



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

JESSE AUGUSTO PEREIRA

**Efeito da adição de clorexidina na atividade
antibiofilme, liberação de flúor e microdureza
de cimento de ionômero de vidro**

Araçatuba – SP

2017

JESSE AUGUSTO PEREIRA

**Efeito da adição de clorexidina na atividade antibiofilme,
liberação de flúor e microdureza de cimento de ionômero
de vidro**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio
Mesquita Filho”.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Cristiane Duque

**Araçatuba – SP
2017**

Dedicatória

Aos meus pais, irmãos, família, amigos e professores, pela colaboração, dedicação e amor durante todo esse caminho, fica o meu sincero agradecimento.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois é graças a Ele que tudo de bom acontece em minha vida.

Em seguida, agradeço imensamente a minha família, principalmente meus pais José e Edi, que em nenhum momento mediram esforços para que eu pudesse estar aqui concluindo mais uma etapa. Aos meus irmãos, Emmanoel e Mariangelis que mesmo longe um do outro, sempre nos apoiamos em qualquer situação.

A professora Cristiane Duque, que me acolheu como orientado e me apoiou imensamente. Obrigado pela amizade, carinho e confiança que depositou em mim.

As pós graduandas que tiveram toda paciência do mundo para me ensinar e doar seu tempo.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP que me possibilitaram crescer através do aprendizado clínico e científico.

Aos meus amigos rio-pretenses que desde o início me apoiaram para que meu sonho de cursar a Odontologia fosse possível e após entrar, se esforçaram para que eu me mantivesse firme. Agora eles me esperam para que essa etapa possa ser concluída com alegria em seus corações.

Aos amigos que fiz em Araçatuba, que de certo modo fez com que a distância e a vida de universitário não fosse tão árdua. Um agradecimento especial aos meus queridos amigos Denis, Gabriel e Victória, que praticamente desde o primeiro dia de aula sempre estivemos juntos, fortalecendo cada vez mais a nossa amizade e sendo companheiros.

PEREIRA, J.A. Efeito da adição de clorexidina na atividade antibiofilme, liberação de flúor e microdureza de cimento de ionômero de vidro. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Resumo

Estudos têm associado substâncias antimicrobianas, como o digluconato de clorexidina (CHX), aos cimentos de ionômero de vidro (CIV) com o intuito de aumentar seu efeito inibitório sobre a microbiota remanescente em procedimentos de remoção parcial de cárie. Entretanto, sua indicação será efetiva somente se a incorporação dessas substâncias não afetar as propriedades mecânicas e de liberação de flúor do cimento de ionômero de vidro. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência da incorporação de CHX na ação antibiofilme, na liberação de flúor e microdureza de cimento de ionômero de vidro. Para a avaliação da atividade antibiofilme foram confeccionados corpos de prova de CIV padronizados contendo ou não 1,25 e 2,5% de CHX. Esses corpos foram inseridos em poços individuais de placas de poliestireno contendo *S. mutans* em meio BHI com 1% de sacarose. Após 24h de incubação, os corpos foram removidos, sonicados e inseridos em microtubos contendo solução salina. Em seguida, foi realizada a diluição e plaqueamento das amostras desses microtubos e após 48h de incubação, obtidos os valores de contagem microbiana em UFC/ml. Para a obtenção dos valores de flúor, corpos de prova dos CIV foram confeccionados e inseridos em água deionizada por 15 dias e a leitura foi realizada utilizando eletrodo flúor-sensível acoplado em analisador digital de pH/F. A microdureza foi analisada por meio de 5 endentações nos corpos de prova padronizados em durômetro Shimadzu, com carga estática de 100g por 5s. Os resultados mostraram que a atividade antibiofilme do CIV aumentou com a incorporação de CHX, sendo maior na concentração de 2,5%. A liberação de flúor e a microdureza do CIV não foram afetadas pela presença de CHX, independente de sua concentração. Conclui-se que a presença de CHX melhorou a propriedade antibiofilme do CIV, sem afetar sua microdureza e capacidade de liberar flúor.

Palavras-chaves: Cimentos de ionômeros de vidro, cárie dentária, clorexidina, biofilme, flúor, microdureza.

