



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LUANA MAFRA MARTI

**Incorporação de Gluconato ou
Diacetato de Clorexidina
a um Cimento de Ionômero de Vidro:
porosidade, rugosidade superficial e
atividade antibiofilme.**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LUANA MAFRA MARTI

**Incorporação de Gluconato ou
Diacetato de Clorexidina
a um Cimento de Ionômero de Vidro:
porosidade, rugosidade superficial e
atividade antibiofilme.**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Cristina Cilense Zuanon

Araraquara
2013

Marti, Luana Mafra

Incorporação de gluconato ou diacetato de clorexidina a um cimento de ionômero de vidro: porosidade, rugosidade superficial e atividade anti-biofilme / Luana Mafra Marti.-- Araraquara: [s.n.], 2013.

70 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon

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

Luana Mafra Marti

**Incorporação de Gluconato ou
Diacetato de Clorexidina a um
Cimento de Ionômero de Vidro:
porosidade, rugosidade superficial e
atividade antibiofilme**

COMISSÃO JULGADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e OrientadorProf. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon
2º ExaminadorProf. Dr. Cyneu Aguiar Pansani
3º ExaminadorProf. Dra. Karina Antunes Neves

Araraquara, 24 de julho de 2013

Luana Mafra Marti

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 19/11/1985 – Aguai-SP

Filiação: Francisco Marti Gonzalez e Leda Ap. Baldin Mafra Marti

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2006-2010: Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

2011-2012: Curso de Especialização
Odontopediatria
APCD- Araraquara

2011-2013: Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas,
Área de Concentração em Odontopediatria, nível Mestrado,
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

"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

DEDICATÓRIA

“SER FELIZ É ENCONTRAR FORÇA NO PERDÃO, ESPERANÇAS NAS BATALHAS,
SEGURANÇA NO PALCO DO MEDO, AMOR NOS DESENCONTROS. É AGRADECER A
DEUS A CADA MINUTO PELO MILAGRE DA VIDA.”

FERNANDO PESSOA

A *Deus*, que me fez entender que o tempo DELE é muito diferente do meu, mas que sempre vale a pena esperar.

Aos meus pais, *Leda* e *Francisco* e ao meu irmão *Emílio* que sempre me apoiaram e garantiram todo o suporte para que eu conseguisse realizar mais esse sonho. Sempre estiveram por trás de todas minhas atitudes e decisões. Agradeço cada preocupação, cada noite mal dormida, cada esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui, sem vocês nada seria possível. Vocês são responsável por tudo o que sou hoje, o que fui ontem e serei amanhã! Obrigada por acreditarem em mim!

“...APRENDE QUE HÁ MAIS DOS SEUS PAIS EM VOCÊ DO QUE VOCÊ SUPUNHA...”

WILLIAM SHAKESPEARE

“EU AGORA SEI BEM QUE OS MELHORES BRINQUEDOS SÃO OS IRMÃOS. BRINQUEDOS VIVOS, QUE DÃO E RECEBEM, QUE NOS FAZEM CRESCER E CRESCEM TAMBÉM PELAS NOSSAS MÃOS...”

PAULO GERALDO

A minha *família* que sempre torceu e comemorou comigo cada vitória, cada sonho, me dando o respaldo necessário para chegar até aqui, e daqui a pouco, até lá!!

Ao meu namorado *André* que chegou no meio desse turbilhão e foi fundamental por me ajudar a ter calma, serenidade e paciência para concluir esse trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

...A FELICIDADE APARECE PARA AQUELES QUE CHORAM.

PARA AQUELES QUE SE MACHUCAM.

PARA AQUELES QUE BUSCAM E TENTAM SEMPRE.

E PARA AQUELES QUE RECONHECEM

A IMPORTANCIA DAS PESSOAS QUE PASSAM POR SUAS VIDAS...

CLARICE LISPECTOR

A minha orientadora **Profª. Drª. Ângela Cristina Cilense Zuanon**. Agradeço toda dedicação, atenção e paciência. Sempre disposta a ajudar, conquistou meu carinho, admiração e confiança.

A **Profª. Drª. Fernanda Lourenção Brighenti**, por toda sua paciência em ensinar, colaborar e compartilhar o que para mim era novo.

A **Profª. Drª. Elisa Maria Ap. Giro**, por toda a atenção e carinho dispendidos ao nosso trabalho.

Aos professores doutores da Disciplina de Odontopediatria, **Angela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Fernanda Lourenção Brighenti, Josimeri Hebling Costa, Lourdes dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro** que contribuíram para que pudesse chegar até aqui.

“... TALVEZ EU SEJA UM POUCO DO QUE VOCÊ DEIXOU EM MIM...”

RUBENS ALVES

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, **UNESP**, e ao **Departamento de Clínica Infantil** por terem me recebido e proporcionado todas as condições de ensino e aprendizado para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, **Antonio Parciaseppe Cabrini, Dulce Helena de Oliveira, Sônia Maria Tircailo, Odete Amaral, Marcia Elena Carvalho Held, Cristina Ferreira Affonso, Pedro César Alves, Diego Cardoso Pendenza, Regina Aparecida Favarin e Tânia Ap. Moreira dos Santos**, por todo respaldo para um trabalho bem feito .

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação **Mara e Alexandre** por toda atenção dispendida.

...É IMPOSSÍVEL SER FELIZ SOZINHO...

Tom Jobim

Aos meus amigos do mestrado *Carol, Diego, Liege, Manuel e Thamiris* a final formamos uma turma e tanto, obrigada pelos dias de risada, pelas conquistas compartilhadas, horas estudadas ...enfim ...fundamentais, essenciais.

A todos os meus amigos da pós-graduação *Ana Paula, Camila, Thalita, Luciana, Rosa, Juliana, Renata, Fabiano, Marcinha, Leopoldina* que colaboraram para que meus dias fossem mais felizes, o trabalho mais leve e as risadas constantes.

A amiga *Ecilaine* por toda paciência dispensada a mim, quando eu nada sabia, por toda a calma durante os ensinamentos e por todas as ajudas prestadas.

Aos meus *amigos de uma vida*, levo vocês no coração, sempre.

“A GENTE NÃO FAZ AMIGOS, RECONHECE-OS.”
VINÍCIUS DE MORAES

Resumo

Marti LM. Incorporação de gluconato ou diacetato de clorexidina a um cimento de ionômero de vidro: porosidade, rugosidade superficial e atividade antibiofilme. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a porosidade, rugosidade superficial e atividade antibiofilme de um cimento de ionômero de vidro (CIV) após a incorporação de gluconato ou diacetato de clorexidina (CLX) em diferentes concentrações. Para os testes de porosidade e rugosidade superficial foram confeccionados 10 corpos de prova com o CIV Ketac Molar EasyMix (KM) divididos nos grupos: controle (C), CIV e diacetato de CHX 0,5% (D1), CIV e diacetato de CHX 1,0% (D2) e CIV e diacetato de CHX 2,0% (D3), CIV e gluconato de CHX 0,5% (G1), CIV e gluconato de CHX 1,0% (G2), CIV e gluconato de CHX 2,0% (G3). Para a avaliação da porosidade, os corpos de prova foram fraturados, os fragmentos foram fotografados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e as imagens, analisadas com auxílio do programa Image J. A rugosidade superficial (Ra) foi obtida por meio da média de três leituras realizadas na superfície de cada espécime, passando sempre pelo centro da mesma. Para a análise do teste de atividade antibiofilme foram utilizadas cepas de *S. mutans* ATCC 25175 e os grupos foram divididos em: C1 - CIV (1 dia); C2 - CIV (7 dias), C3- CIV (14 dias), C4 - CIV (21 dias); grupo D1: CIV+CLX (1 dia), D2 - CIV+CLX (7 dias), D3: CIV+CLX (14 dias), D4: CIV+CLX (21 dias); G1- CIV+ CLX (1 dia), G2- CIV+ CLX (7 dias), G3- CIV+ CLX (14 dias) e G4- CIV+ CLX (21 dias) sendo 10 corpos de prova por grupo. Para crescimento dos biofilmes, os espécimes foram posicionados verticalmente em placas de 24 poços, contendo 1,5 mL de inóculo fresco preparado em caldo BHI diluindo-se 10 vezes uma suspensão incubada *overnight* e 0,2% de sacarose. O meio de cultura foi renovado a cada 24 h. Após crescimento por 1, 7, 14 e 21 dias, os biofilmes foram re-suspensos em solução salina. A suspensão foi

diluída e semeada em ágar BHI, para a quantificação de bactérias presentes. Para avaliação de todos os testes utilizou-se análises de variância de dois fatores e se necessário, aplicou-se o teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Quanto à porosidade do CIV, a análise de variância apontou que a presença de CLX aumentou a área de poros ($p < 0,001$) proporcionalmente ao aumento de suas concentrações ($p = 0,001$), sem porém, apresentar interação entre material e concentração ($p = 0,705$). Em relação ao número de poros, observou-se que houve aumento significativo dos mesmos com o aumento da concentração de CLX ($p = 0,003$). O teste de rugosidade superficial não demonstrou efeito estatisticamente significativo quanto ao aumento ou diminuição da rugosidade em qualquer uma das concentrações de CLX utilizada ($p > 0,05$). A análise da atividade antibiofilme apontou efeito significativo dos fatores material ($p = 0,006$) e tempo ($p < 0,001$), sendo que o diacetato de CLX apresentou maior efetividade na diminuição dos microrganismos. Assim, pode-se concluir que quando da busca de melhor efeito antibacteriano do CIV KM, não se deve optar pela adição de diacetato ou gluconato CLX nas concentrações estudadas, pois o gluconato de CLX demonstrou que as propriedades físicas estudadas mantiveram-se semelhantes ao grupo C, assim como a atividade antibacteriana. Com adição de diacetato de CLX observou-se diminuição significativa de microrganismo, sem porém tirar o paciente da condição de alto risco, além de proporcionar menor número de poros que ocuparam maior área, indicando a formação de poros maiores e prováveis prejuízos para o sucesso clínico das restaurações.

