



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Araçatuba

DINAH FRESSATO SILVA

**Efeito da incorporação de fosfato  
inorgânico e clorexidina em cimento de  
ionômero de vidro sobre biofilme de  
*S. mutans***

Araçatuba- SP  
2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Araçatuba

DINAH FRESSATO SILVA

**Efeito da incorporação de fosfato  
inorgânico e clorexidina em cimento de  
ionômero de vidro sobre biofilme de  
*S. mutans***

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

Orientadora: Profª Drª Cristiane Duque  
Coorientador: Prof. Dr. Alberto C. B. Delbem

**Araçatuba- SP  
2015**

Dedico este trabalho aos meus pais, Vânia e Marco, e à  
minha irmã Flávia!

Nada na minha vida teria acontecido sem o apoio e  
confiança que sempre depositaram em mim! Por todos  
os momentos que estiveram ao meu lado, me  
escutando, aconselhando e me fazendo enxergar que  
tudo feito com amor e dedicação tem uma recompensa  
gratificante! Obrigada por sermos essa família tão unida,  
que me dá tanto orgulho!  
Eu amo muito vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus**, que sempre intercedeu por mim. Agradeço por me proporcionar uma vida com tantas oportunidades e clareza por saber reconhece-las.

**Aos meus pais, Marco E. Silva e Vânia M. Fressato Silva**, que são bases da minha vida, pelo amor incondicional. Sei que nenhuma pessoa do mundo faria o que fazem por mim. Obrigada por sempre apoiarem minhas escolhas. Por me ensinarem o valor da nossa família, e por me darem um lar tão feliz. Meu amor por vocês é imenso!

**À minha irmã Flávia**, que também é minha irmã de alma, meu porto-seguro. “Existe uma grande diferença entre quem te escuta e quem te entende”, e você me entende como ninguém. Amo muito você!

**Ao meu tio José Renato**, meu segundo pai, por nunca medir esforços para me ver feliz.

**À vó Dag e vó Neyde (*in memoriam*)**, pelas preces, pelos mimos, pela atenção, por todo amor. Por me proporcionarem essa grande família unida.

**Aos meus tios e tias, primos e primas**, por serem meus eternos companheiros. Vocês fazem da nossa família a melhor desse mundo!!!

**Ao Rodrigo**, por dividir sua vida comigo, por ser meu parceiro de todas as horas. Obrigada pela força nos momentos em que mais preciso, pelo carinho, e paciência!

**Às minhas amigas de Paraguaçu: Raquel, Carina, Camila, Rafaela, Lais**. Que são minhas amigas desde sempre e nem mesmo com a distância deixaram de fazer parte do meu dia-a-dia. “A gente não faz amigos, reconhece-os”. Guardo vocês dentro do meu coração.

**Aos meus amigos da graduação: Bianca, Débora, Aline, Paola, Victória, Ruan, Rafael, Waddi, Nani, Thainan, Gabriela**. Minha faculdade, com certeza, não teria sido a mesma sem vocês. Obrigada por terem se tornado minha família durante esses cinco anos. Desejo que nossa amizade se estenda muito além desse tempo

que convivemos juntos e, se tivesse que viver tudo de novo, escolheria viver com vocês.

**À minha querida orientadora Profa. Dra. Cristiane Duque.** Poucos tem a oportunidade de conhecer pessoas que se dedicam e amam tanto o trabalho que fazem. A senhora é uma dessas pessoas iluminadas, que conseguem realizar com prazer o que deve ser feito no dia-a-dia, sendo ainda, mãe e esposa dedicada. Obrigada por ter me acolhido, me incluído no ramo das pesquisas e me orientado tão generosamente. Sempre respondendo e-mails prontamente, comparecendo ao laboratório quando solicitei ajuda, passando noites em claro corrigindo resumos para congressos de todos os seus orientandos. Creio que não só eu, como todos que tem essa grande oportunidade de a ter como orientadora, reconhecem e agradecem a dedicação que tem conosco. Serei sempre grata por tudo que fez por mim!!!

**Ao meu Coorientador,** Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, que além de um grande profissional, é um exemplo de conduta e caráter para todos nós.

**À Profª Dra Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar,** professora querida, que se disponibilizou a fazer parte da banca examinadora, colaborando nobremente para o enriquecimento deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos em clínica, em aula, sempre demonstrando que além da técnica o paciente deve ser tratado acima de tudo, com respeito e amor. Admiro muito o seu trabalho e sou imensamente feliz pela oportunidade de ser sua aluna!

**À doutoranda Thayse Yumi Hosida,** que aceitou fazer parte da banca examinadora, contribuindo nobremente para o enriquecimento deste trabalho. Muito obrigada Thayse, por esses anos de convivência e, principalmente pela disposição em me ajudar! Tenho certeza que seu sucesso está só começando e você irá ter uma carreira brilhante!