Pereira, J.A. **Effect of addition of chlorhexidine on antibiofilm activity, fluoride release and microhardness of glass ionomer cement**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Abstract

Studies have associated antimicrobial substances, such as chlorhexidine digluconate (CHX), to glass ionomer cements (GIC) with the aim of increasing its inhibitory effect on the remaining microbiota in partial caries removal procedures. However, its indication will be effective only if the incorporation of these substances does not affect the fluoride release and mechanical properties of the glass ionomer cement. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of CHX incorporation on the antibiofilm action, fluoride release and microhardness of glass ionomer cement. For the evaluation of the antibiofilm activity, standardized GIC specimens containing or not 1.25 and 2.5% of CHX were performed. These specimens were inserted into individual wells of polystyrene plates containing *S. mutans* in BHI medium with 1% sucrose. After 24h of incubation, the specimens were removed, sonicated and inserted into microtubes containing saline solution. Then, the samples were diluted and plated and after 48h of incubation, the microbial count values were obtained in CFU / ml. In order to obtain the fluoride values, GIC specimens were prepared and inserted in deionized water for 15 days and the reading was performed using a fluoride-sensitive electrode coupled in a digital pH / F analyzer. The microhardness was analyzed by means of 5 indentations in the test specimens using a Shimadzu durometer, with static load of 100g for 5s. The results showed that the antibiofilm activity of the GIC increased with the incorporation of CHX, with better results for 2.5%. The fluoride release and microhardness of GIC were not affected by the presence of CHX, regardless of their concentration. It is concluded that CHX improved the antibiofilm property of the GIC, without affecting its microhardness and ability to release fluoride.

Keywords: Glass ionomer cements. Dental caries. Chlorhexidine, biofilm, fluoride, microhardness

Lista de Figuras

- Figura 1.** Box-plots da atividade dos CIV contra biofilme de *S. mutans*. Barras indicam valores mínimos e máximos. Caixas cinzas e pretas indicam valores de quartis mais baixos e mais altos, respectivamente. A linha do meio das caixas é a mediana. 14
- Figura 2.** Valores das médias (barras – desvio padrão) de microdureza para os grupos de CIV. 15
- Figura 3.** Valores das médias (barras – desvio padrão) de liberação de fluoreto dos grupos de CIV, de acordo com o tempo avaliado. 16

Lista de abreviaturas

BHI	Brain Heart Infusion
CIV	Cimento de ionômero de vidro
CHX	Clorexidina
KM	Ketac Molar
MSA	Mitis Salivarius Agar
TRA	Tratamento restaurador atraumático
UFC	Unidade formadora de colônia

Sumário

1 – Introdução	08
2 – Objetivo	10
3 - Material e Métodos	11
4 – Resultados	14
5 – Discussão	17
6 – Conclusão	19
7 – Referências	20
8 – Anexos	23

1 - Introdução

Nos países em desenvolvimento, a prevalência de lesões de cárie dentária não tratadas é muito alta. No Brasil, o relatório da Pesquisa Brasileira de Saúde Bucal (SBBrasil 2010) mostrou que 48,2% das crianças de 5 anos de idade possuem lesões de cáries não tratadas ou quase mais da metade da população nesta faixa etária tinha pelo menos um dente decíduo afetado por lesões de cáries¹. Os motivos da falta de tratamento são múltiplos, como problemas financeiros, falta de serviços de saúde bucal, barreiras de dor e medo e dependência de cuidados bucais convencionais². Dependendo da severidade da cárie na infância, essa doença pode causar problemas funcionais, estéticos e desordens psicossociais que reduzem a qualidade de vida das crianças e de seus familiares³.

Foram investigadas propostas alternativas para a técnica completa de remoção de cárie para dentes permanentes e decíduos⁴. As evidências científicas revelaram que a remoção incompleta de lesões de cáries para dentes com cavidades profundas preserva o máximo de estrutura dentária e reduz a possibilidade de exposição da polpa⁴⁻⁶. Além de ser clinicamente eficaz na manutenção dos dentes e de sua vitalidade por mais tempo, a remoção parcial de cárie mostrou ser também econômica, com custos significativamente reduzidos a longo prazo e menor desconforto para o paciente⁶. Uma alternativa para o tratamento de lesões de cárie em crianças é o Tratamento Restaurador Atraumático (TRA) definido como tratamento restaurador definitivo que consiste na remoção dos tecidos desmineralizados usando intervenção mínima para preservar a estrutura dentária e restaurar a cavidade dentária com cimentos de ionômero de vidro (CIV).

Embora altas taxas de sucesso clínico tenham sido relatadas em vários estudos⁷⁻¹² e algumas análises sistemáticas e meta-análises^{2,13} utilizando a remoção parcial de cárie, ainda há alguma resistência em deixar intencionalmente a dentina cariada, se este é realmente um procedimento seguro, e que não levaria a falhas no tratamento odontológico. Dessa forma, a adição de um agente antimicrobiano no material restaurador poderia reduzir ou eliminar microrganismos cariogênicos que permaneceram após a remoção parcial da cárie e consequentemente evitar a progressão de lesões de cárie e injúrias ao tecido pulpar¹⁴⁻¹⁹. Mesmo que a literatura aponte a manutenção da dentina cariada, o uso de um material antimicrobiano sobre esta dentina cariada residual daria maior segurança clínica aos dentistas quanto a longevidade da restauração e recidivas de lesões de cárie¹⁹.

