriana. Ao longo das análises, a adição de 18% de CLX demonstrou maior inibição da atividade antibacteriana que a concentração de 10%. Concluíram que a adição da CLX a esses materiais foi interessante já que houve aumento da atividade antibacteriana e não acarretou prejuízos às propriedades físicas do material.

Durante 90 dias de estudo, Tüzüner et al.<sup>75</sup> (2011) observaram permanência do efeito antibacteriano, manutenção da dureza e liberação de flúor de dois CIV (Fuji IX e Ketac Molar) após adição de 2,5% de diacetato de CLX e 2,5% de cetrimida. Observou-se menor dureza em relação aos grupos que continham apenas CIV. O Ketac Molar apresentou melhor efeito antibacteriano, adicionado à ambos os materiais e esse efeito foi contínuo por 90 dias. Com relação a liberação de flúor, nos dias 1 e 7 o Ketac Molar associado aos dois materiais foi melhor que o Fuji com CLX e cetrimida, porém nos dias 15 e 30 o Fuji apresentou melhor resultado.

Xie et al.<sup>80</sup> (2011), associaram 1%, 3%, 5%, 7%, 10% e 20% do sal de polietilenoamina de amônia quaternária ao CIV Fuji II LC e avaliaram a atividade antibacteriana por meio do teste do contato direto, a resistência à compressão e à tração diametral. Essa associação demonstrou atividade antibacteriana significativa

enquanto que diminuiu a resistência à compressão em todas as concentrações estudadas. Os autores concluíram que o material proposto pode ser clinicamente atraente por oferecer atividade antibacteriana maior do que o CIV convencional.

Cheng et al.<sup>15</sup> (2012) estudaram a adição de quatro materiais (fosfato de cálcio nanoparticulado, fluoreto de cálcio nanoparticulado, fosfato de cálcio nanoparticulado associado a 10% de CLX e fluoreto de cálcio com 10% de CLX) ao Vitremer, Heliomolar e Renamel, para serem testados quanto à atividade antibacteriana e resistência a flexão. A adição da CLX garantiu aos materiais melhora da atividade antibacteriana, um pH a cima de 6,5 e não houve alteração significativa da resistência a flexão. Observaram também que os grupos sem CLX apresentaram pH de 4,2 e maior resistência à flexão.

Hojati et al.<sup>36</sup> em 2013 adicionaram 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de NPZnO a uma resina flow e observaram que, embora o teste de difusão em ágar não tenha revelado diferença significativa entre os grupos, o teste de contato direto demonstrou que, ao aumentar a concentração de NP, o crescimento de bactérias foi significativamente diminuído. Não houve alteração na resistência à flexão e a resistência à compressão foi aumentada. As NPZnO resultaram em menor profundidade de cura da resina. Os autores concluíram que a adição de NPZnO a 1% na resina fluida inibiu significativamente o crescimento de *Streptococcus mutans* e não afetou prejudicialmente suas propriedades mecânicas.

A utilização de NP na odontologia foi estudada por Melo et al.<sup>55</sup> (2013) a partir de revisão de literatura. Relataram futuro promissor quanto ao desenvolvimento de novos biomateriais que podem causar impacto na gestão atual da cárie dentária. Afirmam ainda que, baseados na nanotecnologia, materiais restauradores podem proporcionar diferentes benefícios para prevenir e controlar a cárie dentária.

Becci et al.<sup>4</sup> em 2014, avaliaram a influência da adição do diacetato de CLX a 0,5%, 1% e 2% à um CIV de alta viscosidade, na resistência de união à dentina sadia e afetada por cárie artificial. A condição do substrato (dentina afetada ou sadia), não influenciou os valores de resistência de união. As falhas adesivas na dentina afetada pela cárie, aumentou proporcionalmente ao aumento da

concentração de CLX; para a dentina sadia o aumento das fraturas ocorreu apenas com 2% de CLX. Os autores concluíram que a adição de 0,5% ou 1% de CLX ao CIV não prejudicou a propriedade do material sendo uma boa opção para melhorar sua atividade antibacteriana.

Após incorporação de 0,5 % 1% e 2% de diacetato ou gluconato de CLX a um CIV convencional, Marti et al.<sup>50</sup> (2014) observaram aumento da área e número de poros proporcional ao aumento das concentrações de CLX e independente do material testado. O teste de rugosidade superficial não demonstrou alteração estatisticamente significativa em qualquer uma das concentrações de CLX utilizada. A avaliação da atividade antibacteriana no tempo de 1, 7, 14 e 21 dias demonstrou que a concentração de 1% de diacetato resultou em redução do número de microorganismos independente do tempo avaliado, sem prejuízo às propriedades físicas e mecânicas testadas.

Marti et al.<sup>51</sup> em 2014 avaliaram a dureza superficial, resistência a tração, tempo de presa e atividade antibacteriana de um CIV associado à gluconato de CLX nas concentrações de 0,5% 1% e 2%. Houve aumento estatisticamente significativo para o tempo de presa após a adição de CHX a 1% e 2%. O CIV associado à CLX a 2% foi o que apresentou a maior redução de dureza. Com relação à resistência à tração, apenas o grupo com CLX 2% apresentou redução significativa em relação ao grupo controle. Os autores observaram também que a atividade antibacteriana não apresentou alteração com a adição da CLX. A adição de gluconato de CLX a 0.5% com a finalidade de aumentar o efeito antibacteriano CIV foi viável e não interferiu nas propriedades estudadas.

Kasraei et al.<sup>45</sup> 2014 adicionaram 1% de NZnO ou NP de prata (Ag) à uma resina composta, com a finalidade de observar, por meio do teste de contato direto, o potencial antibacteriano desses materiais. Os grupos que continham NP apresentaram maior atividade antibacteriana que o grupo controle, tanto para *Streptococcus mutans* quanto para *Lactobacillus*. O efeito da NPZnO para *Streptococcus mutans* foi significativamente maior que para a NP de Ag. Para *Lactobacillus* não houve diferença significativa.

Farrugia e Camilleri<sup>27</sup> realizaram em 2015, revisão de literatura sobre as propriedades antibacterianas de resinas compostas e CIV. Concluíram que a adição de agentes antibacterianos aos materiais restauradores é bastante válida a fim de melhorar esta propriedade, porém não deve causar falhas de restauração. Ressaltam o acompanhamento em longo prazo desses novos materiais a fim de monitorar a durabilidade desse efeito antibacteriano

Em 2015, Gjorgievska et al.<sup>32</sup> adicionaram 10% de NP de óxido de alumínio, óxido de zircônio e dióxido de titânio à dois CIV. Ao avaliarem a resistência à compressão e imagens em MEV, observaram que as NP preencheram os espaços vazios presentes nos CIV e diminuíram as microfissuras internas. O dióxido de titânio aumentou a resistência a compressão dos materiais testados e as NP apresentaram-se distribuídas uniformemente por toda a matriz.