**Ao Jesse,** por tudo que fez por mim durante todos esses meses. Você se disponibilizou em todos os momentos a me ajudar, sempre presente, fiel, amigo. Sem você não teria conseguido terminar este trabalho! Serei eternamente grata.

**À Márjully**, minha companheira de laboratório, que foi fundamental com a sua contribuição para realização do projeto. E que, além da ajuda nos trabalhos, congressos, experimentos, acrescentou também a excelente companhia e alegria contagiante. Muito obrigada!

**Aos Docentes da Disciplina de Odontopediatria**, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof.Dr. Juliano Pelim Pessan, por tantos conhecimentos transmitidos e pela agradável convivência.

**Aos alunos e alunas de Mestrado, Doutorado, Pós-Doutorado e Iniciação Científica**: Natália, Marcelle, Kevin, Mariana, Lili, Karina, Juliana, Kelly, Carla, José Antônio, Renan, Laís, Douglas, Jaqueline C., Luiz, Laís Ribas, Marina Sena, Lucas, Guilherme, Vanessa, pela adorável companhia no laboratório e pela amizade.

**À Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa dos professores Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Dr. João Eduardo Gomes Fiho, digníssimo Vice-Diretor.

**À Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão bolsa de estudos (Processo 2014/03174-2) e a **Agência UNESP de Inovação - AUIN** (processo 2173/2013) que possibilitaram o desenvolvimento dessa pesquisa.

SILVA, D.F. **Efeito da incorporação de fosfato inorgânico e clorexidina em cimento de ionômero de vidro sobre biofilme de *S. mutans***. 2015. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar se a incorporação de clorexidina (CHX) e nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMP) poderia aumentar a ação antibiofilme de um cimento de ionômero de vidro modificado (CIV) por resina indicado para restauração dentária. Os grupos deste estudo foram: 1. CIV – Fuji II LC, 2. CIV + CHX 1,25%; 3. CIV + CHX 2,5%; 4. CIV + TMP 7%, 5. CIV + CHX 1,25% + TMP7%; 6. CIV + CHX 2,5% + TMP 7%, 7. CIV + TMP 14%, 8. CIV + CHX 1,25% + TMP14%; 9. CIV + CHX 2,5% + TMP 14%. Inicialmente, foi realizado o teste de teste de difusão em ágar para verificar se a combinação TMP e CHX poderia ter efeito antimicrobiano, e em seguida, realizado o ensaio de biofilme. Para o teste de difusão em ágar, cepa padrão de *Streptococcus mutans* foi cultivada em BHI (Brain Heart Infusion) caldo a 37° C por 48 horas. Camadas-base em BHI ágar contendo 300µl do inóculo bacteriano foram preparadas em placas de Petri. Poços com 4 mm foram confeccionados no ágar e os CIVs inseridos. As placas foram incubadas por 48 horas a 37° C e em seguida, os halos de inibição mensurados com auxílio de um paquímetro. Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA e Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ). Para o ensaio de biofilme, seis espécimes cilíndricos foram confeccionados em matrizes metálicas para cada grupo de material. Os espécimes de CIV foram inseridos em poços de placas de 24 poços e mantidos em suspensão em BHI caldo contendo 1% de sacarose e 20µl da suspensão de *S. mutans*. Após 48 horas, os biofilmes foram lavados, corados com solução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)), e então 200 µl da suspensão bacteriana resultante foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro. Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados mostraram que a adição de CHX aumentou significativamente a ação antimicrobiana dos CIV para todos os grupos em que foi associada e que houve um aumento significativo na ação antibiofilme dos CIV quando adicionada CHX ou CHX

e TMP. Conclui-se que o cimento de ionômero de vidro associado com CHX 2,5% e TMP 14% apresentou os resultados antibiofilme mais promissores.

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro. Fosfatos. Clorexidina. Ação antimicrobiana. Biofilme.