Palavras chave: cimentos de ionômeros de vidro, clorexidina, porosidade, biofilme.

Abstract

Marti LM. Incorporation of gluconate or chlorhexidine diacetate to a glass-ionomer cement: porosity, surface roughness and antibiofilm activity. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the porosity, surface roughness and antibiofilm activity of a glass ionomer cement (GIC) after incorporating gluconate or chlorhexidine diacetate (CHX) at different concentrations. For tests of porosity and surface roughness were prepared 10 specimens with GIC Ketac Molar EasyMix (KM) divided into groups: control (C), and GIC CHX gluconate 0.5% (G1), GIC and 1.0% CHX gluconate (G2), and GIC 2.0% CHX gluconate (G3), GIC and 0.5% CHX diacetate (D1), GIC and 1.0% CHX diacetate (D2) and GIC and 2.0% CHX diacetate (D3). For the evaluation of porosity, the samples were fractured, the fragments were photographed under a microscopy scanning electron (SEM) and the images analyzed with the software Image J. The surface roughness (Ra) was measured by the mean of three readings taken at the surface of each specimen, always passing through the center thereof. For the analysis of the test anti-biofilm activity were used strains of *S. mutans* ATCC 25175 and were divided into groups: C1 - GIC (1 day); C2 - GIC (7 days), C3- GIC (14 days), C4 - GIC (21 days); group D1: GIC +CHX (1 day), D2 - GIC +CHX (7 days), D3: GIC +CHX (14 days), D4: GIC +CHX (21 days); G1- GIC + CHX (1 days), G2- GIC + CHX (7 days), G3- GIC + CHX (14 days) e G4- GIC + CHX (21 dias), with 10 specimens per group. For growth of biofilms, the specimens were positioned vertically in 24-well plates containing 1.5 mL of inoculum in fresh BHI broth prepared by diluting 10-fold a suspension incubated overnight and 0.2% sucrose. The culture medium was renewed every 24 h. After growth for 1, 7, 14 and 21 days, biofilms were re-suspended in saline. The suspension was diluted and plated on BHI agar for quantitation of bacteria. For evaluation of all tests we used analysis of variance of two factors, and if necessary, we applied the Tukey test, with significance level of 5%.As for the porosity of the GIC, analysis of variance indicated that the presence of CHX increased pore area

($p < 0.001$) increase in proportion to their concentration ($p = 0.001$) without however presenting the interaction between equipment and concentration ($P = 0.705$). Regarding the number of pores observed a significant increase thereof with increasing concentration of CHX ($p = 0.003$). The surface roughness test showed no statistically significant effect on the increase or decrease in roughness at any of the concentrations used CHX ($p > 0.05$). The activity analysis pointed antibiofilm significant effect of composite ($p = 0.006$) and time ($p < 0.001$), whereas CHX diacetate showed greater effectiveness in reducing microorganisms. Thus, it can be concluded that when searching for the best antibacterial effect the GIC KM should not choose the addition diacetate or gluconato of CHX in the studied concentrations, as the gluconato of CHX showed that the physical properties studied were kept similar to group C, and the activity antibacateriana. With the addition of diacetate CHX observed significant decrease of microorganism, but without taking the patient's high-risk condition, and provide fewer pores occupying the largest area, indicating the formation of larger pores and probable losses for clinical success restorations.

Keywords: glass ionomer cements, chlorhexidine, porosity, biofilm

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
PROPOSIÇÃO.....	24
ESTUDO 1.....	26
ESTUDO 2.....	44
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
REFERÊNCIAS.....	65

Introdução

O tratamento restaurador atraumático (TRA), voltado para a mínima intervenção e máxima preservação do elemento dentário (Frencken, Leal¹¹, 2010; Lima et al.²³, 2008; Massoni et al.²⁷, 2006), tem como finalidade manter o elemento dentário sadio, evitando a remoção excessiva do tecido e o risco de exposição pulpar em cavidades profundas, uma vez que é originalmente indicado para atender populações carentes que não tem acesso ao serviço odontológico tradicional. Baseada na capacidade de remineralização da dentina afetada, esta técnica pode promover a interrupção do processo de desenvolvimento da lesão de cárie e induzir a reparação da dentina. (Bjorndal et al.³, 1997; Duque et al.⁸, 2009; Hayashi et al.¹⁶, 2011).

Após a remoção da dentina infectada com instrumentos manuais e limpeza da cavidade, esta é preenchida preferencialmente com cimento de ionômero de vidro (CIV) (Frencken, Leal.¹¹, 2010, Frencken et al.¹², 2004). Este material favorece a remineralização e reorganização dos tecidos dentários (Maltz et al.²⁵, 2002) e contribui para que a técnica seja bem sucedida no controle do desenvolvimento das lesões de cárie (Holmgren et al.¹⁸, 2013).

Os CIV apresentam propriedades importantes, como a biocompatibilidade, adesividade química às estruturas do dente, capacidade de liberação e reincorporação de flúor do meio bucal e coeficiente de expansão térmica linear semelhante ao da dentina (Mhaviile et al.²⁸, 2006; Pellegrinetti et al.³¹, 2005; Türkun et al.³⁷, 2008). Um dos principais objetivos da aplicação da técnica do TRA é o controle da microbiota da cavidade bucal, e por isso, para potencializar esta propriedade, a adição de um agente antibacteriano a este material demonstra ser uma boa opção clínica (Palmer et al.³⁰, 2004; Takahashi et al.³⁵, 2006; Verraedt et al.³⁹, 2010). Takahashi et al.³⁵ (2006)

observaram que um benefício terapêutico foi obtido quando substâncias antibacterianas foram utilizadas em associação com um CIV.

Baseados na observação da presença de bactérias viáveis na dentina remanescente após remoção da camada infectada e adequada vedação da cavidade (Bjorndal et al.³, 1997; Duque et al.⁸, 2009), pesquisadores (Botelho⁴, 2003; Cheng et al.⁶, 2012; Deepalakshmi et al.⁷, 2010; Farret et al.⁸, 2011; Frencken et al.¹⁰, 2007, Hoszek, Ericson¹⁹, 2008; Ribeiro, Ericson³³, 1991; Sanders et al.³⁴, 2002; Takahashi et al.³³⁵, 2006; Türkün et al.³⁷, 2008; Tüzüner et al.³⁸, 2011) observaram sob condições in vitro que a adição de clorexidina (CHX) aos CIV apresentou efeito antibacteriano favorável contra microrganismos, como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Candida albicans* e *Actinomyces naeslundii*.

Para avaliar adequadamente esta propriedade, ten Cate³⁶ (2006) sugere o estudo de bactérias arranjadas em biofilmes, pois estas apresentam maior resistência à ação de agentes antibacterianos do que aquelas no estado planctônico. O biofilme dental é uma sequência ordenada de eventos que resultam em uma estrutura funcionalmente organizada e rica em espécies microbianas (Marsh²⁶, 2004).

O teste de difusão em ágar para estudar a atividade antibacteriana dos CIV modificados por CHX, utilizado na maioria dos trabalhos, consiste em um teste preliminar cujos resultados dependem diretamente de vários fatores, como número, tamanho e forma das partículas, carga elétrica e polaridade da substância a ser analisada (Heneine¹⁷, 2000).

O efeito dos CIV modificados por CHX no biofilme dentário também foi observado por Sanders et al.³⁴ (2002) e Cheng et al.⁶ (2012), porém sem referências à comparação entre diferentes compostos de CHX (gluconato ou diacetato), diferentes concentrações e efeito da CHX contra colonizadores iniciais do biofilme. Além disso,

há poucos relatos na literatura de possíveis alterações nas propriedades dos CIV modificados por CHX, como a rugosidade superficial, porosidade e outras propriedades físicas e mecânicas.

A adição de CHX ao CIV pode resultar em mudanças em sua microestrutura e em suas propriedades mecânicas, como resistência à compressão e tempo de presa (Palmer et al.³⁰, 2004). Fatores como a integridade da interface entre as partículas de vidro, o tamanho das partículas, bem como o número e o tamanho dos poros contidos no interior do material apresentam papel importante na determinação de suas propriedades mecânicas, como resistência à compressão, à flexão, à tração diametral, à fratura, ao desgaste e microdureza (Xie et al.⁴⁰, 2000).

A manutenção das propriedades físicas e antibacterianas de um material é importante para a durabilidade das restaurações dentárias. A rugosidade superficial representa grande importância no processo de retenção de microrganismos, formação do biofilme e conseqüentemente na longevidade das restaurações. Está relacionada à composição, tamanho das partículas de vidro e à porosidade do material restaurador (Lopes et al.²⁴, 2010), sendo a última prejudicial às propriedades físicas e mecânicas do material. (Hardin, Beckermann¹⁵, 2007). Sendo assim, o estudo da porosidade e rugosidade superficial de CIV modificado por CLX é importante para buscar a manutenção das propriedades mecânicas e durabilidade das restaurações.

Presença, adesão e desenvolvimento de microrganismos às estruturas dentais disponíveis e predispostas caracterizam a formação do biofilme dental, o qual é determinante no insucesso clínico. O *S. mutans* é um dos principais e mais abundante microrganismo cariogênico que contribui para a formação da matriz do biofilme dental, com capacidade de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos. (Banas, Vickerman², 2003; Bowen, Koo⁵, 2011; Gross et al.¹⁴, 2012; Lemos et al.²², 2005;

Quivey et al.³², 2001). O controle deste microrganismo por meio de materiais e técnicas clínicas efetivas, controle mecânico e químico, assim como a associação destes métodos é fundamental para a obtenção da saúde bucal.