Por meio de implantes subcutâneos de CIV associado à 10 % e 18 % de CLX, Lacerda-Santos et al.<sup>47</sup> (2016) observaram, por meio de microscópio óptico, infiltrado inflamatório, edema, necrose, tecido de granulação, células gigantes multinucleadas e fibras de colágeno. Notaram que embora a concentração de 18% tenha resultado em efeito tóxico nos ratos estudados, a de 10% mostrou-se adequada quando considerada a biocompatibilidade com os tecidos dos animais.

Becci et al.<sup>5</sup> (2016) avaliaram in situ, durante 7 dias, a presença de *Streptococcus* totais, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp* e o total de polissacarídeos presente no biofilme formado na superfície de um CIV associado a CLX nas concentrações de 0,5, % e 2%. Observaram que a adição de CLX nas concentrações estudadas não reduziu o número de microorganismos. No entanto, nas concentrações de 1% e 2% de houve redução na produção de polissacarídeos, característica importante relacionada a menor capacidade de adesão da placa e formação de menor espessura de biofilme.

Moshaverinia et al.<sup>59</sup> (2016) avaliaram os efeitos da adição de NP de fluorapatita sobre a microdureza, a liberação de flúor e a biocompatibilidade quando associado a um CIV convencional. Observaram aumento da dureza para o grupo com NP quando comparado ao grupo controle; a liberação de flúor foi avaliada por

28 dias e não demonstrou diferença estatística entre os grupos testados; o grupo com NP não apresentou redução da atividade metabólica e se mostrou biocompatível.

Jaidka et al.<sup>41</sup> (2016) avaliaram, após 24 horas, a resistência à compressão, à tração diametral e ao cisalhamento de um CIV, associado ao diacetato de CLX ou ao Triclosano nas concentrações de 0,5%, 1,25% e 2,5%. Mostraram que 0,5% de CLX foi significativamente melhor em todos os testes avaliados, demonstrando ser a melhor opção para o uso clínico.

Em 2017, Mishra et al.<sup>56</sup> comparam os efeitos antibacterianos e as propriedades físicas de um CIV modificado com 10% de Quitosano ou com 2,5% de CLX-Cetrimida. Placas de Hawley contendo os corpos de prova foram utilizadas por 50 crianças com idade entre 7 e 12 anos por 48 horas. Os grupos experimentais foram divididos em: G I - CIV convencional (grupo controle), G II - CIV com quitosano e G III – CIV com CHX-Cetrimida. Observou-se aumento da atividade antibacteriana para *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* (Grupo II > III > I) e aumento na resistência à compressão e flexão (Grupo II > I > III). Concluíram que o CIV modificado por Quitosano foi eficaz na inibição das bactérias associadas as lesões de cárie junto com propriedades físicas melhoradas quando comparado com o CIV modificado por CHX-Cetrimida ou convencional.

Garcia et al.<sup>30</sup> em 2017 avaliaram a adição de NPZnO nas concentrações de 1% e 2% em CIV convencional e CIV modificado por resina quanto a atividade antibacteriana. O tempo de maturação do biofilme foi de 1 e 7 dias e o microrganismo testado foi o *Streptococcus mutans*. A morfologia do biofilme foi analisada por MEV. Observaram que para o CIV convencional não houve alteração na morfologia das células bacterianas em relação à concentração de NP e ao tempo do biofilme formado; para o CIV modificado por resina, quanto maior o tempo do biofilme maior o número de células aderidas, sendo a concentração de CLX não significativa. Concluíram que a adição dessas concentrações não proporcionou melhora da atividade antibacteriana dos materiais testados.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades físicas, mecânicas e antibacterianas de um CIV de alta viscosidade modificado por agentes antibacterianos

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

Para realização deste estudo foi utilizado o CIV Ketac Molar Easy Mix (3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) o qual, após pesagem em balança analítica (Gehaka Ltda- modelo BG 440), teve sua proporção pó-liquido estabelecida em peso, a partir da média aritmética dos valores de 10 pesagens de 1 porção de pó (colher medida fornecida pelo fabricante). Desse valor foi removida a porcentagem a ser estudada em peso e logo após, acrescentada a mesma quantidade de NPZnO ou de diacetato de CLX (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha).

As NPZnO foram sintetizadas pelo Grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo – USP.

### 4.1 Confeção dos espécimes

Foram confeccionados 520 corpos de prova para todo o experimento, sendo 10 corpos de prova por grupo experimental, exceto para àqueles submetidos ao MEV para avaliação da aderência e formação do biofilme (2 espécimes por grupo) e para o teste da atividade metabólica do biofilme (XTT) (5 espécimes por grupo). Utilizou-se uma matriz específica para cada teste a ser realizado. Após a inserção do material na matriz, foi acomodada sobre o mesmo uma tira de poliéster. Sobre esta foi colocada uma lâmina de vidro de 1 mm de espessura, e um peso de 100 g, por período de 30 s, para planificação e eliminação dos excessos de material. Para realização dos testes físicos e mecânicos os corpos de prova foram armazenados em recipiente apropriado com umidade relativa do ar de aproximadamente 100% por 24 horas a aproximadamente 37 °C.

As concentrações de NPZnO, assim como o número de corpos de prova para cada grupo experimental foram determinados a partir de projeto piloto (Apêndice). Nesta etapa foi realizado o teste de seleção inicial da atividade antibacteriana, nas concentrações de 0,5%, 1% e 2% para ambos os materiais testados, quando considerou-se para o estudo, àquelas que proporcionaram halo de inibição maior que 11 mm<sup>13</sup>.

As concentrações utilizadas neste trabalho foram 0,5%, 1% e 2% de diacetato de CLX e 2% de NPZnO.



## 4.2 Testes Físicos e Mecânicos

### Rugosidade superficial

Os corpos de prova (n=10) foram confeccionados por meio de uma matriz de teflon que apresentava dimensões de 4 mm de diâmetro e 2 mm de altura.

Na superfície de cada corpo de prova foram efetuadas três leituras em posições padronizadas, sempre iniciando a leitura 1 mm aquém da borda do espécime e passando pelo seu centro. O valor da rugosidade superficial (Ra) de cada espécime foi dado a partir do cálculo da média aritmética destes tres valores<sup>70</sup>. Realizou-se também, pelo próprio rugosímetro (Surfcorder SE 1700; Kosaka Laboratório Ltd, Kosaka, Japão), a média aritmética entre os picos e vales registrados e foi utilizado um *cut-off* de 0,25 mm, necessário para maximizar a filtragem da ondulação superficial.