A clorexidina (CHX) apresenta um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, especialmente estreptococos do grupo mutans, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas e fungos²⁰. Estudos tem sugerido que a incorporação de sais de clorexidina em CIV aumentou a atividade antimicrobiana sem comprometer as propriedades físico-químicas do material^{15,21,22}. Por outro lado, outros estudos tem mostrado que a inclusão de clorexidina nos CIV promoveu significativa atividade antimicrobiana, entretanto, essa mudança induziu efeitos negativos na biocompatibilidade e propriedades mecânicas do material restaurador²³. Um estudo clínico avaliou os resultados à longo prazo de TRA utilizando CIV contendo CHX e este material apresentou superior atividade antibacteriana comparado ao CIV convencional, sem afetar seriamente a performance clinica da restauração até 6 meses de acompanhamento²⁴.

O flúor é amplamente utilizado como um agente anti-cárie altamente eficaz. Ele também possui atividade antimicrobiana, afetando diretamente o metabolismo bacteriano como inibidor enzimático ou reduzindo a tolerância ácida da bactéria³³. Assim, a liberação de flúor pelo CIV é uma das suas propriedades mais importante e é intrinsecamente associada ao efeito anti-cárie do cimento.

2 - Objetivo

O presente estudo teve como objetivo avaliar in vitro as propriedades de microdureza, liberação de flúor e ação antibiofilme de um CIV contendo diferentes concentrações de CHX.

3 - Material e Método

Materiais utilizados

O CIV usado neste estudo foi Ketac Molar Easy Mix (KM, 3MESPE, Seefeld, Bavaria, Germany). O líquido do CIV foi modificado pela adição de 1,25% ou 2,5% de digluconato de clorexidina (CHX – C9394 Sigma-Aldrich, Steinheim, Westphalia, Germany), como proposto por Turkun et al. (2008)²², e então manipulado com o pó, de acordo com as indicações do fabricante, sem alterar o padrão líquido-pó. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata, em três experimentos independentes.

Preparo dos corpos de prova do CIV para os ensaios in vitro (ANEXO 1)

Foram preparados corpos de prova dos dois grupos experimentais (KM +1,25% CHX + KM + 2,5% CHX) e um grupo de controle (KM) para testes de microdureza superficial (n = 9), teste de flúor (n = 9) e propriedades antibiofilme (n = 9). O pó do CIV foi misturado por aglutinação de pó ao líquido previamente associado ou não com 1,25 ou 2,5% de CHX e depois a mistura foi colocada com seringa Centrix (Centrix Inc., Shelton, EUA) em moldes cilíndricos (2 mm de altura x 5 mm de diâmetro)^{17,25}. Em seguida, pressionados contra uma fita de poliéster e uma lâmina de vidro por 5 minutos. Após isso, os espécimes foram armazenados em placas de Petri com gaze umedecida por 1 h a 37 ° C antes de serem testados. Para os ensaios de biofilme, juntos aos espécimes de CIV foram inseridos hastes de fio ortodôntico para que esses pudessem ser suspensos nas placas de 24 poços.

Ensaio de biofilme

Preparo do inóculo bacteriano (ANEXO 2)

A cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi cedida pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) e cultivada em meio Mitis Salivarius Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) contendo 0,2 UI de bacitracina por 48 h a 37°C em estufa de 5% CO₂. Em seguida, colônias de *S. mutans* foram transferidas para caldo Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) por 18 a 24 h nas mesmas condições. As culturas foram novamente repicadas em caldo BHI até atingirem a fase logarítmica com densidade óptica (DO) 0,5 e então diluídas para a obtenção de 1-5x10⁸ células/mL com o objetivo de padronizar o inóculo para os ensaios subsequentes.

Metodologia do biofilme (ANEXO 3)

O ensaio de biofilme foi baseado nas metodologias previamente descritas por Kubota et al. (2008)²⁶ e Hu et al. (2013)²⁷. O objetivo foi avaliar a viabilidade celular do biofilme na superfície do CIV. Os espécimes foram colocados individualmente em suspensão em placas de 24 poços contendo 2µL de inóculo de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) em 2 mL de BHI suplementado com 1% de sacarose durante 24 h a 37 ° C em estufa com 5% de CO₂. Em seguida, os espécimes foram lavados em solução fisiológica (NaCl a 0,9%; 1 mL) inseridos separadamente em microtubos contendo 500 µL de NaCl e submetidos a sonicação em disruptor de células ultrassônicas (Branson, Sonifler 50, Danbury, CT, USA) a 7W por 30s²⁸ e vortexados durante 1 minuto. Em seguida, 25 µL desta solução foram diluídos seriadamente e plaqueados em BHI ágar e incubados durante 48 h a 37 ° C. Após esse período, as colônias bacterianas foram contadas com o auxílio de uma contadora digital e os valores expressos em Unidades Formadoras de Colônias / mL (UFC/mL).