Tanto o gluconato como o diacetato de CLX pode ser facilmente incorporado ao CIV, do qual subsequentemente são liberados na cavidade bucal (Palmer et al.³⁰, 2004). Aumentam o efeito antibacteriano do CIV, mas podem, dependendo da concentração utilizada, comprometer as propriedades mecânicas do material restaurador (Jedrychowski et al.²⁰, 1983). A utilização do diacetato ou gluconato de CLX associados ao CIV precisa ser avaliada e comparada, uma vez que a maioria dos achados na literatura refere-se a apenas um dos compostos.

Proposição

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do gluconato ou do diacetato de CLX em diferentes concentrações adicionados ao CIV Ketac Molar Easymix.

Objetivo Específicos:

Estudo 1:

Avaliar a porosidade e a rugosidade superficial do CIV Ketac Molar Easymix após adição de gluconato ou diacetato de CLX em diferentes concentrações.

Estudo 2:

Avaliar a atividade antibiofilme do CIV Ketac Molar Easymix após adição de gluconato ou diacetato de CLX em diferentes concentrações.

Incorporação de gluconato ou diacetato de clorexidina a um Cimento de Ionômero de Vidro: porosidade e rugosidade superficial.

Resumo

Introdução: Entre os agentes antibacterianos, a clorexidina (CLX) é considerada uma das substâncias mais eficazes e seguras e, adicionada ao cimento de ionômero de vidro (CIV) potencializa seu efeito antibacteriano, podendo, porém ocasionar mudanças nas propriedades físicas e mecânicas do material. **Objetivo:** Avaliar a porosidade e rugosidade superficial do CIV Ketac Molar Easymix (KM) após adição de gluconato ou diacetato de CLX. **Métodos:** Foram confeccionados 10 corpos de prova (n=10) com CIV para ambos os testes, e distribuídos aleatoriamente nos grupos: controle C; G1: CIV e gluconato de CHX 0.5%, G2: CIV e gluconato de CHX 1.0%, G3: CIV e gluconato de CHX 2.0%, D1: CIV e diacetato de CHX 0,5%, D2: CIV e diacetato de CHX 1,0% e D3: CIV e diacetato de CHX 2,0%. A rugosidade foi obtida por meio da média aritmética de três leituras realizadas na superfície de cada espécime e a porosidade, por meio de análise de fotomicrografias no programa Image J. Realizaram-se análises de variância de dois fatores e se necessário, teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%. **Resultados:** Observou-se aumento significativo da área ocupada pelos poros proporcional ao aumento de (p<0,001) concentração dos materiais (p=0,001). Em relação ao número de poros, houve efeito significativo da interação entre material e concentração (p=0,003), sendo que maior aumento foi encontrado para o gluconato de CLX. Não houve evidência de efeito significativo quanto aos materiais antibacterianos em qualquer uma das concentrações quando foi analisada a rugosidade superficial (p>0,05). **Conclusão:** Para associar a CLX ao CIV, a melhor opção é a utilização de gluconato de CLX a 1 e 2%, pois não interferiu na rugosidade superficial e apresentou número de poros e área ocupada pelos mesmos semelhantes ao CIV em sua forma original.

Palavras chave: cimentos de ionômeros de vidro, clorexidina, porosidade.

Introdução

A filosofia de mínima intervenção aplicada ao tratamento restaurador atraumático (TRA) promove a estabilização do processo da doença cárie, por meio da escavação seletiva de tecido acometido e preservação máxima dos tecidos saudáveis. De acordo com Holmgren et al.¹⁶ (2013) é uma abordagem confiável e eficaz no controle da lesão de cárie.

O material de escolha para o TRA é o cimento de ionômero de vidro (CIV) (Frencken, Leal¹⁰ 2010), o qual favorece a remineralização e reorganização dos tecidos dentários (Maltz et al.¹⁹, 2002). Tais propriedades são importantes diante da existência de microrganismos viáveis (Bjorndal et al.³, 1997; Bjorndal et al.⁴, 2000; Weerheijm et al.³³, 1999; Duque et al.⁷, 2009) após remoção do tecido infectado e vedação efetiva da cavidade com o material adequado. Takahashi et al.³⁰ (2006) relataram também que a utilização de um material antibacteriano associado ao CIV pode ser uma boa alternativa na busca da eliminação dos microrganismos viáveis sob restaurações.

Entre os diversos agentes antibacterianos utilizados no controle de microrganismos dentários, a clorexidina (CLX) é considerada uma das substâncias mais eficazes e seguras. (Emilson⁸, 1977, Jedrychowski et al.¹⁷, 1983).

Sabe-se, porém, que a adição de CLX ao CIV pode resultar em mudanças na microestrutura e propriedades mecânicas do material restaurador, como a resistência à compressão e tempo de presa (Palmer et al.²⁴, 2004). Fatores como a integridade da interface entre as partículas de vidro, o tamanho das partículas, bem como o número e tamanho dos poros contidos no interior do material desempenham papel importante na determinação de suas propriedades mecânicas (Xie et al.³⁴, 2000). Tanto o gluconato

como o diacetato de CLX pode ser facilmente incorporados ao CIV, do qual subsequentemente são liberados na cavidade bucal (Palmer et al.²⁴, 2004).

Desempenho clínico satisfatório é importante quando a CLX é adicionada ao CIV, a fim de que não haja alterações indesejáveis em suas propriedades físicas, mecânicas e microbiológicas (Sanders et al.²⁷, 2002; Palmer et al.²⁴, 2004; Takahashi et al.³⁰, 2006; Türkun et al.³², 2008).

A durabilidade das restaurações dentárias depende de sua resistência ao desgaste, da qualidade da interface dente/restauração, dureza e rugosidade superficial (Rios et al.²⁶, 2008; Heath, Wilson¹⁵, 1976). A última, está relacionada à composição, ao tamanho das partículas e à porosidade do material restaurador (Lopes et al.¹⁸, 2010) e representa grande importância na formação do biofilme, durabilidade e longevidade da restauração (Hardin, Beckermann¹⁴, 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a porosidade e a rugosidade superficial do CIV Ketac Molar Easymix após adição de gluconato ou diacetato de CLX em diferentes concentrações.

Materiais e Métodos

Foram adicionados gluconato de CLX (Sigma Aldrich, Steinheim, GE) ou diacetato de CLX (Sigma Aldrich, Steinheim, GE) ao CIV Ketac Molar Easymix (3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) (Tabela 1) em diferentes concentrações de acordo com a Tabela 2.

Tabela 1 - Materiais utilizados no estudo

Nome Comercial (Fabricante)	Classificação/ Indicação	Composição (porcentagem em peso)	Proporção Pó/Líquido	TPI*
Ketac Molar Easymix (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV convencional / restauração	Pó: pó de vidro (cristais de fluor-alumino-silicato) - 85%-95%; ácido poliacrílico - 5%-15%. Líquido: água - 55%-65%; ácido polietileno poliacrílico - 25%-35%; ácido tartárico - 5%-10%.	2,9:1	5 min
Gluconato de Clorexidina (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha)	Antibacteriano	Gluconato de clorexidina- Solução aquosa a 20%	líquido	-----
Diacetato de Clorexidina (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha)	Antibacteriano	Diacetato de clorexidina – 98%	pó	-----

*TPI: tempo de espera para presa inicial

Tabela 2 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tipo e concentração de CLX adicionada ao CIV.

GRUPO	MATERIAL	
C	CIV	
D1	CIV +	CLX-0.5%
D2		CLX -1%
D3		CLX -2%
G1		CLX -0.5 %
G2		CLX -1%
G3		CLX -2%

Para estabelecer a proporção pó-líquido em peso do CIV, foram realizadas 10 pesagens de uma porção de pó com auxílio da colher medida fornecida pelo fabricante, para obter-se a média aritmética. Para os grupos experimentais D1, D2 e D3, foram

acrescentados 0,5%, 1% ou 2% em peso de diacetato de CLX à porção do pó do CIV previamente pesada.

O mesmo procedimento foi realizado com o gluconato de CLX para obter-se a média aritmética entre as medidas, com auxílio do gotejador do próprio frasco. Os volumes finais de gluconato de CLX foram obtidos utilizando-se a proporção entre as massas e volumes ($m_1v_1=m_2v_2$) para os grupos G1, G2 e G3.

A CLX foi adicionada ao CIV durante sua manipulação, realizada por um único operador treinado, em ambiente com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Foram confeccionados 10 corpos de provas por grupo para cada teste realizado, por meio de uma matriz de silicone com dimensões de 3 mm de altura x 6 mm de diâmetro, preenchida com um único incremento de CIV com CLX de acordo com o grupo experimental (Tabela 2). Logo após, o material foi coberto com fita de poliéster e uma placa de vidro, sobre as quais um peso de 100 g foi depositado durante 40 segundos para acomodação e extravasamento do excesso do material.

Os corpos de prova foram armazenados em recipiente apropriado com umidade relativa do ar de aproximadamente 100% e em temperatura ambiente por 24 horas (Towler et al.³¹, 2001).

Para a avaliação da porosidade, os corpos de prova foram fraturados com auxílio de martelo e cinzel cirúrgicos. Os fragmentos foram revestidos com liga de ouro-paládio sob alto vácuo e levados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) (SM-300, Topcon, Tóquio, Japão) com 100 vezes de aumento, 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 foram subdivididas em quadrantes sendo sempre o mesmo quadrante analisado para padronização da área de

medidas (Coldebella et al.⁶, 2011; da Mata et al.²⁰, 2012). O mesmo pesquisador fez duas leituras de cada imagem com 1 semana de intervalo entre as mesmas.