### Porosidade

Os corpos de prova (n=10), foram confeccionados por meio de uma matriz de silicone e apresentaram dimensões de 6 mm de diâmetro por 3 mm de altura. Em todos os corpos de prova foi confeccionada uma canaleta, com auxílio de alta rotação, para direcionar a fratura dos mesmos em seu centro, a qual foi realizada com martelo e cinzel cirúrgicos. Estes fragmentos foram revestidos com liga de ouro-paládio sob alto vácuo e levados ao MEV (SM-300, Topcon, Tokyo, Japan) com aumento de 100 vezes para obtenção de imagens, as quais foram analisadas com auxílio do programa *Image J* (Rasband WS, Image J; US National Institutes of Health, Bethesda, MD). Todas as imagens obtidas, do interior do corpo de prova, foram subdivididas em quadrantes, sendo a área do primeiro quadrante analisada, para evitar tendências nos resultados<sup>16,52</sup>. O mesmo pesquisador realizou três leituras de cada imagem com 1 semana de intervalo entre elas, para avaliar a reprodutibilidade intra-examinador.

### Dureza Superficial

Os corpos de prova (n=10) foram confeccionados utilizando-se matrizes de teflon com 4 mm de diâmetro e 2 mm de altura (ISO 4049). Cada espécime foi polido seqüencialmente por discos abrasivos (da maior para a menor granulação) (Sof-Lex, 3M) acoplados à baixa-rotação, por um único operador, utilizando pressão leve<sup>3</sup>.

A leitura da dureza Vickers foi obtida por meio do microdurômetro digital (Micromet 2100 - Buehler Ltda., Lake Bluff, Illinois, EUA), aplicando-se carga de 50 gf durante 30 s sobre a superfície dos corpos de prova<sup>78</sup>. Estes, foram divididos em quatro quadrantes e, em cada um deles, foram realizadas duas endentações. Os resultados foram inicialmente expressos em micrometros ( $\mu\text{m}$ ), e transformados em valores de dureza Vickers (VHN) diretamente pela máquina de teste.

### **Resistência à compressão**

Os corpos de prova (n=10) foram confeccionados por meio de matriz metálica bipartida em aço inoxidável com 4 mm de diâmetro e 6 mm de altura (ISO 9917-1: 2007). Após 24 hs armazenados em água destilada foram submetidos ao teste em máquina de ensaios mecânicos (EMIC – Equipamentos e Sistemas de Ensaios Ltda, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com célula de carga com capacidade máxima de 5 kN, operando a uma velocidade de 0,5 mm/min. O valor máximo foi obtido assim que aconteceu a fratura do espécime.

## **4.3 Avaliação da Atividade Antibacteriana**

### **Preparo do inóculo**

Utilizou-se cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 504, a qual foi mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$  em glicerina e reativada em ágar BHI por 48 h. Em seguida, uma colônia foi adicionada a 15 mL de caldo infuso de cérebro e coração (BHI). Após incubação por 16 h, um inóculo foi preparado diluindo-se 10 vezes essa cultura em BHI suplementado com 0,2% de sacarose (caldo BHIS)<sup>24</sup>. Todas as incubações foram realizadas a  $37^{\circ}\text{C}$  em microaerofilia.

### **Atividade antibiofilme**

Os corpos de prova (n=10) foram confeccionados por meio de uma matriz de silicone com dimensões de 3 mm de altura por 6 mm de diâmetro sob condições assépticas.

Para crescimento dos biofilmes, foi utilizado modelo desenvolvido por Exterkate et al.<sup>24</sup> (2010) com adaptações, o qual permite que os corpos de prova

sejam fixados e suspensos verticalmente para favorecer a formação de biofilme somente com células capazes de aderir aos espécimes, evitando a deposição e aderência dos microrganismos pela força da gravidade. Os corpos de prova foram imersos em placas de 24 poços, contendo 2 mL do inóculo preparado de acordo com o descrito anteriormente. O meio de cultura foi renovado a cada 24 h.

Foi realizada contagem de células viáveis dos biofilmes após crescimento por 1, 7, 14 e 21 dias<sup>15,67</sup>.

Para contagem de células viáveis, os corpos de prova foram removidos do dispositivo e re-suspensos em 2 mL de solução salina 0,9%, com auxílio de ultrassom. Cada tubo permaneceu no ultrassom por 10 segundos, individualmente. A suspensão foi sequencialmente diluída e semeada em ágar BHI, em duplicata, para a quantificação de bactérias presentes. Após incubação por 48 h, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de contador de colônias digital. A contagem foi realizada por um pesquisador que desconhecia os grupos estudados e os resultados foram expressos em UFC/mL.

### **Atividade metabólica do biofilme**

Foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de XTT, o qual permite estimativa do metabolismo ativo microbiano por redução das enzimas desidrogenases, presentes no sistema de transporte de elétrons em um cristal solúvel em água, o formazano. O sal de XTT (Sigma, MO, USA) foi preparado em água ultrapurificada na concentração final de 1 mg/mL. A solução foi filtrada e armazenada a -20 °C até sua utilização. Solução de menadiona (Sigma, MO, USA) foi preparada em acetona a 0,4 mM anteriormente ao experimento. Cada poço recebeu 200 µL de solução (contendo 158 µL de PBS com 200 mM glicose, 40 µL de XTT e 2 µL de menadiona diluída). As placas foram incubadas por 3 horas no escuro a 37 °C. A absorbância foi determinada em 492 nm por espectrofotômetro (ELX 800 - Universal Microplate Reader; Bio-Tek instrument, Inc., VT, EUA). Os grupos (n=5) foram avaliados nos períodos de 1 e 7 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **Observação em MEV da aderência e formação de biofilme**

A observação em MEV (SM-300, Topcon, Tokyo, Japan) com aumento de 7.000X vezes da aderência e formação de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre a

superfície dos espécimes foi realizada para todos os grupos experimentais. Os procedimentos para incubação foram os mesmos em relação ao que foi realizado para o experimento da atividade antibiofilme. Os corpos de prova (n=2) foram colocados nos poços de uma placa de poliestireno e imersos em solução de glutaraldeído a 2,5% durante 15 minutos para a fixação dos microrganismos, seguida da desidratação gradual em séries de álcool (15, 30, 50, 70, 90 e 100%), por 15 minutos cada. Os corpos de prova foram então, fixados em *stubs* por meio de adesivo condutor elétrico e metalizados para a observação em MEV. Esta avaliação foi realizada para os períodos de 1 e 7 dias.