SILVA, D.F. **Effect of the incorporation of inorganic phosphate and chlorhexidine into glass ionomer cement on *S. mutans* biofilm**. 2015. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to determine whether the incorporation of sodium trimetaphosphate nanoparticles (TMP) and chlorhexidine increases the anti-biofilm action of glass ionomer cement (GIC) modified by resin indicated for dental restoration. The groups of this study were: 1. CIV – Fuji II LC, 2. CIV + CHX 1,25%; 3. CIV + CHX 2,5%; 4. CIV + TMP 7%, 5. CIV + CHX 1,25% + TMP7%; 6. CIV + CHX 2,5% + TMP 7%, 7. CIV + TMP 14%, 8. CIV + CHX 1,25% + TMP14%; 9. CIV + CHX 2,5% + TMP 14%. Initially, agar diffusion tests were used to test the antimicrobial effect of TMP and CHX combinations for subsequent biofilm assays. For the agar diffusion test, the microbial inoculum of *Streptococcus mutans* was grown in BHI broth and incubated at 37 ° C for 48 hours. Layers base of BHI agar containing 300µl of bacterial inoculum were prepared in Petri dishes. Wells with 4 mm were made in the agar and the GICs inserted them. The plates were incubated for 48 hours at 37 ° C and the inhibition zones were measured using a caliper. Data were subjected to ANOVA and Bonferroni tests( $p < 0.05$ ). For the biofilm assay, six cylindrical specimens were made of metal matrices for each material group. The GIC specimens were placed in individual wells of 24-well plates and maintained in suspension within the BHI broth supplemented with 1% sucrose and 20ul of bacterial suspension. After 48 hours, biofilms were washed and stained with XTT solution (2,3-Bis- (2-Methoxy-4-nitro-5-Sulfophenyl). Then 200 uL of suspension were removed and inserted in 96-well plates for reading on a spectrophotometer. The data were submitted to the Kruskal-Wallis e Mann-Whitney test ( $p \leq 0.05$ ). The results showed that the addition of CHX significantly increases the antimicrobial activity of GIC in all tested groups and that there was a significant increase in antibiofilm action of GIC when CHX or CHX and TMP were added. It would be concluded that the glass ionomer cement associated with CHX 2.5% and 14% TMP showed the most promising results.

Keywords: Glass ionomer cement. Phosphates. Chlorhexidine. Antimicrobial action. Biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esquema demonstrando o preparo de cada poço (placas de 24 poços) para os ensaios de biofilme. 20
- Figura 2-** Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Streptococcus mutans*. 21
- Figura 3-** Box plot mostrando a ação dos cimentos de ionômero de vidro sobre biofilme de *S. mutans* 22

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Grupos de materiais do estudo

18

## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |                                                          |
|--------|----------------------------------------------------------|
| ANOVA  | Análise de variância                                     |
| *      | Asterisco                                                |
| BHI    | Brain Heart Infusion                                     |
| BHI-A  | Brain Heart Infusion Agar                                |
| cm     | Centímetro                                               |
| CIV    | Cimento de ionômero de vidro                             |
| CHX    | Clorexidina                                              |
| DO     | Densidade Óptica                                         |
| et al. | E colaboradores                                          |
| g      | Grama                                                    |
| °C     | Grau Celsius                                             |
| h      | Hora                                                     |
| =      | Igual                                                    |
| >      | Maior                                                    |
| <      | Menor                                                    |
| µL     | Microlitro                                               |
| µm     | Micrometro                                               |
| mg     | Miligrama                                                |
| mL     | Mililitro                                                |
| mm     | Milímetro                                                |
| nm     | Nanometro                                                |
| p      | Nível de significância                                   |
| %      | Porcentagem                                              |
| s      | Segundos                                                 |
| TMP    | Trimetafosfato de sódio                                  |
| XTT    | 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl - Sigma-Aldrich |

## **SUMÁRIO**

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução</b>         | <b>14</b> |
| <b>2 Objetivos</b>          | <b>16</b> |
| <b>3 Material e Métodos</b> | <b>17</b> |
| <b>4 Resultados</b>         | <b>21</b> |
| <b>5 Discussão</b>          | <b>23</b> |
| <b>6 Conclusão</b>          | <b>26</b> |
| <b>Referências</b>          | <b>27</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A remoção parcial de tecido cariado surgiu como uma técnica alternativa que possibilita a conservação do remanescente dentário evitando, assim, danos pulpare. Alguns estudos demonstram que com a remoção parcial da dentina cariada localizada na parede pulpar da cavidade, associada ao selamento do dente, existe uma redução significativa no número de microrganismos cariogênicos viáveis, além da ausência da evolução clínica dessas lesões (BESIC, 1943; JENSEN; HANDELMAN, 1980). Contudo, o resíduo cariogênico poderia influenciar em uma má adesão do material restaurador no ângulo cavo superficial, podendo levar à formação de gaps marginais. Por consequência, esse espaço entre o material e a restauração levaria a uma maior aderência de biofilme dental ou facilitaria a passagem de nutrientes para as bactérias remanescentes do processo carioso, possibilitando sua sobrevivência (KEMOLI; VAN AMERONGEN, 2011). Assim, torna-se necessário o estudo de materiais odontológicos com propriedades antimicrobianas, que atuem sobre a microbiota remanescente e no ingresso de novos microrganismos na interface dente-restauração, e propriedades anticariogênicas, que promovam a remineralização e previnam o desenvolvimento de cárie secundária (SILVA et al., 2015).