A avaliação da rugosidade superficial foi realizada por meio de leitura de todos os espécimes, sendo os valores (Ra) obtidos da média aritmética entre os picos e vales registrados pelo rugosímetro (SURFCORDER SE 1700; Kosaka Laboratório Ltd, Kosaka, Japão). Foi utilizado um *cut-off* de 0,25 mm, necessário para maximizar a filtragem da ondulação superficial. Em cada superfície foram efetuadas três leituras em diferentes posições sempre passando pelo centro do espécime e a média aritmética calculada (Silva, Zuanon²⁹, 2006). A distância de deslocamento da ponta sobre o corpo de prova foi de 3 mm.

As avaliações da rugosidade, da área ocupada pelos poros, assim como do número de poros, foram realizadas por análises de variância de dois fatores: CLX (diacetato de gluconato) e suas concentrações (0.5, 1.0 e 2.0%). Esta análise incluiu também um grupo controle isolado. Quando necessário, empregou-se o teste de Tukey de comparações múltiplas de médias.

As condições de homogeneidade de variância e de normalidade dos resíduos dessas análises foram comprovadas, pelos testes de Levene e de Shapiro-Wilk, respectivamente. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão e construíram-se intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais.

Resultados

Na Tabela 3 são mostrados as médias e desvios padrão de percentual de área ocupada pelos poros e de número de poros, de acordo com o material antibacteriano e suas concentrações.

Tabela 3 – Material, concentração de CLX (%), média (desvio padrão) de percentual de área ocupada pelos poros e número de poros (desvio padrão), de acordo com o material antibacteriano e suas concentrações.

Material	Concentração (%)	% de área de poros		Número de poros	
Controle	-----	3,0 (0,8)	ab	51 (11)	c
Diacetato	0,5	4,4 (1,2)	c	41 (5)	bc
	1,0	5,0 (1,5)	cd	38 (5)	ab
	2,0	5,6 (1,3)	d	44 (11)	bc
Gluconato	0,5	2,1 (0,7)	a	30 (5)	a
	1,0	3,4 (1,4)	ab	43 (7)	bc
	2,0	3,8 (1,2)	b	45 (7)	bc

Nota: Médias na coluna acompanhadas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)

A análise de variância apontou efeito significativo dos materiais antibacterianos ($p < 0,001$) sobre a porcentagem de área ocupada pelos poros, assim como de concentrações desses materiais ($p = 0,001$), mas não da interação entre eles ($p = 0,705$). Assim, o diacetato produziu, em média, percentual de área ocupada pelos poros maior do que o gluconato, independentemente da concentração. O teste de Tukey demonstrou que com relação as concentrações de diacetato ou de gluconato, a concentração mais alta de 2% forneceu a média maior e a concentração mais baixa de 0,5% a média menor da área ocupada pelos poros no interior do material. A concentração de 1% apresentou média intermediária de área ocupada pelos poros e o controle apresentou médias não diferentes significativamente das médias do gluconato, mas menores do que aquelas apresentadas pelo diacetato.

Em relação ao número de poros, houve efeito significativo da interação entre material e concentração ($p = 0,003$). O teste de Tukey demonstrou que o diacetato na concentração de 1% e o gluconato a 0,5% apresentaram as menores médias em relação ao grupo controle.

Nas Figuras 1 e 2 estão representadas as médias de percentual de área de poros e de número de poros, respectivamente.

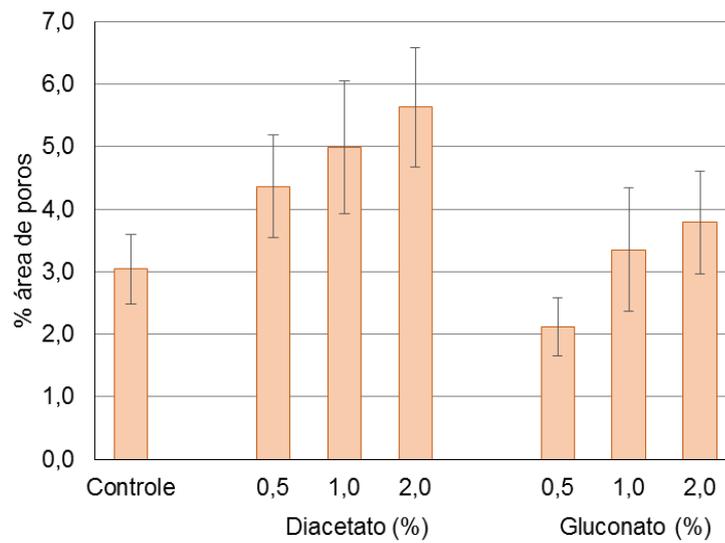


Figura 1 – Média e intervalo de confiança de 95% para a média populacional de percentual de área ocupada pelos poros

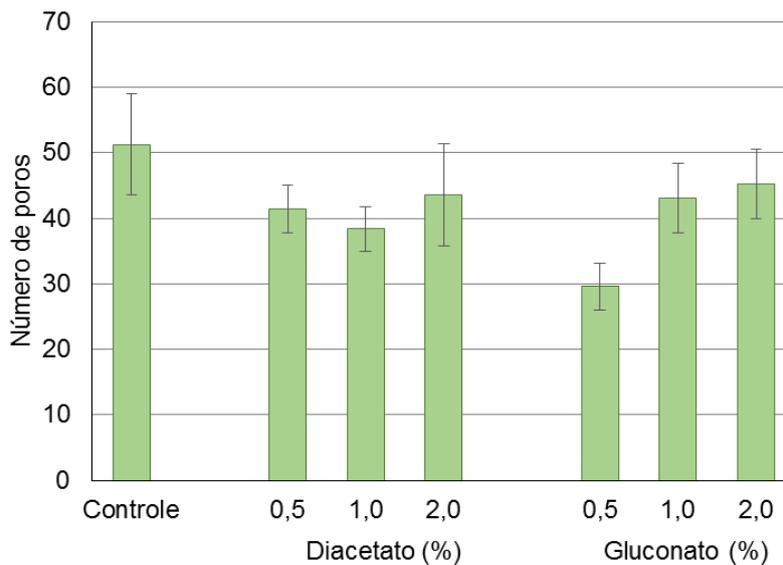


Figura 2 – Média e intervalo de confiança de 95% para a média populacional de número de poros

A análise de variância realizada para avaliar a rugosidade superficial não demonstrou evidência de efeito significativo quanto aos materiais antibacterianos em qualquer uma das concentrações, ou mesmo em relação ao controle ($p > 0,05$). Na Tabela 4 são mostradas as médias amostrais de rugosidade, além dos limites inferior e superior de um intervalo de confiança de 95% para as médias populacionais.

Tabela 4 – Material, concentração de CLX e média amostral (limites de um intervalo de confiança de 95%) para a média populacional de rugosidade (Ra).

Material	Concentração (%)	Média (IC 95%)*
Controle		2,05 (0,74; 5,26)
Diacetato	0,5	1,88 (0,69; 4,84)
	1,0	2,56 (0,92; 6,55)
	2,0	1,95 (0,86; 5,42)
Gluconato	0,5	1,99 (0,73; 5,13)
	1,0	2,35 (0,85; 6,04)
	2,0	1,83 (0,58; 4,51)

* Não houve evidência de diferença significativa entre médias pela ANOVA ($p > 0,05$)

Discussão

Estudos voltados para o entendimento das propriedades dos CIV realizaram testes físicos como os de rugosidade superficial e porosidade, os quais possuem relação direta entre si e representam grande importância no processo de formação de biofilme e na longevidade das restaurações (Lopes et al.¹⁸, 2010).

Os poros presentes nos materiais restauradores são pontos de propagação de trincas, responsáveis por falhas que diminuem a resistência do material (Geirsson et al.¹³, 2004; Nomoto, McCabe²², 2001) e reduzem a longevidade clínica das restaurações (Arcoria et al.¹, 1992; Nomoto, McCabe²², 2001). De acordo com Geirsson et al.¹³ (2004), os poros constituem regiões com alta concentração de estresse que aumentam a probabilidade de fratura do material e pode ser incorporado ao mesmo durante sua manipulação. Assim também acontece ao CIV, que quando espatulado manualmente incorpora bolhas com diâmetros maiores que àqueles encapsulados (Mitchell, Douglas²¹, 1997).

Neste estudo, após a adição de CLX ao CIV, pôde-se observar que a área ocupada pelos poros após a adição do diacetato de CLX (D1, D2 e D3) foi maior que aquela encontrada após adição do gluconato de CLX (G1, G2, e G3), independente da concentração estudada (Tabela 3). A concentração de 2% e 0.5%, tanto para o diacetato como para o gluconato de CLX, apresentaram a maior e menor média respectivamente. Da mesma maneira que de Castilho et al.⁵ (2013), Palmer et al.²⁴ (2004), Takahashi et al.³⁰ (2005) e Türkün et al.³² (2008) afirmaram que algumas propriedades do material foram alteradas em concentrações de CLX iguais ou superiores a 2%.

Ao considerar a adição de mais volume de líquido a um material restaurador, Jedrychowski et al.¹⁷ (1983) afirmaram que o gluconato de CLX tem potencial para provocar alterações nas propriedades físicas e mecânicas das restaurações.