#### **4.4 Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente quanto à normalidade e a homogeneidade de variâncias. Realizou-se análise paramétrica de variância (ANOVA) para verificar diferença estatística seguida pelo teste de Tukey. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%. Avaliação qualitativa foi realizada para a observação em MEV da aderência e formação de biofilme.

## 5 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados as médias e desvios padrão de dureza Vickers, rugosidade superficial, número e percentual de área ocupada pelos poros e de resistência à compressão, de acordo com o material e suas concentrações. Para o teste de Dureza Vickers todos os grupos apresentaram redução de valores comparados ao grupo controle ( $p = 0,000$ ). O CIV associado à NP foi o grupo que apresentou maior rugosidade superficial comparada aos demais e o número ( $p=0,002$ ) e a área ( $p=0,000$ ) ocupada pelos poros do grupo CLX 0,5% apresentaram os menores valores com diferença estatística entre os grupos. O resultado para o teste de rugosidade superficial não apresentou diferença entre os grupos,  $p= 0,158$ .

Tabela 1- Médias (desvios padrão) dos dados para os testes de dureza (HVN), rugosidade superficial (Ra), número (n) e área (%) dos poros e resistência a compressão (mPa) de acordo com os grupos experimentais.

Grupos	Dureza (HVN)	Rugosidade (Ra)	N de Poros (n)	Área Poros (%)	Resistência Compr. (mPa)
Controle	64,90 (8,3) <sup>a</sup>	0,62 (0,26) <sup>a</sup>	55,62 (7,02) <sup>a</sup>	4,96(1,06) <sup>a</sup>	35,30 (19) <sup>a</sup>
NPZnO 2%	53,40 (7,1) <sup>b</sup>	3,06 (1,5) <sup>b</sup>	55,15 (9,79) <sup>a</sup>	4,75(1,10) <sup>a</sup>	24,23 (6,53) <sup>a</sup>
CLX 0,5%	40,39 (9,55) <sup>c</sup>	0,56 (0,30) <sup>a</sup>	37,15 (5,55) <sup>b</sup>	3,49(0,64) <sup>b</sup>	32,11 (11,51) <sup>a</sup>
CLX 1%	41,70 (4,2) <sup>c</sup>	0,41 (0,13) <sup>a</sup>	40,50 (6,63) <sup>b</sup>	4,93(0,78) <sup>a</sup>	36,85 (7,0) <sup>a</sup>
CLX 2%	37,60 (5,44) <sup>c</sup>	0,44 (0,19) <sup>a</sup>	45,10 (16,61) <sup>ab</sup>	5,59(1,23) <sup>a</sup>	33,24 (10,08) <sup>a</sup>

Nota: Médias nas colunas acompanhadas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ )  
 FONTE: Elaboração própria

Na Tabela 2 estão apresentados as médias e desvios padrão do teste de atividade metabólica (XTT) nos períodos de 24 horas e 7 dias, de acordo com o material e suas concentrações.

Tabela 2- Médias e desvios padrão do teste de atividade metabólica (XTT) nos períodos de 24 horas e 7 dias de acordo com os grupos experimentais.

<b>Grupos</b>	<b>XTT 24 horas</b>	<b>XTT 7 dias</b>
Controle	0,20 (0,07) <sup>Aa</sup>	0,23 (0,04) <sup>Aa</sup>
NPZnO 2%	0,10 (0,05) <sup>Ab</sup>	0,18 (0,04) <sup>Aa</sup>
CLX 0,5%	0,13( 0,07) <sup>Aab</sup>	0,25 (0,04) <sup>Ba</sup>
CLX 1%	0,06 (0,02) <sup>Ab</sup>	0,13 (0,04) <sup>Ab</sup>
CLX 2%	0,06 (0,04) <sup>Ab</sup>	0,21 (0,09) <sup>Ba</sup>

Notas: Médias nas colunas acompanhadas de letras minúsculas e médias nas linhas acompanhadas de letras maiúsculas indicam não haver diferença estatística significativa entre as mesmas ( $p>0,05$ ).

FONTE: Elaboração própria

A análise de variância apontou efeito significativo para a atividade metabólica ao longo dos dias ( $p= 0,020$ ). Nas primeiras 24 h todos os grupos experimentais foram estatisticamente semelhantes, demonstrando menor atividade metabólica quando comparadas ao grupo controle. Após 7 dias, a CLX a 1% foi o material que proporcionou menor atividade metabólica, com o mesmo potencial apresentado em 24h.

Na Tabela 3 observam-se as médias e desvios padrão do teste de atividade antibiofilme para os dias 1,7,14 e 21 apresentados em logaritmos decimais de UFC/mL de acordo com os grupos experimentais.

Tabela 3- Médias (desvios padrão) dos dados para o teste de atividade antibiofilme A análise de variância apontou efeito significativo em logaritmos decimais de UFC/mL de acordo com os grupos experimentais.

<b>Grupos</b>	<b>1 dia</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>21 dias</b>
<b>CONTROLE</b>	7,49 (0,09) <sup>Aa</sup>	8,53 (0,06) <sup>Ba</sup>	8,5 (0,05) <sup>Ba</sup>	8,79 (0,26) <sup>Ba</sup>
<b>NPZnO 2%</b>	7,37 (0,20) <sup>Aa</sup>	8,64 (0,04) <sup>Ba</sup>	8,5 (0,01) <sup>BCa</sup>	8,31 (0,31) <sup>Cb</sup>
<b>CLX 0,5%</b>	7,45 (0,21) <sup>Aa</sup>	8,49 (0,10) <sup>Ba</sup>	8,38 (0,06) <sup>Ba</sup>	8,51 (0,03) <sup>Bab</sup>
<b>CLX 1%</b>	7,86 (0,43) <sup>Aa</sup>	8,49 (0,10) <sup>Ba</sup>	7,42 (0,12) <sup>Cb</sup>	8,08 (0,45) <sup>Ab</sup>
<b>CLX 2%</b>	7,36 (0,14) <sup>Aa</sup>	8,28 (0,09) <sup>Ba</sup>	7,51 (0,07) <sup>Ab</sup>	8,3 (0,30) <sup>Bb</sup>