Neste contexto, materiais odontológicos com atividade biológica são indicados dentro das filosofias atuais de tratamento da doença cárie baseadas em propriedades de remineralização e ação antimicrobiana (CALDEIRA et al., 2011). O cimento de ionômero de vidro é um dos materiais que tem bastante relevância clínica em Odontopediatria por possuir qualidades que se destacam pela prevenção da desmineralização e promoção da remineralização de esmalte e dentina e na inibição do crescimento de bactérias envolvidas no processo da cárie dentária (FORSTEN, 1998; TEN CATE; VAN DUINEN, 1995). Isto porque o CIV apresenta capacidade de liberar flúor, o que protege a estrutura dentária adjacente dos ácidos bacterianos, além de apresentar adesividade química à estrutura dentária, biocompatibilidade aos tecidos orais e coeficiente de expansão térmica mais próximos da estrutura dentária (MARTINS et al., 1988; NGO, 2010).

O trimetafosfato de sódio é um fosfato de cadeia cíclica condensada que vem contribuindo, através de associações, à redução da cárie dentária. Sua efetividade começou a ser estudada na incorporação em alimentos (HARRIS et al., 1967; HENRY; NAVIA, 1969) e posteriormente adicionados em dentifrícios (STADTLER et al., 1996; TAKESHITA et al., 2009), onde tem demonstrado grande capacidade em aumentar o potencial anticárie do fluoreto (DANELON et al., 2014; PANCOTE et al., 2014). Tiveron et al. (2013) demonstraram que, em diferentes concentrações testadas, quando o TMP foi associado a uma resina composta, quem se sobressaiu com melhor efeito anticárie, foi o TMP 14,1%, relacionando uma maior capacidade do material em liberar flúor e TMP com pouca alteração na dureza da resina.

Ainda no contexto de remoção parcial da cárie, mesmo após a remoção da dentina infectada e após o selamento, ainda foram encontradas bactérias viáveis no remanescente dentinário, e, quando proposto o acréscimo de um agente antimicrobiano em material restaurador, como o cimento de ionômero de vidro, a clorexidina mostrou ser um agente eficaz e seguro, aumentando o efeito antimicrobiano do CIV (TAKAHASHI et al., 2006; TURKUN et al., 2008). Castilho et al. (2013), em estudo *in vitro* incorporaram digluconato de clorexidina a 1.25% a um CIV modificado por resina para forramento e demonstraram eliminação completa de estreptococos grupo mutans após três meses da remoção parcial de cárie em crianças, sem alterações nas propriedades mecânicas do material.

## **2 OBJETIVO**

Verificar se a incorporação de clorexidina e nanopartículas de trimetafosfato de sódio aumentam a ação antibiofilme de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina indicado para restauração dentária.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMP)**

A moagem do trimetafosfato de sódio (TMP – Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) foi realizada no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O TMP foi primeiramente pesado na quantidade necessária para o estudo, e a seguir, armazenado em frascos de polietileno. Bolas de zircônia foram adicionadas ao TMP em associação com isopropanol até recobrir as bolas. Os frascos foram vedados com veda rosca, na rosca da tampa do frasco de polietileno. Em seguida, os frascos foram levados ao moinho de bolas sendo submetidos à moagem por 48 horas (DANELON et al., 2014).

Após o TMP ter sido submetido ao processo de moagem, o mesmo foi submetido à filtração em peneiras granulométricas para a sua separação das bolas de zircônia. O frasco de polietileno contendo o TMP foi lavado com isopropanol e o material filtrado será vedado com papel alumínio e submetido à secagem em estufa a temperatura de 85°C para evaporação do solvente (isopropanol). Após a secagem do TMP, o mesmo foi submetido à trituração até atingir partículas com diâmetro médio de 22,7nm, em almofariz de ágata, pesado e armazenado em frasco de polietileno. A difração de raios-X foi utilizada para a identificação da estrutura cristalina e para estimativa do tamanho médio de TMP moído por 48 horas.

#### **3.2 Preparo do cimento de ionômero de vidro (CIV)**

O cimento de ionômero de vidro modificado por resina utilizado para os experimentos laboratoriais foi o Fuji II LC (GC America, USA). TMP e diacetato de clorexidina (CHX) (Sigma-Aldrich), foram inseridos no pó do CIV em concentrações definidas, conforme mostra a Tabela 1. As concentrações de TMP foram escolhidas baseadas nos resultados obtidos por Tiveron et al. (2013) e as da clorexidina conforme resultados de Turkun et al. (2008). Para a mistura de cada concentração de TMP e CHX foi utilizado um frasco de 5g do pó do CIV, descontando-se as

quantidades em miligramas desses agentes da quantidade de pó do CIV, para manter a proporção pó-líquido indicada pelo fabricante (3,2g pó para 1,0g de líquido). Os espécimes de CIV foram fotoativados (Blue Light Star II, Microdont) com 1000 mW/cm<sup>2</sup> de intensidade de luz por 40 segundos.