Teste de microdureza Knoop (ANEXO 4)

A microdureza de superfície dos espécimes foi medida com um microdurômetro (Shimadzu HMV-2000 Micro Hardness Tester, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), sob uma carga estática (Knoop) de 50 gF por 5 s após 24 h de umidade relativa. Cinco indentações foram realizados na superfície superior do material a 500 µm de distância um do outro. Uma média da microdureza foi obtida para cada espécime.

Ensaio de liberação de flúor (ANEXO 5)

Os espécimes foram colocados individualmente em um tubo de poliestireno contendo 4 mL de água deionizada e foram deixados para agitar (mesa de agitação orbital TE-420, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) à temperatura ambiente durante 7 dias. Um volume igual de TISAB II (tampão de acetato 1,0 M, pH 5,0, contendo NaCl 1,0 M e 1,2-ciclo-hexanodiaminotetraacético 0,4%) foi adicionado aos tubos. Os espécimes foram lavados com spray de água deionizada, secos com papel absorvente e transferidos para novos tubos contendo 4 mL de água deionizada. As soluções coletadas em 24h e 7 dias foram identificadas e armazenadas em tubos de poliestireno a 4°C. A liberação de flúor foi medida usando um eletrodo específico de fluoreto (Orion 9609-BN, Orion Research, Inc., Beverly, EUA) conectado a um

analisador de íons digital (Orion 720A, Orion 9609-BN, Orion Research, Inc., Beverly, EUA), previamente calibrado com soluções padrão de 0,0625 a 1 ou 1 a 16 mg F⁻ / mL em TISAB II e expresso em mg F⁻ / cm².

Análise estatística

Primeiramente, as contagens bacterianas foram expressas como log₁₀ (UFC / mL). Os dados foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade usando o software SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o nível de significância foi estabelecido em 5%. Os efeitos antibiofilme dos grupos de CIV foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Para os testes de microdureza e liberação de flúor foram aplicados os Testes de ANOVA e Tukey.

4 - Resultados

Ação antibiofilme

A figura 1 mostra os valores obtidos para os ensaios de biofilme e verifica-se que houve diferença estatística comparando KM e KM + CHX. A ação antibiofilme de KM+2,5% CHX foi estatisticamente maior (0,007) que a observada para o grupo KM+1,25% CHX.

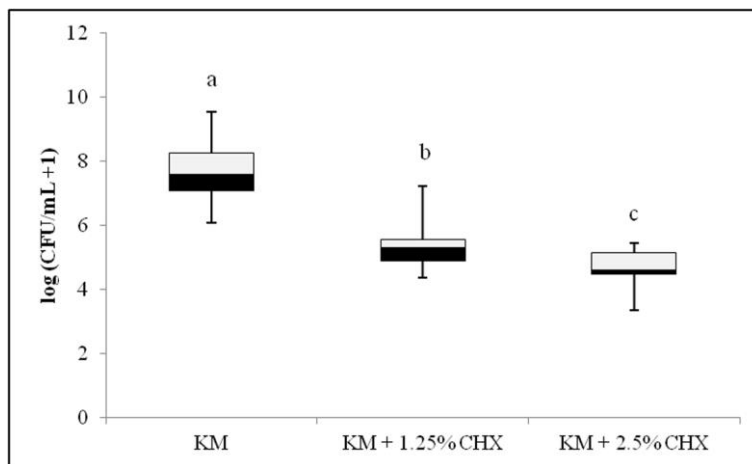


Figura 1. `Box-plots da atividade dos CIV contra biofilme de *S. mutans*. Barras indicam valores mínimos e máximos. Caixas cinzas e pretas indicam valores de quartis mais baixos e mais altos, respectivamente. A linha do meio das caixas é a mediana.

* Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, Segundo os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$.

Microdureza

A figura 2 mostra as médias e desvios-padrão dos valores de microdureza obtidos para os grupos de CIV. Não houve diferença estatística entre KM, KM+1,25% CHX e KM+2,5% CHX. A CHX, em ambas as concentrações, não afetou essa propriedade do CIV.