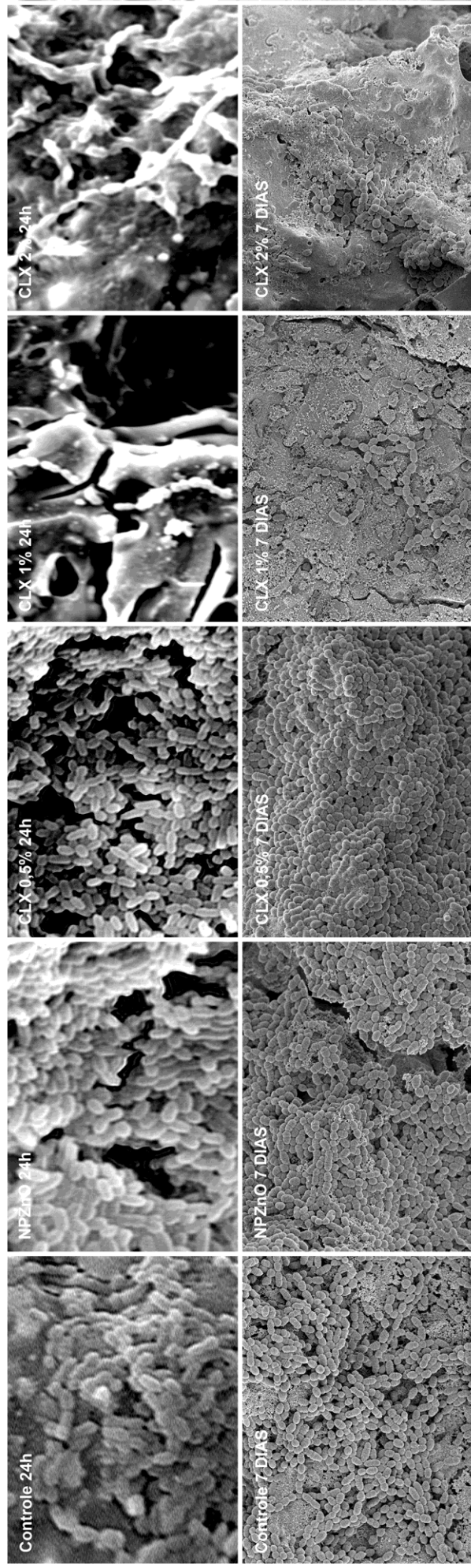
Nota: Médias nas colunas acompanhadas de letras minúsculas e médias nas linhas acompanhadas de letras maiúsculas indicam não haver diferença estatística significativa entre as mesmas ( $p>0,05$ ).

FONTE: Elaboração própria

No primeiro e sétimo dia a análise de variância não apontou efeito significativo entre os grupos ( $p > 0,005$ ). Na avaliação do 14<sup>o</sup> dia houve redução estatisticamente significativa do número de UFC/mL para os grupos modificados com 1% e 2% de diacetato de CLX. No 21<sup>o</sup> dia, todos os grupos avaliados apresentaram redução significativa nos valores de UFC/mL.

Na Figura 1 observam-se as imagens obtidas por meio da MEV para observação da aderência de biofilme ao longo de 1 e 7 dias de maturação de acordo com os grupos experimentais.

**Figura 1 – CIV de alta viscosidade associado a 2% de NPZnO e diacetato de CLX nas concentrações de 0,5%, 1% e 2% em relação ao tempo de maturação do biofilme (24 horas e 7 dias): material observado pela MEV (7.000X).**



Fonte: Elaboração própria



## 6 DISCUSSÃO

A adição de materiais antibacterianos aos CIV tem como principal objetivo diminuir a incidência de lesão de cárie secundária<sup>25,55</sup>. Ao serem associados aos materiais restauradores devem proporcionar superfície lisa, a fim de evitar a adesão e retenção de biofilme, além de apresentar características antibacterianas que diminuam ou evitem a desmineralização dental, sem prejuízo de suas propriedades físicas e mecânicas<sup>8,15,45,68,80</sup>.

A associação de NPZnO ou de CLX ao CIV, em quaisquer concentrações estudadas, demonstrou neste estudo, diminuição da dureza superficial (Tabela 1). Não foi encontrado na literatura a avaliação da dureza superficial de um CIV associado à NPZnO. Outras NP como a de fluorapatita, fluoreto de itérbio e sulfato de bário foram associadas ao CIV, como o Fuji IX e Riva, quando os autores observaram aumento da dureza para pequenas concentrações de NP<sup>59,63</sup>. Prentice et al.<sup>63</sup> (2011) observaram que para concentrações maiores que 10% de NP houve diminuição dessa propriedade. Os autores sugeriram, que a adição de NP aos CIV resulta em menor quantidade de partículas de vidro na superfície do material, proporcionando reação ácida mais intensa e alteração de sua dureza.

Quanto a adição de CLX, Türkun et al.<sup>74</sup> (2008), a associaram ao ChemFil Superior LY, nas concentrações de 0,5%, 1,25% e 2,5%, e não observaram redução da dureza para nenhum dos grupos experimentais acrescidos de diacetato de CLX. A redução da dureza superficial aconteceu apenas para os grupos com 0,5% e 2,5% de gluconato de CLX. Tüzüner et al.<sup>75</sup>, em 2011 adicionaram 2,5% de diacetato de CLX ao Fuji IX e ao Ketac Molar e observaram diminuição da dureza superficial corroborando os resultados deste estudo. A redução da dureza superficial pode resultar em abrasão do material e reduzir a resistência às forças mastigatórias, pois está diretamente ligada à resistência ao desgaste, podendo ser utilizada para indicar sua durabilidade em longo prazo<sup>53</sup>.

A rugosidade superficial também caracteriza importante propriedade quando considerada a durabilidade e vida útil de um material restaurador. Influencia significativamente na adesão bacteriana e formação de biofilme, uma vez que aumenta a retenção e a área de adesão, além de proteger as bactérias da remoção mecânica provocada pela mastigação<sup>55,64</sup>.

Todos os grupos estudados mantiveram a rugosidade superficial semelhante ao grupo controle, com exceção da NPZnO, a qual a aumentou significativamente (Tabela 1). Marti et al.<sup>50</sup> (2014), obtiveram os mesmos resultados quando trabalharam com CLX associada ao CIV. De acordo com Janus et al.<sup>42</sup>, 2010 e Berger et al.<sup>7</sup>, 2011, o aumento de rugosidade superficial encontrada quando do uso de NP pode ser explicada pelo fato de que esta propriedade não é influenciada apenas pelo tamanho das partículas inorgânicas.