**Tabela 1 - Grupos do estudo**

|                   |                             |
|-------------------|-----------------------------|
| CIVMR             | CIVMR + TMP 7% + CHX 1,25%  |
| CIVMR + TMP 7%    | CIVMR + TMP 14% + CHX 1,25% |
| CIVMR + TMP 14%   | CIVMR + TMP 7% + CHX 2,5%   |
| CIVMR + CHX 1,25% | CIVMR + TMP 14% + CHX 2,5%  |
| CIVMR + CHX 2,5%  |                             |

\*CIV – Cimento de Ionômero de Vidro

CHX – Clorexidina

TMP – Trimetafosfato de Sódio nanoparticulado

Fonte: Autor

### 3.3 Avaliação das propriedades microbiológicas dos CIV

Os ensaios microbiológicos foram realizados com *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) que foi reativado, a partir de sua cultura original, em placas de BHI-Ágar (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Detroit, MI) e incubadas a 37° C em estufa a 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, 5 colônias de cada cepa foram inseridas em caldo BHI individualmente e incubadas a 37°C por 18 a 24 h. As culturas foram crescidas até uma densidade óptica de 0,5 em uma absorbância de 550nm (aproximadamente 3x 10<sup>8</sup> UFC/ml), mensurada em espectrofotômetro (PowerWave 340, Biotek). Essas culturas foram utilizadas nos subseqüentes ensaios microbiológicos.

#### 3.3.1 Teste de difusão em ágar

Os procedimentos foram seguidos a partir da metodologia do teste de difusão em ágar descrita por Duque et al. (2005). Uma alíquota de 300µL de cada

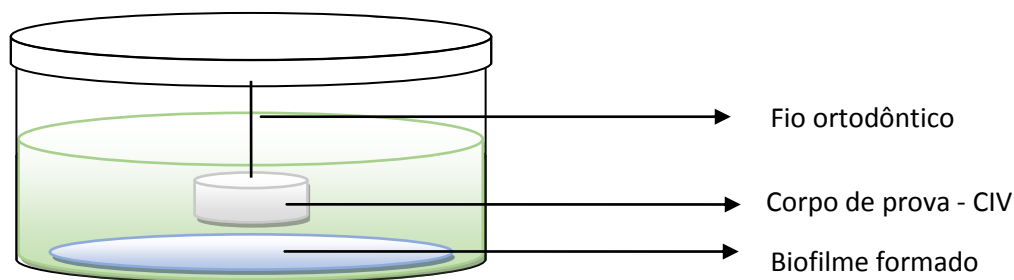
suspensão bacteriana (D.O de 0,5;  $A_{550nm}$ ) foi homogeneizada com 15 mL de BHI-A a 45° C. Após a secagem do meio de cultura, cilindros de plástico com 4 mm de diâmetro devidamente desinfetados foram utilizados para confeccionar poços no ágar (n = 10). Os CIVs foram manipulados com ou sem CHX e TMP (tabela 1) e de acordo com as instruções do fabricante, e foram inseridos nos poços, preenchendo-os até a borda com auxílio de uma seringa Centrix e fotopolimerizadas (Blue Star II – Microdont). Para cada experimento, também foram utilizados como controle positivo CHX a 2% e como controle negativo, poços sem nenhum material. As placas foram mantidas por 2h na temperatura ambiente para permitir a difusão dos cimentos e incubadas a 37° C por 24h. Duas medidas de cada halo de inibição foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital e as médias calculadas. Os testes foram realizados em triplicata.

### 3.3.2 Ensaios de biofilme

O ensaio de biofilme foi baseado nas metodologias propostas por Hu et al. (2013) e por Kubota et al. (2008), com modificações. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foi cultivado em BHI caldo a 37° C por 24h. A suspensão bacteriana obtida foi medida em espectrofotômetro (PowerWave 340, Biotek) e ajustada a uma densidade óptica de 0,5 a 550nm (aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/ml). Seis espécimes cilíndricos (3x2x1mm) foram confeccionados em matrizes metálicas para cada material testado, em três experimentos independentes. No dia seguinte, após terem permanecido em ambiente de estufa a 100% de umidade, os espécimes foram lavados com água destilada e desinfetados com álcool 70° por 10s (XIE et al., 2011). Os espécimes de CIV foram inseridos em poços individuais de placas de 24 poços (Corning Inc., Corning, NY, USA) e mantidos em suspensão dentro do meio caldo BHI. Para isso, no momento da manipulação do CIV, um fio ortodôntico foi inserido no meio de corpo de prova e após a completa presa do material, este fio foi fixado, através de aquecimento da sua ponta, na tampa da placa de poliestireno, e mantido durante o período dos ensaios de biofilme (Figura 1). Uma solução de 2 mL de BHI caldo suplementado com 1% de sacarose e 20ul de suspensão bacteriana foi inoculado em cada poço. No fundo dos poços foram avaliados os biofilmes formados