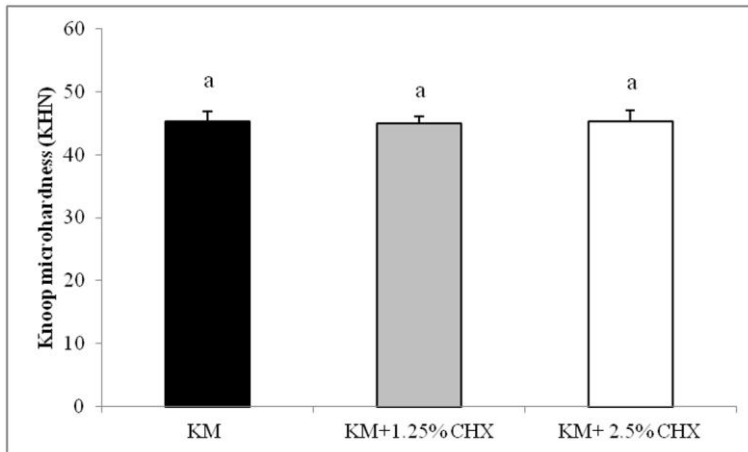


Figura 2. Valores das médias (barras – desvio padrão) de microdureza para os grupos de CIV.

* Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey, considerando $p < 0,05$.

Liberação de flúor

A figura 3 mostra os valores médios de fluoreto liberado dos grupos de CIV e nota-se que houve um aumento na liberação cumulativa de flúor com o tempo, de 24h para 7 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (KM + 1,25 ou 2,5% CHX) e controle (KM) e nem entre as concentrações de CHX, demonstrando que a CHX não afetou a liberação de flúor pelo material.

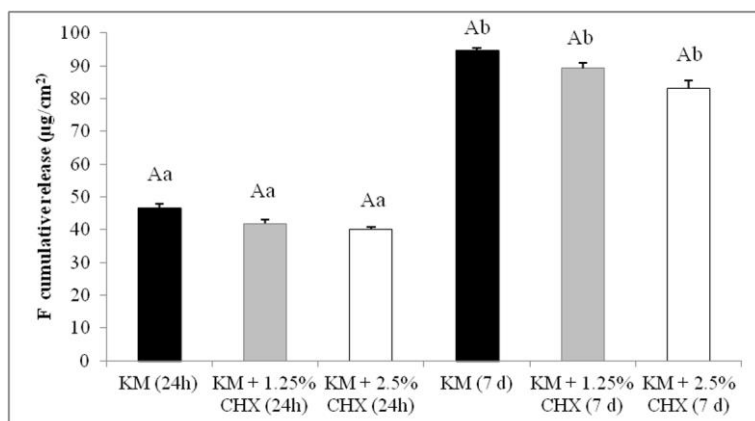


Figura 3. Valores das médias (barras – desvio padrão) de liberação de fluoreto dos grupos de CIV, de acordo com o tempo avaliado.

* Letras maiúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos e letras minúsculas mostram diferença estatística entre os tempos de avaliação, segundo os testes de ANOVA e Tukey, considerando $p < 0,05$.

5 – Discussão

Várias tentativas foram realizadas com a intenção de introduzir propriedades antimicrobianas aos materiais restauradores, incluindo a incorporação de sais de CHX em CIV, como uma nova perspectiva para a eliminação de resíduos microbianos nas lesões de cárie após ART. Alguns autores demonstraram que a adição de CHX aos CIV melhorou o efeito inibitório contra microrganismos bucais, incluindo espécies de *Streptococcus* e *Lactobacillus*^{15,29,30}. No entanto, existem várias diferenças nas metodologias utilizadas nestes estudos, principalmente no que se refere ao cimento de ionômero de vidro e ao sal de clorexidina escolhido para os experimentos. Estudos afirmaram que ambas as formas de digluconato e diacetato de clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana^{15, 22, 29-31}. Contudo, diferenças entre elas foram encontradas considerando as zonas de inibição contra *S. mutans* e *L. acidophilus*, indicando que o tipo de sal pode afetar a ação antimicrobiana de CHX quando associada com os CIV^{15,29,30}. *Streptococcus mutans* têm sido considerado como o principal agente etiológico da cárie dentária e desempenha um papel importante na formação do biofilme dental³². Este presente estudo demonstrou que a atividade de CIV contendo CHX contra o biofilme de *S. mutans* foi significativamente maior quando comparado ao controle sem CHX e aumentou com a maior concentração de CHX.

A maioria dos estudos na literatura demonstraram a eficácia antibacteriana da incorporação de CHX em CIV convencional usando o teste de difusão em ágar e não por atividade anti-biofilme^{15,22,31}. No presente estudo, considerando as limitações do ensaio de biofilme, a incorporação de CHX reduziu significativamente as contagens de *S. mutans* aderidos à superfície do CIV, e esta propriedade antibiofilme aumentou com a maior concentração de CHX. Embora neste estudo tenha sido utilizado o digluconato de CHX e um cimento de ionômero de vidro diferente, os resultados estão de acordo com os obtidos por Hu, et al.²⁷ (2013) e Du, et al.²⁹ (2012). Foi especulado que o CHX liberado do material poderia persistir no ambiente, devido à sua substantividade, criando um efeito bacteriostático e interferência na colonização pelas bactérias e na formação de biofilmes³².