Ao associar a NPZnO ao CIV, observou-se também, neste estudo, semelhança estatística ao grupo controle tanto no número quanto na área ocupada pelos poros no material (Tabela 1). Porém, quando da associação à CLX, houve redução do número de poros para as concentrações de 0,5% e 1%, sendo que a primeira também proporcionou redução da área ocupada pelos mesmos (Tabela 1). Marti et al.<sup>50</sup> (2014), observaram aumento diretamente proporcional do número e da área ocupada pelos poros em relação ao aumento da concentração da CLX. De acordo com Geirsson et al.<sup>31</sup> (2004), as diferenças na quantidade e área ocupadas pelos poros no interior de um material pode ser resultado das diferentes técnicas de manipulação/espátulação do mesmo, as quais podem agregar mais ou menos bolhas de ar em seu interior. Quanto menor o número e a área ocupados pelos poros, mais resistente será o material, pois a presença desses, resulta em maior fragilidade e conseqüentemente, menor durabilidade da restauração<sup>2,31,60</sup>.

Diferente de outros estudos encontrados na literatura<sup>36,62,72,74</sup>, neste, a associação de NPZnO ou de CLX em quaisquer concentrações ao CIV não interferiu nos valores de resistência à compressão quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Palmer et al.<sup>62</sup> (2004) observaram que houve redução da resistência à compressão diretamente proporcional ao aumento da concentração de CLX associada a um CIV. Prejuízo a esta propriedade também foi encontrado por Takahashi et al.<sup>72</sup> (2005) e Turkun et al.<sup>74</sup> (2008), quando da utilização de concentrações maiores que 1% de CLX. Hojati et al.<sup>36</sup> (2013), após incorporação de NPZnO (0,5% e 1%) à uma resina flow, observaram aumento da resistência à compressão apenas para a concentração de 1%.

A atividade antibiofilme resultante da associação do CIV a estes materiais também foi avaliada neste estudo a partir do modelo proposto por Exterkate et al.<sup>24</sup> (2010), quando os espécimes foram posicionados verticalmente e suspensos na solução, evitando a deposição e fixação dos microrganismos sedimentados no fundo

da placa por ação da gravidade, sendo possível, deste modo melhor avaliação desta propriedade<sup>73</sup>.

A potencialização da propriedade antibacteriana por meio da adição de diferentes materiais ao CIV também tem sido buscada por diversos autores<sup>4,5,15,30,50,51,71,72,74</sup>.

O CIV é um material que apresenta atividade antibacteriana devido a liberação de flúor ao meio bucal, o qual modifica o biofilme por meio de alterações das enzimas e interferência em seu metabolismo, levando assim, a apoptose celular<sup>20,38,61,69</sup>. A atividade antibacteriana do CIV também é atribuída à redução de pH do meio em que se encontra, resultante de sua reação ácido-base<sup>20,38,61,69</sup>. A presença de zinco também é considerada, pois juntos, o zinco e o fluoreto podem inibir o metabolismo bacteriano de forma mais efetiva do que quando isolados no material<sup>69</sup>.

Este estudo, na procura do aumento do potencial desta propriedade, observou-se que no 21º dia do experimento, todos os grupos experimentais apresentaram menor número de UFC/mL quando comparados ao grupo controle. Diminuição da UFC/mL no 14º dia pode ser observado após adição de CLX a 1% e 2% em relação aos grupo controle e demais grupos experimentais (Tabela 3).

O estudo de Garcia et al.<sup>30</sup> (2017) é um dos poucos trabalhos encontrados na literatura que avalia a atividade antibacteriana após associação NPZnO a um CIV de alta viscosidade. Os autores não observaram vantagem dessa associação em concentrações mais baixas como 1% e 2%, e Sevinç e Hanley<sup>68</sup> (2010), ao adicionarem NPZnO a 5% e 10% a uma resina composta, observaram inibição da atividade do biofilme. Hojati et al.<sup>36</sup> (2013) notaram relação diretamente proporcional entre o aumento das concentrações de NPZnO (1%, 2%, 3%, 4% e 5%) e aumento da atividade antibacteriana, sem considerarem, porém, a profundidade de polimerização, a qual interferiu negativamente na cura do material. Aumento da atividade antibacteriana também foi observada por Spencer et al.<sup>71</sup> (2009) ao associarem 13% e 23,1% de NP a um CIV modificado por resina, porém em detrimento de prejuízos à resistência de união.

Embora a CLX nas concentrações 1 e 2% tenham proporcionado redução de UFC/mL somente a partir do 14º dia de experimento (Tabela 3), deve-se considerar a importância do controle de biofilmes maduros, aqueles formados a partir de 14 dias

de desenvolvimento, os quais ocorrem em locais de difícil higienização, propiciando o desenvolvimento da lesão de cárie<sup>24</sup>.

Ao longo dos 21 dias de análise, observamos que a CLX 1% manteve o mesmo número de UFC/mL que apresentou nas primeiras 24 h do estudo, embora no 14º dia tenha o reduzido significativamente (Tabela 3). Marti<sup>50</sup> e colaboradores observaram redução no número de UFC/mL desde o primeiro dia do experimento e esta diferença pode ser atribuída a confecção dos corpos de prova, uma vez que os autores submeteram os mesmos à esterilização por radiação o que determinou maior tempo para que começassem as análises, e neste estudo, foram confeccionados em fluxo laminar para, imediatamente, serem submetidos ao meio. Para Du et al<sup>19</sup>. (2012), a maior liberação de diacetato de CLX acontece durante a reação de presa do CIV, nas primeiras 24 h.

O efeito antibacteriano da CLX associada ao material restaurador é maior nas primeiras horas, estabiliza em 10 dias, e continua mensurável por até 90 dias<sup>19,37,74</sup>. O diacetato de CLX, a 1% no 14º dia, foi capaz de reduzir de  $10^8$  para  $10^7$  UFC/mL na concentração de *S. mutans*, representando 90% na diminuição da concentração de bactérias no biofilme maduro quando comparado com o primeiro dia de experimento (Tabela 3).

A atividade metabólica do microrganismo foi avaliada pelo teste de XTT, o qual permite estimar o metabolismo ativo microbiano por meio da avaliação da redução das enzimas desidrogenases. O CIV é um material que apresenta baixo valor de XTT, provavelmente, pela liberação de flúor<sup>69</sup>. Observou-se que em 24 h todos os materiais apresentaram menor atividade metabólica quando comparados ao grupo controle, porém na análise do 7º dia apenas a CLX 1% foi capaz de manter essa redução (Tabela 2).

A Figura 1 ilustra a aderência e formação de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre a superfície dos espécimes no primeiro e sétimo dia de experimento.

Ao buscar um material ideal e com efetiva atividade antibacteriana para o uso em odontologia, principalmente em odontopediatria, deve-se levar em consideração a redução do biofilme, sem que haja prejuízos de suas propriedades físicas e mecânicas. Os resultados encontrados neste estudo podem favorecer o desenvolvimento de futuros materiais restauradores associados à NPZnO ou ao diacetato de CLX. Outros estudos devem ser realizados nessa área com a finalidade

de determinar a concentração mais adequada desse material a fim de transpor os resultados laboratoriais para a prática clínica.