a distância dos corpos de prova, porém sob a ação dos componentes liberados do CIV. Após incubação das placas por 48h à 37° C em estufa de CO<sub>2</sub>, os espécimes de CIV foram removidos e os poços contendo o biofilme formado foram lavados suavemente com solução salina de tampão fosfato (PBS), e depois corados com solução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl - Sigma-Aldrich). A placa então foi incubada por 3h a 37 C e, após esse tempo, 200µl da suspensão de cada poço foram removidos e inseridos em placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro, considerando a densidade ótica de 490nm.

**Figura 1 - Esquema demonstrando o preparo de cada poço (placas de 24 poços) para os ensaios de biofilme.**



Fonte: autor

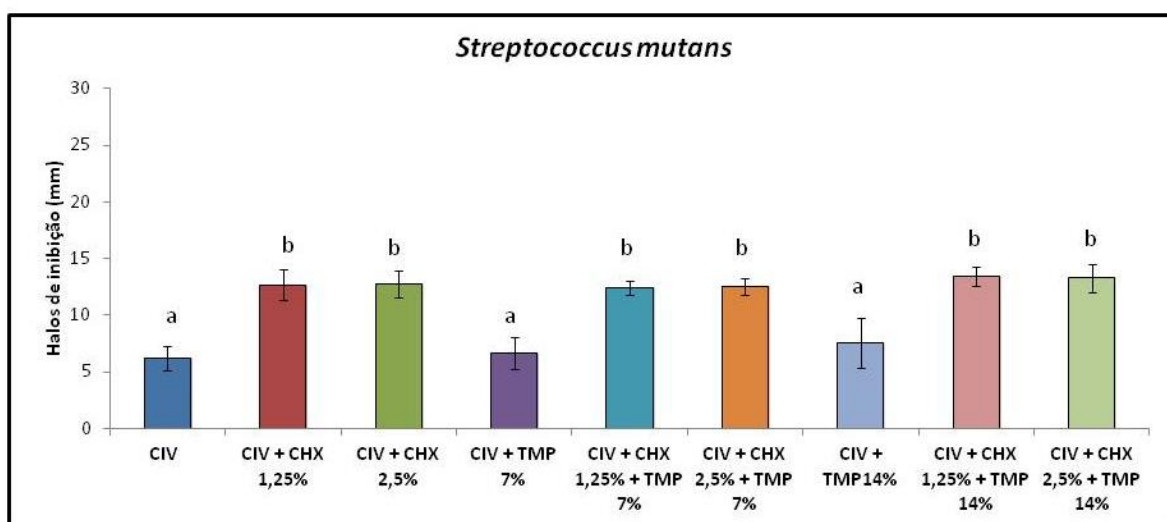
### 3.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à sua distribuição (Kolmogorov–Smirnov) e homocedasticidade (Teste de Cochran). Os resultados obtidos nos testes de difusão em ágar foram submetidos à análise de variância (2-way ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados dos ensaios de biofilme, devido à sua distribuição não paramétrica, foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O SPSS versão 17.1 foi utilizado para as análises estatísticas, considerando nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste de difusão em ágar

Houve aumento significativo na ação inibitória em ágar do CIV quando incorporada CHX, independente da concentração (1,25 ou 2,5%). A presença de TMP, nas concentrações 7 ou 14%, não comprometeu a ação antimicrobiana da clorexidina. TMP não teve ação antimicrobiana quando incorporado isoladamente no CIV, no teste de difusão em ágar.



**Figura 2 - Médias (desvios-padrão - barras) das medidas dos halos de inibição (mm) obtidos para os grupos de cimentos de ionômero de vidro contra *Streptococcus mutans*.**