Estudos demonstraram que a adição de agentes antibacterianos pode mudar as propriedades físico-mecânicas dos cimentos de ionômero de vidro^{15, 22, 29-30}. Neste presente estudo, os valores de microdureza do CIV não foram afetados

pela adição de CHX (1,25 ou 2,5%) quando comparados com o grupo controle. Esses achados são consistentes com os obtidos por Takahashi et al.¹⁵ (2006) e Hu et al.²⁷ (2013). De acordo com Jedrychowski et al.²³ (1983), o cimento de ionômero de vidro deteriora-se após a adição de CHX em concentrações superiores a 5%.

O flúor é amplamente utilizado como um agente anti-cárie altamente eficaz. Ele também possui atividade antimicrobiana, afetando diretamente o metabolismo bacteriano como inibidor enzimático ou reduzindo a tolerância ácida da bactéria³³. Assim, a liberação de flúor pelo CIV é uma das suas propriedades mais importantes e é intrinsecamente associada ao efeito anti-cárie do cimento. Neste estudo, a liberação de flúor não foi afetada pela incorporação de ambas as concentrações de CHX, de forma semelhante ao encontrado por Tüzüner, et al.³¹ (2011). Em estudo anterior, a liberação de flúor dos CIV após a adição de 10% de CHX diminuiu com o tempo, mas permaneceu mensurável após 60 dias²¹. Isto foi especulado como havendo uma interação entre o íon fluoreto e a molécula de CHX catiônica, resultando na precipitação de sais com menor solubilidade, deixando menos fluoreto disponível²¹.

Embora a concentração mais alta de CHX (2,5%) pareça mais promissora, estudos tem demonstrado que altas concentrações de CHX têm efeitos citotóxicos para as células^{34,35}. Estudo semelhante desenvolvido por Castilho et al.²⁵ (2012) com CIV modificado por resina mostrou que a associação de CHX 2,5% ao CIV, levou a danos a células odontoblastóides. Lembrando que a biocompatibilidade é uma propriedade necessária para os CIV, uma vez que esses materiais são geralmente aplicados em dentina profunda e poderiam liberar componentes tóxicos e estes indiretamente afetam a polpa dentária^{25,34,35}.

6 – Conclusões

Conclui-se que a presença de CHX melhorou a propriedade antibiofilme do CIV, sem afetar sua microdureza e capacidade de liberar flúor.

7 - Referências

1. Ministério da Saúde. SBBrasil. Pesquisa nacional de Saúde Bucal – Resultados principais. 2010. In: dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf (Access: 07_20_2017).
2. Frencken JE, Homgren CJ. How effective is ART in the management of dental caries? *Community Dent Oral Epidemiol* 1999;27:423-30.
3. Chaffee BW, Cheng A. Global research trends on early-life feeding practices and early childhood caries: a systematic review. *J Oral Dis.* 2014;2014:675658.
4. Schwendicke FQ, Dörfer CE, Paris S. Incomplete caries removal: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res.* 2013;92:306-14.
5. Maltz M, Alves LS. Incomplete caries removal significantly reduces the risk of pulp exposure and post-operative pulpal symptoms. *J Evid Based Dent Pract.* 2013;13:120-2.
6. Schwendicke FQ, Stolpe M, Meyer-Lueckel H, Paris S, Dorfer CE. Cost-effectiveness of one- and two-step incomplete and complete excavations. *J Dent Res* 2013;92:880-7.
7. Wambier DS, dos Santos FA, Guedes-Pinto AC, Jaeger RG, Simionato MR. Ultrastructural and microbiological analysis of the dentin layers affected by caries lesions in primary molarstreated by minimal intervention. *Pediatr Dent.* 2007;29:228-34.
8. Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, Spolidorio DM, de Souza Costa CA, Hebling J. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentinecaries removal. *Clin Oral Investig.* 2009;13:465-71.