## **CONCLUSÃO**

O CIV modificado por diacetato de CLX 1% foi o material com resultados antibacterianos mais promissores, e embora tenha diminuído a dureza superficial do CIV não causou prejuízos as demais propriedades físicas e mecânicas estudadas.

**REFERÊNCIAS \***

1. Applerot G; Lellouche J; Perkas N; Nitzan Y; Gedanken A; Banin E. ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility. *RSC Adv.* 2012; 2: 2314–21.
2. Arcoria CJ, Butler JR, Wagner MJ, Vitasek BA. Bending strength of Fuji and Ketac glass ionomers after sonication. *J Oral Rehabil.* 1992; 19(6): 607-13.
3. Bala O, Arisu HD, Yikilgan I, Arslan S, Gullu A. Evaluation of surface roughness and hardness of different glass ionomer cements. *Eur J Dent.* 2012; 6(1): 79-86.
4. Becci ACO, Marti LM, Zuanon ACC, Brighenti FL, Spolidório DMP, Giro EMA. Influence of the addition of chlorhexidine diacetate on bond strength of a high-viscosity glass ionomer cement to sound and artificial caries-affected dentin. *Rev Odontol UNESP.* 2014; 43(1): 1-7.
5. 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: 277-281.
6. Beldüz N, Kamburoğlu A, Yılmaz Y, Tosun , Beldüz M, Kara C. Evaluation of candida albicans biofilm formation on various dental restorative material surfaces. *Niger J Clin Pract.* 2017; 20(3): 355-60.
7. Berger SB, Palialol ARM, Cavalli V, Giannini M. Surface roughness and staining susceptibility of composite resins after finishing and polishing. *J Esthet Restor Dent.* 2011; 23(1): 34-43.
8. Beyth N, Hourri-Haddad Y, Baranes-Hadar L, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI. Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials.* 2008; 29 (31): 4157-63.
9. Bjorndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesion during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res.* 1997; 31(6): 411-7.
10. Bjorndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res.* 2000; 34(6): 502-8.
11. Blecher K, Nasir A, Friedman A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease, *Virulence.* 2012; 1(5): 395–401.
12. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res.* 2003; 37(2): 108–14.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem ACB, Oliveira MAC, Soares, Freitas LSF, Koga-Ito CY. Systematic Screening of Plant Extracts from the Brazilian Pantanal with Antimicrobial Activity against Bacteria with Cariogenic Relevance. *Caries Res.* 2014; 48(5): 353-60.
14. Bruschi ML, Lara EH, Martins CH, Vinholis AH, Casemiro LA, Panzeri H, Gremiao MP: Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. *Drug Dev Ind Pharm* 2006; 32:229–38.
15. Cheng L, Weir MD, Xu HHK, Kraigsleyf AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, et al. Antibacterial and physical properties of calcium–phosphate and calcium–fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dent mater.* 2012; 28(5): 573–83.
16. Coldebella CR, Santos-Pinto L, Zuanon AC. Effect of ultrasonic excitation on the porosity of glass ionomer cement: A scanning electron microscope evaluation. *Microsc Res Tech.* 2011; 74(1): 54-7.
17. Du X, Huang X, Huang C, Frencken JE, Yang T. Inhibition of early biofilm formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study. *Aust Dent J.* 2012; 57(1): 58-64.
18. 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.
19. Du X, Huang X, Huang C, Frencken JE, Yang T. Inhibition of early biofilm formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study. *Aust Dent J.* 2012; 57(1):58-64
20. Duque C, Negrini TC, Hebling J, Spolidorio DM. Inhibitory activity of glassionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper Dent.* 2005; 30(5): 636-40.
21. Duque C, Negrini TC, Sacono NT, Spolidorio DMP, Costa CAS, Hebling J. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clinic Oral Investig.* 2009; 13(4): 465-71.
22. Elsaka SE, Hamouda IM, Swain MV. Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties. *J Dent.* 2011; 39(9): 589-98.
23. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res.* 1977; 85(4): 255–65.
24. Exterkate RA, 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.
25. Fan C, Chu L, Rawls HR, Norling BK, Cardenas HL, Whang K. Development of an antimicrobial resin – a pilot study. *Dent Mater.* 2011; 27(4): 322-8.



26. Farret MM1, de Lima EM, Mota EG, Oshima HM, Barth V, de Oliveira SD. Can we add chlorhexidine into glass ionomer cements for band cementation? *Angle Orthod.* 2011; 81(3):496-502
27. Farrugia C, Camilleri J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review. *Dent Mater.* 2015; 31(4): e89-99.
28. 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.
29. Gama-Teixeira A, Simionato MR, Elian SN, Sobral MAP, de Cerqueira Luz MAA. Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro. *Braz Oral Res.* 2007; 21: 368-74
30. Garcia PPNS, Cardia MFB, Francisconi RS, Dovigo LN, Spolidório DMP, de Souza Rastelli AN, Botta AC. Antibacterial activity of glass ionomer cement modified by zinc oxide nanoparticles *Microsc Res Tech.* 2017; 80(5): 456-61.
31. Geirsson J, Thompson JY, Bayne SC. Porosity evaluation and pore size distribution of a novel directly placed ceramic restorative material. *Dent Mater.* 2004; 20(10): 987–95.
32. Gjorgjevska E, Van Tendeloo G, Nicholson JW, Coleman NJ, Slipper IJ, Booth S. The incorporation of nanoparticles into conventional glass-ionomer dental restorative cements. *Microsc Microanal.* 2015; 21(2): 392-406.
33. Hamouda T, Hayes M, Cao Z, Tonda R, Johnson K, Craig W, Brisker J, Baker J. A novel surfactant nanoemulsion with broad-spectrum sporicidal activity against Bacillus species. *J Infect Dis.* 1999; 180(6): 1939-49.
34. Hayashi M, Fujitani M, Yamaki C, Momoi Y. Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation – a systematic review. *J Dent* 2011; 39(2): 95–107.
35. Hernandez-Sierra JF, Ruiz F, Pena DCCP, Martinez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén AJP, et al. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. *Nanomedicine.* 2008; 4(3): 237-40.
36. Hojati ST, Alaghemand H, Hamze F, Babaki FA, Rajab-Nia R, Rezvani MB, et al. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. *Dent Mater.* 2013; 29(5): 495-505.
37. 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.