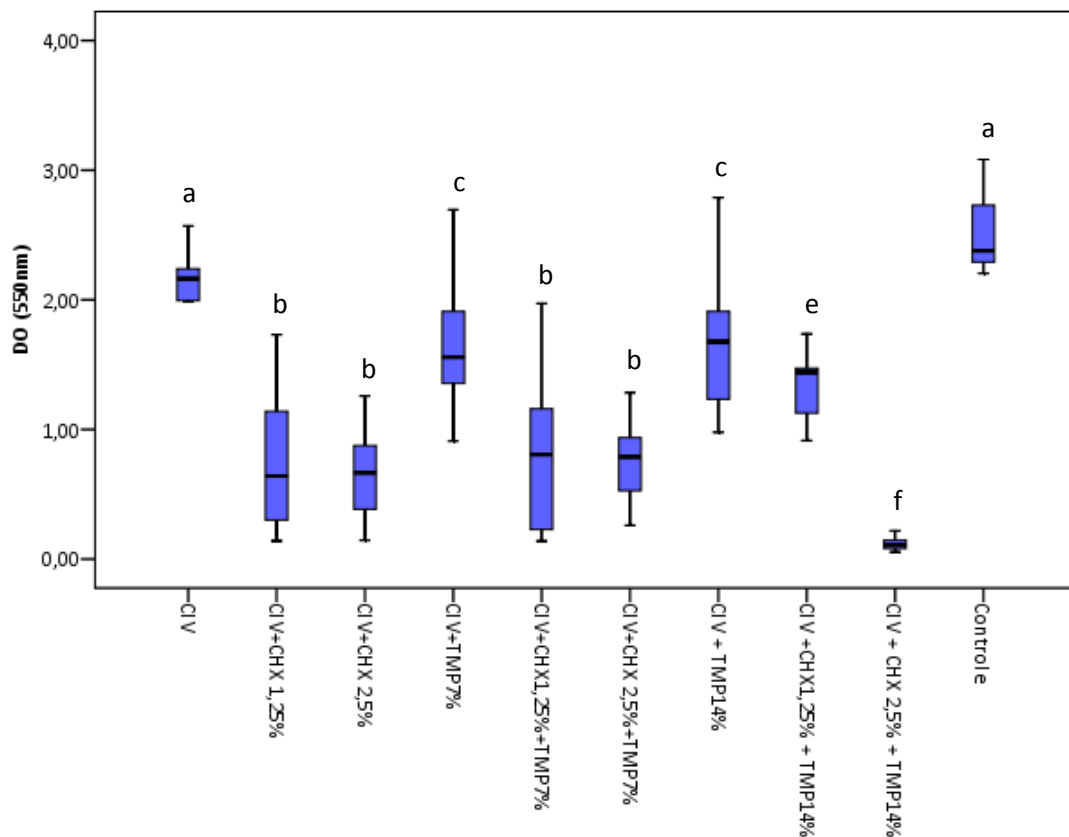
<sup>a</sup>Letras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes ANOVA/Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Silva et al., 2015

### 4.3 Ensaios de biofilme

A Figura 3 mostra os resultados obtidos nos ensaios de biofilme de *S. mutans*. Nota-se que houve um aumento significativo na ação antibiofilme dos CIV quando adicionada CHX ou CHX e TMP. A associação de CIV com TMP 7% e com CHX 1.25% ou CHX 2,5% teve o mesmo desempenho antibiofilme que a associação

de CIV somente com CHX, em ambas as concentrações. Houve um aumento crescente na ação antibiofilme do CIV associado ao TMP 14% com o aumento da concentração da CHX. Assim, a melhor ação antibiofilme foi para a associação CIV + CHX 2,5% + TMP 14%.



**Figura 3 - Box plot mostrando a ação dos cimentos de ionômero de vidro contra biofilme de *S. mutans*.**

<sup>a</sup>Letras distintas mostram a diferença estatística entre os grupos avaliados, segundo os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ( $p \leq 0,05$ ).

\* As barras indicam os valores mínimos e máximos. As caixas indicam os quartis 25 e 75. Linhas no meio são as medianas.

Fonte: autor

## 5 DISCUSSÃO

A cárie dentária é uma das doenças infecciosas orais mais prevalentes no mundo. Ela é uma doença multifatorial, causada não somente pelas bactérias, mas também pelo consumo de alimentos e da susceptibilidade do hospedeiro. A formação de biofilmes dentários, que pode se iniciar com espécies de estreptococos, desempenha um papel muito importante no desenvolvimento da cárie (HU et al., 2013). Estudos têm relatado que a formação de biofilme estável é um dos principais fatores envolvidos na patogênese dessa doença. As bactérias cariogênicas que formam biofilmes produzem ácidos que levam à desmineralização do tecido duro dos dentes e *S. mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie. Esta espécie pode metabolizar diversos carboidratos para aderir à superfície dos dentes, formando os biofilmes. (HU et al., 2013).

Sabe-se que uma das principais causas de falhas nas restaurações com material adesivo, incluindo aquelas com cimento de ionômero de vidro, são lesões de cáries recorrentes. Em procedimentos de remoção parcial de tecido cariado, bactérias remanescentes poderiam sobreviver e dar continuidade ao processo carioso (KEMOLI; VAN AMERONGEN, 2011). Assim, muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de inserir agentes antimicrobianos em materiais restauradores, com destaque à inserção de clorexidina em cimentos de ionômero de vidro (BOTELHO, 2004; CASTILHO et al., 2013; PALMER et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2006; TURKUN et al., 2008).