O presente estudo demonstrou que ao comparar os grupos experimentais, o C apresentou maior número de poros, que ocuparam a menor área (Tabela 3, Figura 1 e 2). Os grupos G1, G2 e G3 apresentaram número e área ocupada pelos poros menores que nos grupos D1, D2 e D3. (Tabela 3 e Figuras 1 e 2). Deve-se considerar que quanto maior o número de poros em determinada área, menor diâmetro eles apresentam. Assim, a relação entre número de poros e área ocupada pelos mesmos nos grupos C, G2 e G3 sugere que estes apresentaram os menores tamanhos, o que favorece o sucesso clínico, uma vez que poros pequenos tornam a restauração menos suscetível a falhas ou alterações (Nomoto et al.²³, 2004).

Em D1, D2 e D3 pôde-se observar aumento tanto do número quanto da área ocupada pelos poros, sendo este proporcional ao aumento da concentração da CLX. Considerando que a área ocupada pelos poros em D1, D2 e D3 foi significativamente maior que em C e que o número de poros em D1 e D2 foi estatisticamente semelhante que em C, pode-se considerar que os poros contidos após a adição de diacetato de CLX

eram maiores e conseqüentemente representam prejuízos para o sucesso clínico. Preocupado com o tamanho dos poros no interior das restaurações, Balamuth² (1963), utilizou a aplicação de ultrassom, a qual promoveu o rompimento das bolhas de ar transformando-as em microbolhas ou micro poros, os quais podem migrar para a superfície da restauração, e com seu desgaste fisiológico desaparecerem.

Frencken et al.¹¹ (1998), em estudo longitudinal de acompanhamento de restaurações realizadas pela técnica do TRA, observaram que metade das restaurações apresentou falhas e que, muitas estavam relacionadas com as características físicas do CIV utilizado. Sabendo que a presença de porosidades no material, o torna mais friável (Fleming et al.⁹, 2006; Nomoto et al.²³, 2004) e que pode levar a falhas na restauração (Nomoto, McCabe²², 2001), este estudo indica que ao utilizar a CLX associada ao CIV, deve-se optar pelo gluconato.

Ainda, preocupando-se com a conservação e sucesso clínico das restaurações, a avaliação da rugosidade superficial de materiais restauradores, como o CIV, torna-se importante, uma vez que resulta em implicações clínicas, a partir de desgaste e alterações superficiais do material. O aumento da rugosidade superficial leva ao acúmulo de microrganismos, e conseqüente formação de biofilme com posterior deterioração do material (Lopes et al.¹⁸, 2010; Yip et al.³⁶, 2001).

A rugosidade superficial está relacionada à combinação de fatores que incluem as características da matriz, proporção e tamanho de partículas inorgânicas de vidro, a exposição destas partículas inorgânicas e à formação de bolhas de ar ou porosidades durante o preparo do material (Yip et al.³⁵, 1999; Rios et al.²⁵, 2002; Geiger et al.¹², 1999). O Ra é o parâmetro comumente utilizado para caracterizar a rugosidade de uma superfície, sendo o valor final resultado da média aritmética das medidas (Sidhu et al.²⁸, 1997).

Observou-se neste estudo que, quanto à rugosidade superficial, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Tabela 4, Figura 3). Assim, quando se avalia a associação da CLX ao CIV buscando a redução de microrganismos e formação de biofilme, a rugosidade superficial não representa interferência nas propriedades finais da restauração, pois além de não proporcionar alterações superficiais que propiciem o acúmulo de microrganismo, tem-se ainda o efeito da CLX como auxiliar do efeito antibacteriano do CIV. De acordo com Palmer et al.²⁴ (2004) o CIV tem potencial para liberação lenta de espécies ativas, como o flúor (Frencken et al.¹¹, 1998) e a CLX incorporada ao mesmo.

Embora a literatura apresente resultados sobre propriedades como resistência a compressão, tração diametral, flexão, fratura, tempo de presa, desgaste e microdureza (Jedrychowski et al.¹⁷, 1983; Palmer et al.²⁴, 2004; Xie et al.³⁴, 2000) do CIV quando associado a CLX em diferentes concentrações, poucos relatos são encontrados sobre as propriedades físicas como porosidade e rugosidade superficial, assim como a comparação entre as diferentes formas físicas da CLX.

Conclusão

Quando da associação de gluconato ou diacetato de CLX em diferentes concentrações ao CIV avaliado neste estudo, a melhor opção é a utilização de gluconato de CLX a 1% ou 2%, pois não interferiu na rugosidade superficial e apresentou número de poros e área ocupada pelos mesmos semelhantes ao CIV em sua forma original.

Referências*

1. 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.
2. Balamuth L. Ultrasonics and dentistry. *Sound.* 1963; 2:15-9.
3. 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.
4. 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.
5. de Castilho AR, Duque C, Negrini TdeC, Sacono NT, de Paula AB, Sacramento PA, et al. Mechanical and biological characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(2): 131-8.
6. 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.
7. 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.
8. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res.* 1977; 85(4): 255-65.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

9. Fleming GJ, Kenny SM, Barralet JE. The optimisation of the initial viscosity of an encapsulated glass-ionomer restorative following different mechanical mixing regimes. *J Dent.* 2006; 34(2):155–63.
10. Frencken JE, Leal SC. The correct use of the ART approach. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(1): 1-4.
11. Frencken JE, Makoni F, Sithole WD. ART restorations and glass ionomer sealants in Zimbabwe: Survival after 3 years. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 1998; 26(6): 372–81.
12. Geiger S, Ravchanukayev M, Liberman R. Surface roughness evaluation of resin modified glass ionomers polished utilizing poly (acrylic acid) gel. *J Oral Rehabil.* 1999; 26(9): 704-09.
13. 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
14. Hardin RA, Beckermann C. Effect of porosity on the stiffness of cast steel. *Acta Biomater.* 2007; 38(12): 2992–3006.
15. Heath JR e Wilson HJ. Abrasion of restorative materials by toothpaste. *J Oral Rehabil.* 1976; 3(2): 121-38.
16. Holmgren CJ, Roux D, Doméjean S. Minimal intervention dentistry: part 5. Atraumatic restorative treatment (ART)- a minimum intervention and minimally invasive approach for the management of dental caries. *Br Dent J.* 2013; 214(1): 11-8.
17. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983; 10(5): 373- 81.

18. Lopes JHP, Guimarães MS, Coldebella CR, Zuanon ACC. Avaliação da aplicação de ondas de ultra-som sobre cimentos de ionômero de vidro: rugosidade superficial e dureza. *Rev Odontol Bras Central*. 2010; 18(48): 42-7.
19. 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.
20. Da Mata M, Santos-Pinto L, Zuanon ACC. *Microsc Res Tech*. 2012; 75(5): 667–70.
21. Mitchell CA, Douglas WH. Comparison of the porosity of handmixed and capsulated glass-ionomer luting cements. *Biomaterials*. 1997; 18(16): 1127–31.
22. Nomoto R, McCabe JF. Effect of mixing methods on the compressive strength of glass ionomer cements. *J Dent*. 2001; 29(3): 205–10.
23. Nomoto R, Komoriyama M, McCabe JF, Hirano S. Effect of mixing method on the porosity of encapsulated glass ionomer cement. *Dent Mater*. 2004; 20(10): 972–8.
24. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials*. 2004; 25(23): 5423-31.
25. Rios D, Honório HM, Araújo PA, Machado MAA. Wear and superficial roughness of glass ionomer cements used as sealants, after simulated toothbrushing.. *Pesqui Odontol Bras*. 2002; 16(4): 343-8.
26. Rios D, Honório HM, Francisoni LF, Magalhães AC, Machado MAAM e Buzalaf MAR. In situ effect of an erosive challenge on different restorative materials and on enamel adjacent to these materials. *J Dent*. 2008; 36(2): 152-7.

27. 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.
28. Sidhu SK, Sheriff M, Watson TF. In vivo changes in roughness of resin-modified glass ionomer materials. *Dent Mater* 1997; 13(3): 208-13.
29. Silva RC, Zuanon ACC. Surface roughness of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment (ART). *Braz Dent J.* 2006; 17(2): 106-9.
30. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater.* 2006; 22(7): 647–52.
31. Towler MR, Bushby AJ, Billington RW, Hill RG. A preliminary comparison of the mechanical properties of chemically cures and ultrasonically cures glass ionômero cements, using nano-indentation techniques. *Biomaterials.* 2001; 22(11): 1401-6.
32. 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.
33. 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.
34. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16(2): 129-38.
35. Yip HK, Lam WTC, Smales RJ. Fluoride release, weight loss and erosive of modern aesthetic restoratives. *Br Dent J* 1999; 187(5): 265-70.

36. Yip HK, Peng D, Smales RJ. Effects of APF gel on the physical structure of compomers and glass ionomer cements. *Oper Dent.* 2001; 26(3): 231-8.