9. Casagrande L, Bento LW, Dalpian DM, García-Godoy F, de Araujo FB. Indirect pulp treatment in primary teeth: 4-year results. *Am J Dent.* 2010;23:34-8.
10. Gruythuysen RJM, van Strijp AJP, Wu MK. Long term survival of indirect pulp treatment performed in primary and permanent teeth with clinically diagnosed deep carious lesions. *J Endod.* 2010;36:2015.
11. Bressani AE, Mariath AA, Haas AN, Garcia-Godoy F, de Araujo FB. Incomplete caries removal and indirect pulp capping in primary molars: a randomized controlled trial. *Am J Dent.* 2013;26:196-200.
12. Trairatvorakul C, Sastararuij T. Indirect pulp treatment vs antibiotic sterilization of deep caries in mandibular primary molars. *Int J Paediatr Dent.* 2014;24:23-31.
13. Ricketts DN, Kidd EA, Innes N, Clarkson J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;CD003808.
14. Pinheiro SL, Simionato MR, Imparato JC, Oda M. Antibacterial activity of glass-ionomer cement containing antibiotics on caries lesion microorganisms. *Am J Dent.* 2005;18:261-6.
15. 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.
16. Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent.* 2009 Jan-Feb;34(1):18-23.
17. de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, 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 Feb;57(2):131-8.

18. Ferreira JM, Pinheiro SL, Sampaio FC, Menezes VA. Use of glass ionomer cement containing antibiotics to seal off infected dentin: a randomized clinical trial. *Braz Dent J.* 2013;24(1):68-73.
19. Prabhakar AR, Prahlad D, Kumar SR. Antibacterial activity, fluoride release, and physical properties of an antibiotic-modified glass ionomer cement. *Pediatr Dent.* 2013 Sep-Oct;35(5):411-5.
20. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res.* 1977;85:255-65.
21. Hoszek A, Ericson D. In vitro fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine gluconate. *Oper Dent.* 2008;33:696-701.
22. Türkün LS, Türkün M, Ertuğrul F, Ateş M, Brugger S. Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent.* 2008;20:29-44.
23. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983;10:373-81.
24. Kabil NS, Badran AS, Wassel MO. Effect of the addition of chlorhexidine and miswak extract on the clinical performance and antibacterial properties of conventional glass ionomer: an in vivo study. *Int J Paediatr Dent.* 2016. doi: 10.1111/ipd.12273. Epub ahead of print.
25. de Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA et al. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent.* 2013 Feb;41(2):155-63.
26. Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J Biosci Bioeng.* 2008 Oct;106(4):381-6.

27. Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Wang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J Dent*. 2013 Oct;41(10):927-34.
28. Brighenti FL, Gaetti-Jardim E Jr, Danelon M, Evangelista GV, Delbem AC. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralisation and dental biofilm composition in situ. *Arch Oral Biol*. 2012 Aug;57(8):1034-40.
29. 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;57:58-64.
30. Marti LM, Mata M, 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;25:33-7.
31. Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glassionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent*. 2011;23:46-55.
32. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:499-515.
33. Marquis RE. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Can J Microbiol*. 1995;41:955-64.
34. Lessa FC, Nogueira I, Vargas FS, Spolidorio DM, Hebling J, García-Godoy F, et al. Direct and transdentinal antibacterial activity of chlorhexidine. *Am J Dent*. 2010;23:255-9.

35. Aranha AM, Giro EM, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to anodontoblast-cell line. *Dent Mater*. 2006 Sep;22(9):864-9.

8 – Anexos

ANEXO A

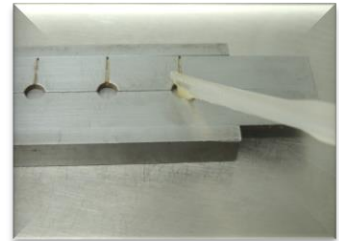
Preparo dos corpos de prova de CIV



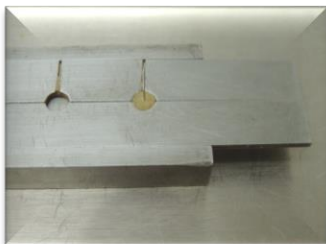
Cimento de ionômero de vidro Ketac Molar Easy Mix



Manipulação do CIV contendo ou não CHX



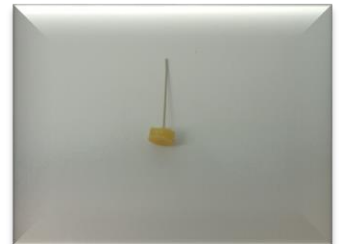
Cimento de ionômero de vidro sendo inserido no molde metálico



Fixação de uma pequena haste de metal no corpo de prova somente para os ensaios de biofilme