38. Huang Z, Zheng X, Yan D, Yin G, Liao X, Kang Y, et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*. 2008; 24(8): 4140-4.
39. International Organization for Standardization. ISO 4049: dentistry-polymer-based filling, restorative and luting materials. 3rd ed. Geneva: ISO; 2000.
40. International Organization for Standardization. ISO 9917-1: dentistry-water-based cements—part 1: powder/liquid acid–base cements. Geneva: ISO; 2007.
41. Jaidka S, Somani R, Singh DJ, Shafat S. Comparative evaluation of compressive strength, diametral tensile strength and shear bond strength of GIC type IX, chlorhexidine-incorporated GIC and triclosan-incorporated GIC: an in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016; 6: 64-9.
42. Janus J, Fauxpoint G, Arntz Y, Pelletier H, Etienne O. Surface roughness and morphology of three nanocomposites after two different 93 polishing treatments by a multitechnique approach. *Dent Mater*. 2010; 26(5): 416- 25.
43. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil*. 1983; 10(5): 373- 81.
44. Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 279(1): 71-6.
45. Kasraei S, Sami L, Hendi S, Alikhani MY, Rezaei-Soufi L, Khamverdi Z. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Restor Dent Endod*. 2014; 39(2): 109-14.
46. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3: 95-101
47. Lacerda-Santos R, Sampaio GA, Moura Mde F, Carvalho FG, Santos AD, Pithon MM, et al. Effect of different concentrations of chlorhexidine in glass-ionomer cements on In vivo biocompatibility. *J Adhes Dent*. 2016; 18(4): 325-30.
48. Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escheria coli* O157:H7. *J Appl Microbiol*. 2009; 107(4): 1193-201.
49. Maltz M, Oliveira E, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int*. 2002; 33(2): 151-9.
50. Marti LM, Becci AC, Spolidorio DM, Brighenti FL, Giro EM, Zuanon AC. Incorporation of chlorhexidine gluconate or diacetate into a glass-ionomer cement: porosity, surface roughness, and anti-biofilm activity. *Am J Dent*. 2014; 27(6):318-22.

51. Marti LM, Mata Md, Ferraz-Santos B, Azevedo ER, Giro EM, Zuanon AC. Addition of chlorhexidine gluconate to a glass ionomer cement: a study on mechanical, physical and antibacterial properties. *Braz Dent J.* 2014; 25(1): 33-7.
52. Da Mata M, Santos-Pinto L, Zuanon ACC. Influences of the insertion method in glass ionomer cement porosity. *Microsc Res Tech.* 2012; 75(5): 667–70.
53. McKinney JE, Wu W. Chemical softening and wear of dental composites. *J Dent Res.* 1985; 64(11): 1326–31.
54. Mei, L, Busscher, HJ, van der Mei, HC and Ren, Y. Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. *Dent Mater.* 2011; 27(8): 770–8.
55. Melo MA, Guedes SF, Xu HH, Rodrigues LK. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(8): 459-6.
56. Mishra A, Pandey RK, Manickam N. Antibacterial effect and physical properties of chitosan and chlorhexidine-cetrimide-modified glass ionomer cements. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2017; 35(1): 28-33.
57. Mjör IA, Moorhead JE, Dahl JE. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *Int Dent J.* 2000; 50(6): 360-6.
58. Morrier JJ, Barsotti O, Blanc-Benon J, Rocca JP, Dumont J. Antibacterial properties of five dental amalgams: an in vitro study. *Dent Mater.* 1989; 5(5): 310-3.
59. Moshaverinia M1, Borzabadi-Farahani A, Sameni A, Moshaverinia A, Ansari S. Effects of incorporation of nano-fluorapatite particles on microhardness, fluoride releasing properties, and biocompatibility of a conventional glass ionomer cement (GIC). *Dent Mater J.* 2016; 35(5): 817-21.
60. Nomoto R, McCabe JF. Effect of mixing methods on the compressive strength of glass ionomer cements. *J Dent.* 2001; 29(3): 205–10.
61. 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
62. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004; 25(23): 5423-31.
63. Prentice, Martin J. Tyas, Michael F. Burrow The effect of ytterbium fluoride and barium sulphate nanoparticles on the reactivity and strength of a glass-ionomer cement. *Dent Mater.* 2006; (22): 746–51.
64. Quirynen, M. and Bollen, C.M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995; 22(1): 1–14.

65. Ribeiro J, Ericson D. In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res*. 1999; 99(6): 533-40.
66. Salvador MJ, Ferreira EO, Pral EMF, Alfieri SC, Albuquerque S, Ito IY, et al. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparón portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine* 2002; 9(6): 566–71.
67. Sanders BJ, Gregory RL, Moore K, Avery DR. Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with clorexidine. *J Oral Rehabil*. 2002; 29(6): 553-8.
68. Sevinç BA, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94(1): 22–31.
69. Sidhu SK, Schmalz G. The biocompatibility of glass-ionomer cement materials. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent*. 2001; 14(6): 387-96.
70. Silva RC, Zuanon ACC. Surface roughness of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment (ART). *Braz Dent J*. 2006; 17(2): 106-9.
71. Spencer CG, Campbell PM, Buschang PH, Cai J, Honeyman AL. Antimicrobial effects of zinc oxide in an orthodontic bonding agent. *Angle Orthod*. 2009; 79(2): 317-22.
72. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater*. 2006; 22(7): 647–52.
73. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006; 94(1): 1-9.
74. 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 Den*. 2008; 20(1): 29-44.
75. 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.
76. Verran J, Sandoval G, Allen NS, Edge M, Stratton J. Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes Pigment*. 2007; 73(3): 298-304.
77. Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE. Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-year in vivo effects. *Caries Res*. 1999; 33(2): 130–4.
78. Xia Y, Zhang F, Xie H, Gu N. Nanoparticle-reinforced resin-based dental composites. *J Dent*. 2008; 36(6): 450-5.

79. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16(2): 129-38.
80. Xie D, Weng Y, Guo X, Zhao J, Gregory RL, Zheng C. Preparation and evaluation of a novel glass-ionomer cement with antibacterial functions. *Dent Mater.* 2011; 27(5): 487-96.

**APÊNDICE**

Média (mm) do halo de inibição de cada material.

<b>Material</b>	<b>Média (mm)</b>
<b>Controle</b>	0
<b>CHX 0,5</b>	21
<b>CHX 1</b>	24
<b>CHX 2</b>	24
<b>ZnO 0,5</b>	8
<b>ZnO 1</b>	8,5
<b>ZnO 2</b>	14

FONTE: Elaboração própria

**Não autorizo a reprodução deste trabalho até 12/09/2019.**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 12 de setembro de 2017.**

**LUANA MAFRA MARTI**