Atividade antibiofilme de um
Cimento de Ionômero de Vidro
modificado por gluconato ou
diacetato de clorexidina



Resumo

Introdução: A atividade antibacteriana do cimento de ionômero de vidro (CIV) pode ser potencializada pela adição da clorexidina (CLX). **Objetivo:** Avaliar a atividade antibiofilme do CIV Ketac Molar Easymix (KM) após adição de 1% de gluconato ou diacetato de CLX e após diferentes períodos de tempo. **Métodos:** Utilizaram-se 10 corpos de prova com CIV por grupo:

C1 - CIV (1 dia); C2 - CIV (7 dias), C3- CIV (14 dias), C4 - CIV (21 dias); grupo D1: CIV+CLX (1 dia), D2 - CIV+CLX (7 dias), D3: CIV+CLX (14 dias), D4: CIV+CLX (21 dias); G1- CIV+ CLX (1 dia), G2- CIV+ CLX (7 dias), G3- CIV+ CLX (14 dias) e G4- CIV+ CLX (21 dias) e cepas de *S. mutans* ATCC 25175. Um inóculo fresco foi preparado em caldo BHI diluindo-se 10 vezes uma suspensão incubada *overnight*. Para crescimento dos biofilmes, os espécimes foram posicionados verticalmente em placas de 24 poços, contendo 1,5 mL do inóculo e 0,2% de sacarose. O meio de cultura foi renovado a cada 24 h. Após crescimento por 1, 7, 14 e 21 dias, os biofilmes foram re-suspensos em solução salina. A suspensão foi diluída e semeada em ágar BHI, para a quantificação de bactérias presentes. Utilizou-se análise de variância de dois fatores: material e tempo, complementada pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos em ufc/mL. Adotou-se o nível de significância de 5%. **Resultados:** A análise de variância apontou efeito significativo dos fatores material ($p=0,006$) e tempo ($p<0,001$), mas não da interação entre eles ($p=0,732$). Desse modo, considerando a média global, não houve diferenças estatisticamente significantes na concentração de *S. mutans* entre o grupo controle e o gluconato. Entretanto, observou-se que o diacetato diminuiu significativamente a concentração de *S. mutans*, independente do tempo. A redução total em todo o período foi cerca de 90% nas médias de contagens em ufc/mL. **Conclusão:** Quando da associação de CLX a 1% ao CIV avaliado neste estudo, a melhor opção é a

utilização de diacetato de CLX, pois apresentou maior eficácia da atividade anti-biofilme, ao longo dos dias analisados.

Palavras chave: cimentos de ionômeros de vidro, clorexidina, biofilme.

Introdução

Preconizado por Frencken, Leal¹⁶ (2010), o tratamento restaurador atraumático, (TRA) considerado importante opção de intervenção para populações vulneráveis, conta com o potencial reparador da dentina afetada, por meio da redução de microrganismos e do metabolismo bacteriano (Maltz et al.²², 2002, Schriks e Amerongen et al.³², 2003). Para isso, preconiza-se o uso do cimento de ionômero de vidro (CIV), que favorece esta condição e a reorganização dos tecidos dentários (Frencken e Leal.¹⁶, 2010). Sabe-se que a atividade antibacteriana do CIV sobre microrganismos cariogênicos pode ser potencializada por meio da adição de um agente antibacteriano a esse material restaurador, contribuindo para redução ou eliminação de bactérias persistentes após a remoção parcial do tecido cariado e para a prevenção da ocorrência de cáries secundárias (Frencken, et al.¹⁵, 2007; Hoszek e Ericson¹⁹, 2008; Ribeiro e Ericson²⁹, 1991; Sanders et al.³¹, 2002; Türkün et al.³⁸, 2008).

Uma grande variedade de substâncias antibacterianas como o metronidazol, ciprofloxacina, cefaclor e cetrimida tem sido estudada. (Pinheiro et al.²⁶, 2005; Tüzüner et al.³⁹, 2011). Dentre essas substâncias, destaca-se a clorexidina (CLX), pela sua comprovada eficácia contra amplo espectro de patógenos da cavidade oral (Emilson¹², 1977; Jedrychowshi²⁰, 1983) e pela baixa toxicidade (Pucher, Daniel²⁸, 1992).

Diversos estudos demonstraram a atividade antibacteriana de CIV modificados por CLX (Botelho⁴, 2003, Cheng et al.⁸, 2012, Deepalakshmi et al.⁹, 2010, Farret et

al.¹⁴, 2011, Frencken et al.¹⁵, 2007, Hoszek, Ericson¹⁹ 2008, Ribeiro, Ericson²⁹, 1991, Sanders et al.³¹, 2002, Takahashi et al.³⁵, 2006, Türkün et al.³⁸, 2008, Tüzüner et al.³⁹, 2011), entretanto, a maioria desses trabalhos utilizou o teste de difusão em ágar, que é empregado somente em avaliações preliminares e cujos resultados dependem diretamente de vários fatores, como número, tamanho e forma das partículas, carga elétrica e polaridade da substância (Heneine¹⁷, 2000).

O modelo ideal para estudo da atividade antibacteriana contra patógenos da cavidade bucal é utilizando os microrganismos organizados em biofilmes, pois as bactérias nesse tipo de arranjo apresentam maior resistência à ação de agentes antibacterianos do que aquelas em suspensão e representam melhor as condições encontradas na cavidade bucal (ten Cate³⁶, 2006). Apesar do grande número de trabalhos disponíveis sobre a atividade antimicrobiana dos CIV modificados por CLX, há somente dois estudos no qual esse material foi avaliado por meio do crescimento de biofilme (Sanders et al.³¹, 2002 e Cheng et al.⁸, 2012). Entretanto, esses autores não realizaram comparações entre diferentes os compostos de CLX (gluconato ou diacetato).

Considerando a busca de um material restaurador com atividade antibacteriana suficiente para prevenir o aparecimento de lesões de cárie secundária, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibiofilme do CIV Ketac Molar Easymix após adição de 1% de gluconato ou diacetato de CLX após diferentes períodos de tempo.

Materiais e métodos

Foram adicionados gluconato de clorexidina (Sigma Aldrich, Steinheim, GE) ou diacetato de clorexidina (Sigma Aldrich, Steinheim,GE) ao CIV Ketac Molar Easymix

(3M-ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) (Tabela 1). Os grupos foram divididos de acordo com o tratamento (n=10) e tempo de observação: grupo C1 - CIV (1 dia); C2 - CIV (7 dias), C3- CIV (14 dias), C4 - CIV (21 dias); grupo D1: CIV+CLX (1 dia), D2 - CIV+CLX (7 dias), D3: CIV+CLX (14 dias), D4: CIV+CLX (21 dias); G1- CIV+CLX (1 dia), G2- CIV+ CLX (7 dias), G3- CIV+ CLX (14 dias) e G4- CIV+ CLX (21 dias) (tabela 2).

Tabela 1 - Materiais utilizados no estudo

Nome Comercial (Fabricante)	Classificação/Indicação	Composição (porcentagem em peso)	Proporção o Pó/Líquido o	TPI*
Ketac Molar Easymix (3M -ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA)	CIV convencional / restauração	Pó: pó de vidro (cristais de fluor-alumino-silicato) - 85%-95%; ácido poliacrílico - 5%-15%. Líquido: água - 55%-65%; ácido polietileno policarbonico - 25%-35%; ácido tartárico - 5%-10%.	2,9:1	5 min
Gluconato de Clorexidina (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha)	Antibacteriano	Gluconato de clorexidina- Solução aquosa a 20%	líquido	-----
Diacetato de Clorexidina (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha)	Antibacteriano	Diacetato de clorexidina – 98%	pó	-----

****TPI: tempo de espera para presa inicial**

Tabela 2 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tipo e concentração de CLX adicionada ao CIV.

Grupos	Materiais	Período (dias)
C1	CIV	1
C2		7
C3		14
C4		21
D1	CIV	1
D2	+	7
D3	Diacetato	14
D4	De CLX	21
G1	CIV	1
G2	+	7
G3	Gluconato	14
G4	De CLX	21

Para estabelecer a proporção pó-líquido em peso do CIV, foram realizadas 10 pesagens de uma porção de pó com auxílio da colher medida fornecida pelo fabricante. A média aritmética foi obtida e 1% em peso de diacetato de CLX foi adicionado à porção do pó do CIV previamente pesada, sendo retirada a mesma massa do pó de CIV. O mesmo procedimento foi realizado com o gluconato de CLX para obter-se a média aritmética entre as medidas do líquido do CIV, com auxílio do gotejador do próprio frasco. O volume final de gluconato de CLX adicionado ao líquido do CIV foi calculado utilizando-se as regras de proporção entre as massas e volumes ($m_1v_1=m_2v_2$) para atingir uma concentração final de 1%. A CLX foi adicionada ao CIV durante sua manipulação, realizada por um único operador treinado, em ambiente com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os corpos de prova foram esterilizados por radiação gama cobalto 60 (25 Kgy/6 h) (Rodrigues et al.³⁰, 2004).

Foram confeccionados 10 corpos de provas por grupo para cada teste realizado, por meio de uma matriz de silicone com dimensões 3 mm de altura x 6 mm de diâmetro, preenchida com um único incremento de CIV com adição de CLX de acordo com o grupo experimental (Tabela 2). Logo após, o material foi coberto com fita de poliéster e

uma placa de vidro, sobre as quais um peso de 100 g foi depositado durante 40 segundos para acomodação e extravasamento do excesso do material. Os corpos de prova foram armazenados em recipiente apropriado com umidade relativa do ar de 100% e em temperatura ambiente por 24 horas (Towler et al.³⁷, 2001).

Para produzir biofilmes monoespécie, foi utilizada uma cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35688, relacionada com o estabelecimento ou progressão da lesão de cárie. A cepa foi mantida a -80°C em glicerina e reativadas 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 caldo infuso de cérebro e coração (BHI) suplementado com 0,2% de sacarose (caldo BHIS) (Exterkate et al.¹³, 2010). Todas as incubações foram realizadas a 37°C em microaerofilia.

Para crescimento dos biofilmes, foi utilizado um modelo recentemente desenvolvido por Exterkate et al.¹³, (2010), com adaptações. Esse modelo permite que os corpos de prova sejam fixados verticalmente e possui a vantagem de favorecer a formação de um biofilme somente com células capazes de aderir aos espécimes, evitando a deposição dos microrganismos pela força da gravidade e a posterior aderência dos mesmos.

Os corpos de prova foram imersos em poços de placas de 24 poços, contendo 1,5 mL do inóculo preparado de acordo com o descrito anteriormente. O meio de cultura foi renovado a cada 24h.