Incubação dos corpos em estufa com umidade relativa



Corpo de prova de CIV

ANEXO A

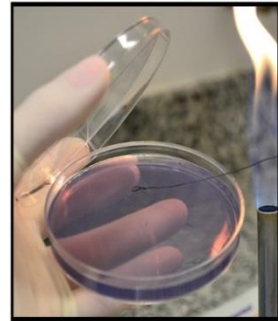
Preparo do inóculo de *S. mutans*



Coleta de alíquota de 10µl de *S. mutans*



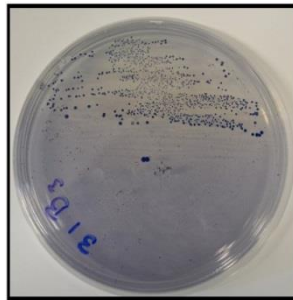
Plaqueamento da alíquota em meio MSB



Coleta das colônias bacterianas



Incubação em estufa de CO₂



Colônias de *S. mutans*



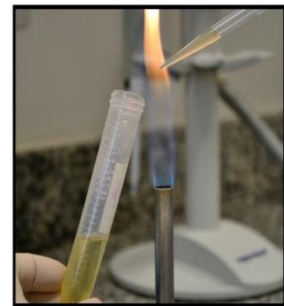
Transferência das colônias para caldo BHI



Crescimento incubação - Overnight



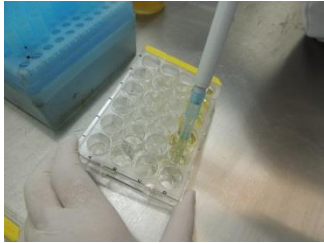
Coleta da cultura overnight



Transferência da cultura para novo caldo e crescimento até DO_{550nm} = 0,5

ANEXO B

Ensaio de biofilme



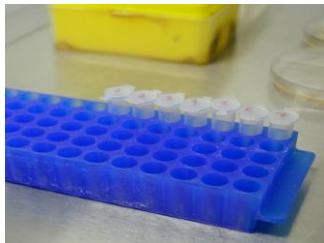
Inserção da solução de 2 mL de BHI caldo suplementado com 1% de sacarose e 20ul de suspensão bacteriana



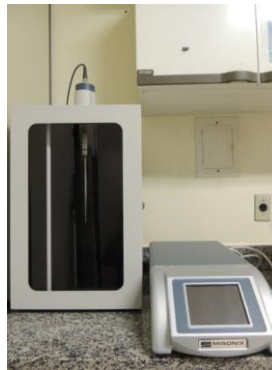
Corpos de prova inseridos em meio BHI com sacarose



Incubação em estufa de CO₂



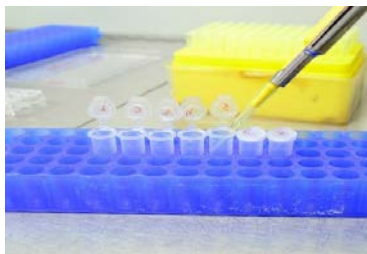
Corpos de prova dentro dos microtubos, após 48 h



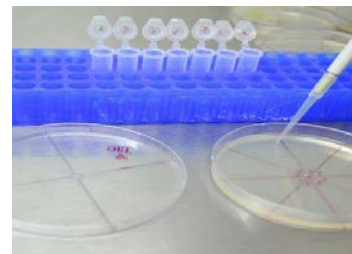
Sonicador



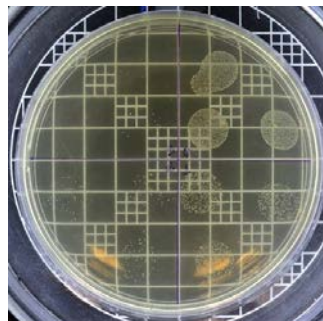
Coleta do biofilme desagregado para diluição



Diluição dos CIV



Plaqueamento das amostras



Contagem das UFC/mL em lupa estereoscópica

ANEXO C

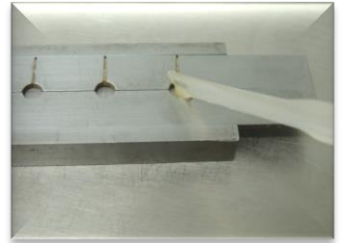
Teste de microdureza Knoop



Cimento de ionômero de vidro Ketac Molar Easy Mix



Manipulação do CIV



Cimento de ionômero de vidro inserido em molde metálico



Leitura da microdureza em Durômetro Shimadzu

ANEXO D

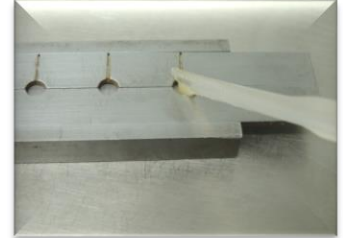
Liberação de flúor



Cimento de ionômero de vidro Ketac Molar Easy Mix



Manipulação do CIV



Cimento de ionômero de vidro inserido em molde metálico



Leituras em analisador de flúor em $\mu\text{g F/cm}^2$