A análise do biofilme foi realizada após crescimento por 1, 7, 14 e 21 dias (Cheng et al.⁸, 2012; Sanders et al.³¹, 2002). Os corpos de prova foram removidos do dispositivo e re-suspensos em 2 mL de solução salina 0,9%, com auxílio de um disruptor de células (Sonicador Vibra Cell, Unique; 500 W, amplitude 20%, 6 pulsos de

5 segundos cada) (Bowen et al.⁵, 1986, com modificações). 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 cego. Os resultados foram expressos em ufc/mL.

Para a para a avaliação de contagem de microrganismos, em ufc/mL, utilizou-se análise de variância de dois fatores: material (controle, gluconato e diacetato de CLX) e tempo. O teste de Tukey foi aplicado para a comparação de médias de materiais e de médias de tempo, separadamente, ao nível de significância de 5%. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão.

Resultados

Na Tabela 3 são apresentadas as médias e desvios padrão de logaritmos decimais de ufc/mL, de acordo com os materiais e o tempo.

Tabela 3 - Médias e desvios padrão de logaritmos de ufc/mL

	Grupos				Global
	C1	C2	C3	C4	
Média	8,16	7,63	7,71	7,28	7,69 ^b
DP	0,21	0,59	0,38	0,16	
	G1	G2	G3	G4	
Média	8,10	7,52	7,58	7,08	7,57 ^b
DP	0,49	0,43	0,24	0,26	
	D1	D2	D3	D4	
Média	7,76	7,31	7,42	7,18	7,42 ^a
DP	0,46	0,41	0,12	0,17	
	8,01 ^c	7,49 ^b	7,57 ^b	7,18 ^a	

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

A análise de variância apontou efeito significativo dos fatores material ($p=0,006$) e tempo ($p<0,001$), mas não da interação entre eles ($p=0,732$), o que indica independência entre os fatores quanto às contagens de microrganismos. (Tabela 3).

Observa-se que a média global de logaritmo de ufc/mL do gluconato foi equivalente à média do controle, sendo as duas significativamente maiores do que a média de ufc/mL do diacetato, independentemente do tempo. Observou-se também que após 1 dia a média global de ufc/mL foi a maior de todas e diminuiu com equivalência entre as médias de 7 e 14 dias e, no final, após 21 dias, tornou-se menor ainda. A redução total em todo o período foi de cerca de 10% em unidades de logaritmos, o que corresponde a uma redução de aproximadamente 90% nas médias de contagens em ufc/mL (10^8 para 10^7).

Discussão

Sabe-se que quando da utilização da técnica do TRA, a dentina afetada permanece sob a restauração, e contém microrganismos viáveis por meses ou até anos (Bjorndal, Larsen³, 2000; Duque et al.¹¹, 2009; Pinto et al.²⁷, 2006; Weerheijm et al.⁴¹, 1999), apresentando risco para o desenvolvimento de cáries recorrentes. Assim, diferentes abordagens tem sido descritas na literatura, como a técnica de adição de CLX ao CIV para potencializar seu efeito antibacteriano (Sanders et al.³¹, 2002; Takahashi et al.³⁵, 2006; Türkün et al.³⁸, 2008). A CLX pode ser liberada na cavidade bucal (Palmer et al.²⁵, 2004) e agir sobre o biofilme, o qual passa a apresentar composição menos patogênica em comparação ao biofilme acidogênico com predominância de *S. mutans*, que seria formado sem a presença deste agente antibacteriano (van Houte⁴⁰, 1994).

Assim como a superfície dental, os materiais restauradores estão sujeitos à aderência de

microrganismos (Marsh²³, 2006), a qual dá origem a uma estrutura tridimensional complexa denominada biofilme dental (Hojo et al.¹⁸, 2009), fundamental na instalação e progressão da doença cárie. Neste estudo, o efeito antibacteriano foi avaliado por meio de biofilme dental, pois as bactérias nesse tipo de arranjo apresentam maior resistência à ação de agentes antibacterianos do que aquelas em suspensão, e representam melhor as condições encontradas na cavidade bucal (ten Cate³⁶, 2006).

O presente estudo demonstrou, que comparado ao grupo controle, o grupo D1 apresentou redução de microrganismo já no primeiro dia de experimento. A partir da segunda semana diminuição na concentração de microrganismos pode ser observada para todos os grupos, sendo que a maior redução foi observada após 21 dias (Tabela 3). Estudos de Cheng et al.⁸. (2012) e Palmer et al.²⁵. (2004), também demonstraram liberação de CLX elevada na primeira semana do estudo e estabilização nas duas semanas subsequentes. Du et al.¹⁰. (2012), demonstraram maior liberação de diacetato de CLX durante a reação de presa do CIV, ou seja, nas primeiras 24 horas após a manipulação do material. No presente estudo, após 1 dia de crescimento do biofilme, a concentração de microrganismos nos grupos com gluconato de CLX foi semelhante ao grupo controle (Tabela 3). Deve-se considerar que não foi possível iniciar o experimento imediatamente após a confecção do corpo de prova, pois foi necessário fixá-los nos dispositivos e enviá-los para esterilização por radiação.

Observou-se também atividade antimicrobiana do CIV sem adição de CLX, sendo este fato atribuído à liberação de flúor pelo CIV (Sidhu, Schmalz³⁴, 2001). Entretanto, sabe-se que somente a liberação de flúor não seria capaz de atingir a atividade antimicrobiana observada (Al-Naimi et al.¹, 2008). Outros mecanismos de ação, como a acidez do material (Palenik et al.²⁴, 1992).

O posicionamento vertical dos espécimes (Exterkate et al.¹³, 2010) permitiu a formação de um biofilme apenas por células capazes de aderir ao corpo de prova, excluindo aquelas que poderiam se depositar sobre o mesmo, caso este se encontrasse no fundo do poço da placa. Desse modo, procurou-se mimetizar as condições de desenvolvimento do biofilme encontradas na cavidade bucal. Biofilmes maduros (a partir de 14 dias de desenvolvimento), como os estudados no presente estudo, representam maior relevância clínica, já que estes ocorrem em locais de estagnação e de higienização deficiente, propícios ao desenvolvimento da doença cárie.

Resultados de estudos de Cheng et al.⁸. (2012); Sanders et al.³¹. (2002) demonstraram redução maior na concentração de bactérias do que aquela observada no presente estudo. Porém a adição desse material antibacteriano foi realizada a um CIV modificado por resina que possui características diferentes do CIV de alta viscosidade (Sidhu, Schmalz³⁴, 2001; Chan et al.⁷, 2006) e a concentração de CLX utilizada foi maior (10%) (Cheng et al.⁸, 2012), assim como aquela utilizada por Sanders et al.³¹. (2002) que foi de 5%. Deve-se considerar também que o CIV modificado por resina não possui zinco em sua composição como o CIV de alta viscosidade utilizado no presente estudo. Dessa forma, a redução na contagem de *S. mutans* no grupo C após 21 dias de crescimento de biofilme pode ser justificada pela presença de zinco e pela associação do zinco e do flúor liberados por esse material (Sidhu e Schmalz³⁴, 2001).

Sabe-se que a adição de CLX acima de 2% altera importantes propriedades físicas e mecânicas dos materiais restauradores como resistência à compressão, tempo de presa, resistência de união à dentina e dureza (de Catilho et al.⁶, 2013; Palmer et al.²⁵, 2004; Takahashi et al.³⁵, 2005; Türkün et al.³⁸, 2008).

Türkün et al.³⁸. (2008) também compararam a adição de diferentes sais de CLX ao CIV. Apesar dos autores também terem encontrado maior atividade antimicrobiana

do sal diacetato, essa avaliação foi realizada através do teste em ágar e não por atividade antibiofilme. Desse modo, o presente trabalho fornece dados importantes que podem auxiliar a indústria odontológica na escolha do sal de CLX mais eficaz para se obter melhor atividade antimicrobiana.

O gluconato de CLX é normalmente encontrado a 20% já que nessa concentração apresenta ampla solubilidade e boa viscosidade. O diacetato é uma ótima opção se o objetivo é obter uma solução alcoólica de baixo teor de água. Ambos os sais podem ser usados, porém não são indicados para soluções aquosas em concentrações maiores que 2%. O gluconato é mais utilizado por motivos de economia e conveniência (Senior³³, 1973). No presente estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na atividade antimicrobiana contra *S. mutans* do gluconato de CLX quando comparado ao grupo C. Por outro lado, o sal diacetato demonstrou significativa redução na contagem desses microrganismos, apontando atividade antimicrobiana mais promissora e necessidade de estudos futuros utilizando outros protocolos. Uma estratégia interessante seria a incorporação de nanopartículas desse sal ao CIV, que possibilitaria um aumento da concentração de CLX diminuindo o risco de afetar suas propriedades físico-mecânicas.

Frencken et al¹⁵. (2007), avaliaram a atividade antibacteriana de um CIV com diacetato de CLX a 1% e observaram que após 7 dias houve redução significativa de *Streptococcus mutans* presentes nas restaurações.

Este estudo mostrou que o a adição de diacetato de CLX ao CIV proporcionou redução de 10^8 para 10^7 ufc/ml na concentração de *S. mutans* (Tabela 3), o que equivale à diminuição de 90% na concentração de bactérias no biofilme. De acordo com Köhler, Bratthall²¹, (1992), apenas pacientes com menos de 10^6 ufc/ml de *S. mutans* podem ser considerados de baixo risco ao desenvolvimento da doença cárie. A redução do biofilme

maduro, mesmo que sendo somente em uma ordem de magnitude, pode ser importante para a prevenção de cárie secundária (Exterkate et al.¹³, 2010).

Até o momento, não há estudos científicos que estabeleçam correlação definitiva entre a redução na concentração de bactérias do biofilme formado *in vitro* e a eficácia do material *in vivo*. De acordo com Azevedo et al.². (2011) o fator mais importante para a desmineralização do esmalte dental é a presença de sacarose e não a atividade ou o risco de cárie do indivíduo.

Conclusão

Quando da associação de CLX a 1% ao CIV avaliado neste estudo, a melhor opção é a utilização de diacetato de CLX, pois apresentou maior eficácia da atividade antibiofilme, ao longo dos dias analisados.

Referências *

1. Al-Naimi OT, Itota T, Hobson RS, McCabe JF. Fluoride release for restorative materials and its effect on biofilm formation in natural saliva. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(3): 1243-8.
2. Azevedo MS, van de Sande FH, Romano AR, Cenci MS. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries Res.* 2011; 45(6): 510-7
3. 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.

4. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res.* 2003; 37(2): 108–14.
5. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1): 69–86.
6. de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, Sacramento PA, et al. Puppin-Rontani RM. Mechanical and biological characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(2): 131-8.
7. Chan WD, Yang L, Wan W, Rizkalla AS. Fluoride release from dental cements and composites: a mechanistic study. *Dent Mater.* 2006; 22: 366-73.
8. 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): 573–583.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res.* 1977; 85(4): 255–65.
13. 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.
14. Farret MM, 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.
15. 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.
16. Frencken JE, Leal SC. The correct use of the ART approach. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(1): 1-4.
17. Heneine IF. *Biofísica básica.* São Paulo: Atheneu; 2000.
18. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88(11): 982-90.
19. 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.
20. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983; 10(5): 373- 81.
21. Köhler B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *J Clin Microbiol.* 1979; 9(5): 584-8.

22. 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.
23. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004; 38(3): 204-11.
24. 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
25. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004; 25(23): 5423-31.
26. Pinheiro SL, Simionato MR, Imparato JC, Oda M. Antibacterial activity of glass-ionomer cement containing antibiotics on caries lesion microorganisms. *Am J Dent.* 2005; 18(4): 261-6.
27. Pinto AS, Araújo FB, Franzon R, Figueiredo MC, Henz S, Garcia-Godoy F. Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *Am J Dent.* 2006; 19(6): 382-7.
28. Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1992; 63(6): 526-32.
29. Ribeiro J, Ericson D. In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res.* 1999(6); 99: 533- 40.
30. Rodrigues LK, Cury JA, Nobre dos Santos M. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization in vitro. *J Oral Sci.* 2004; 46(4): 215- 20.
31. 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.

32. Schriks MCM, van Amerongen WE. Atraumatic perspective of ART: psychological and physiological aspects of treatment with and without rotary instruments. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003; 31(1): 15-20.
33. Senior N. Some observations on the formulation and properties of chlorhexidine. *J. Soc. Cosmet Chem.* 1973; 24: 259-78.
34. 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
35. 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.
36. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.* 2006; 94(1): 1-9.
37. Towler MR, Bushby AJ, Billington RW, Hill RG. A preliminary comparison of the mechanical properties of chemically cures and ultrasonically cures glass ionômero cements, using nano-indentation techniques. *Biomaterials.* 2001; 22(11): 1401-6.
38. Türkun LS, Turkun M, Ertugrul F, Ates M, Brugger S. Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent.* 2008; 20(1): 29-44.
39. 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.

40. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; 73(3): 672-81.
41. 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.

Considerações Finais

Considerações Finais

A adição da CLX ao CIV tem como objetivo melhorar as propriedades antibacterianas do material restaurador. Estudos (Palmer et al.³⁰, 2004; Takahashi et al.³⁵, 2006; Sanders et al.³⁴, 2002; Türkün et al.³⁷, 2008) demonstram porém, que esta associação pode causar também alterações em suas propriedades físicas e mecânicas.

A porosidade do CIV KM Easy Mix, propriedade física importante de um material restaurador, sofreu neste estudo, alterações após a adição de CLX. Pôde-se observar que o gluconato de CLX a 1 é o mais indicado, pois apresentou número e área ocupada pelos poros semelhante ao grupo controle. A rugosidade superficial não foi alterada após a adição de diacetato ou gluconato de CLX. Para o teste de atividade antibiofilme o diacetato de CLX apresentou maior efetividade antibacteriana.

Ao adicionar um agente antibacteriano como o diacetato ou gluconato de CLX a 1% ao CIV KM Easy Mix buscando potencialização da atividade antibiofilme muitos fatores devemos considerar. Embora o diacetato de CLX tenha apresentado diminuição significativa de microrganismos, ainda manteve o paciente em situação de alto risco para o desenvolvimento da doença cárie (Köhler, Bratthal²¹, 1979). Além disso, em todas as concentrações estudadas para o teste de porosidade pode-se observar que resultou em menor número de poros que ocuparam maior área, principalmente na concentração de 1%. De acordo com Geirsson et al.¹³. (2004) e Nomoto, McCabe²⁹ (2001) a presença de poros maiores representam maior risco para o sucesso clínico das restaurações, pois representam pontos de propagação de trincas, responsáveis por falhas que diminuem a resistência do material e reduzem a longevidade clínica das restaurações (Arcoria et al.¹, 1992).

Acreditamos que estudos utilizando colonizadores iniciais e biofilmes polimicrobianos devem ser realizadas para esclarecer a eficácia da adição de CLX ao

CIV na atividade anti- biofilme, assim como estudos com materiais antibacterianos, a fim de promover sucesso clínico com longevidade e qualidade das restaurações.

A determinação do significado clínico da redução de ufc/mL em determinado período de tempo também deve ser considerado para que resultados laboratoriais possam ser transportados para o dia-a-dia do profissional.

Quando da busca de melhor efeito antibacteriano do CIV KM, não se deve optar pela adição de diacetato ou gluconato CLX nas concentrações estudadas, pois o gluconato de CLX demonstrou que as propriedades físicas estudadas mantiveram-se semelhantes ao grupo C, assim como a atividade antibacteriana. Com adição de diacetato de CLX observou-se diminuição significativa de microrganismo, sem porém tirar o paciente da condição de alto risco, além de proporcionar menor número de poros que ocuparam maior área, indicando a formação de poros maiores e prováveis prejuízos para o sucesso clínico das restaurações.

Referências *

1. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(2): 89–99.
2. 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.
3. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res.* 2003; 37(2): 108–14.
4. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1): 69–86.
5. Cheng L, Weir MD, Xu HHK, Kraigsleyf AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial and physical properties of calcium–phosphate and calcium–fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dental materials.* 2012; 28(5): 573–83.
6. 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.
7. 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.
8. Farret MM, 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.
9. 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.

10. Frencken JE, Leal SC. The correct use of the ART approach. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18(1): 1-4.
11. Frencken JE, van't Hof MA, van Amerongen WE, Holmgren CJ. Effectiveness of single surface ART restorations in the permanent dentition: a meta-analysis. *J Dent Res.* 2004; 83(2): 120-3.
12. 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.
13. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich, SR, Firestone, ND, Schwartzbaum, JA, Janies DA, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(11): 4121–8.
14. Hardin RA, Beckermann C. Effect of porosity on the stiffness of cast steel. *Acta Biomater.* 2007; 38(12): 2992–3006.
15. 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.
16. Heneine IF. *Biofísica básica.* São Paulo: Atheneu; 2000.
17. Holmgren CJ, Roux D, Doméjean S. Minimal intervention dentistry: part 5. Atraumatic restorative treatment (ART)--a minimum intervention and minimally invasive approach for the management of dental caries. *Br Dent J.* 2013; 214(1): 11-8.
18. 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.

19. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983; 10(5): 373- 81.
20. Köhler B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *J Clin Microbiol.* 1979; 9(5): 584-8.
21. Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005; 7(1): 95–107.
22. Lima DC, Saliba NA, Moimaz SAS. Atraumatic restorative treatment and its use in public health dentistry. *RGO.* 2008; 56(1): 75-9.
23. Lopes JHP, Guimarães MS, Coldebella CR, Zuanon ACC. Avaliação da aplicação de ondas de ultra-Som sobre cimentos de ionômero de vidro: rugosidade superficial e dureza. *Rev Odontol Bras Central.* 2010; 18(48): 42-7.
24. 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.
25. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004; 38(3): 204-11.
26. Massoni ACLT, Pessoa CP, Oliveira AFB. Atraumatic restorative treatment and its application in public health. *Rev Odontol da UNESP.* 2006; 35(3): 201-7.
27. Mhaville R, Van Amerongen WE, Mandari G. Residual caries and marginal integrity in relation to Class II glass ionomer restorations in primary molars. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2006; 7(2): 81-4.

28. Nomoto R, McCabe JF. Effect of mixing methods on the compressive strength of glass ionomer cements. *J Dent.* 2001; 29(3): 205–10.
29. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004; 25(23): 5423-31.
30. Pellegrinetti MB, Imparato JCP, Bressan MC, Pinheiro SL, Echeverria SR. Avaliação da retenção do cimento de ionômero de vidro em cavidades atípicas restauradas pela técnica restauradora atraumática. *Pesqui Bras Odontopediatria Integr.* 2005; 5(3): 209.
31. Quivey RG, Kuhnert WL, Hahn K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(4): 301–14.
32. Ribeiro J, Ericson D. In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res.* 1999; 99(6): 533- 40.
33. 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.
34. 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.
35. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.* 2006; 94(1): 1-9.
36. 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.

37. 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.
38. Verraedt E, Pendela M, Adams E, Hoogmartens J, Martens JA. Controlled release of chlorhexidine from amorphous microporous sílica. *J Control Release.* 2010; 142: 47–52.
39. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2000; 16(2): 129-38.

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

Araraquara, 24 de julho de 2013

Luana Mafra Marti