O presente estudo mostrou que a adição de clorexidina aumentou a atividade inibitória do cimento de ionômero de vidro frente a microrganismos relacionados com o processo de cárie, como *S. mutans*. Não houve diferença entre as concentrações testadas quanto à atividade antimicrobiana, considerando o teste de difusão em ágar, demonstrando que a incorporação de 1,25% no cimento de ionômero de vidro teve o efeito esperado, pelo menos, em curto prazo (24h). É interessante a utilização de concentração mais baixa da clorexidina, porém com mesma ação antimicrobiana, pelo seu potencial citotóxico (CASTILHO et al., 2013; LESSA et al., 2010), além da possível influência nas propriedades mecânicas do cimento quando em maior concentração (MARTI et al., 2014; TURKUN et al., 2008). Estudo realizado por Silva

et al. (2015) demonstraram que a associação de cimento de ionômero de vidro à 1,25% de clorexidina causou mínimo prejuízo às propriedades mecânicas avaliadas (compressão, tração diametral e dureza superficial), entretanto, na concentração a 2,5%, a clorexidina ocasionou alterações na resistência à compressão e na dureza do material.

O trimetafosfato de sódio (TMP) é um polifosfato cíclico, que mostrou ser capaz de reduzir a desmineralização do esmalte (DANELON et al., 2014; TAKESHITA et al., 2009, 2011). Alguns estudos têm adicionado o TMP em dentifrícios (STADTLER et al., 1996; TAKESHITA et al., 2009), onde demonstrou grande capacidade em aumentar o potencial anticárie do fluoreto (DANELON et al., 2014; PANCOTE et al., 2014). Outros estudos têm incorporado esse fosfato a uma resina composta (TIVERON et al., 2013) demonstrando que, dentre as concentrações testadas, quem apresentou melhor efeito anticárie, foi a associação de resina com TMP 14,1%, relacionando uma maior capacidade do material em liberar flúor e TMP com pouca alteração na dureza da resina. O presente estudo foi realizado baseado no fato de não existirem informações publicadas sobre a ação antimicrobiana do TMP incorporado a um cimento de ionômero de vidro, bem como se este pode influenciar na ação antimicrobiana da clorexidina. Além disso, a incorporação de dois agentes simultâneos (clorexidina e TMP) no cimento de ionômero de vidro poderia suprimir a infecção residual e aumentar a longevidade das restaurações em abordagens minimamente invasivas. No presente estudo, foi verificado que a presença de TMP não interferiu na atividade antimicrobiana da clorexidina no teste de difusão, e no ensaio de biofilme notou-se um aumento significativo na ação antibiofilme dos CIV quando adicionada CHX ou TMP ou ambos os agentes. Esta diferença nos resultados dos testes antimicrobianos ocorre, pois o teste de difusão em ágar apresenta algumas limitações, como a dificuldade de alguns materiais em se difundir no ágar e se os dados obtidos refletem ação bactericida ou apenas efeitos bacteriostáticos (TOBIAS et al., 1985).

Cheng et al. (2012) verificaram efeito benéfico da associação de fosfato inorgânico e clorexidina em cimento de ionômero de vidro, reduzindo a formação de biofilme, a produção de ácido e o metabolismo bacteriano. Esses achados estão de acordo com nossos resultados, considerando o fato de que os próprios agentes

anticárie ( $\text{CaF}_2$  e ACP) e a metodologia empregada são diferentes da utilizada no presente estudo, incluindo testes mecânicos e outras análises microbiológicas. Neste presente estudo, optou-se pela utilização de nanopartículas de TMP com a intenção de reduzir a interferência da incorporação desse fosfato nas propriedades microbiológicas do CIV, como ocorreu em estudo desenvolvido com outro fosfato inorgânico, o hexametáfosfato, também em escala nanométrica associado com CHX que manteve a ação antimicrobiana de ambos os agentes. Nosso estudo não utilizou partículas reduzidas de clorexidina, como no estudo de CHENG et al. (2012), pois em estudo piloto não foi verificada diferença estatística entre as propriedades mecânicas e microbiológicas do CIV contendo CHX microparticulada ou não (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2015).

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que o cimento de ionômero de vidro associado com CHX 2,5% e TMP 14% apresentou os resultados antibiofilme mais promissores.

## REFERÊNCIAS

- Besic FC. The fate of bacteria sealed in dental cavities. *J Dent Res*. 1943;22(5):p.349-54.
- Botelho MG. Compressive strength of glass ionomer cements with dental antibacterial agents. *SADJ* 2004;59:51–3.
- Castilho AR, Duque C, Negrini TC, Sacono NT, Paula AB, Souza Costa CA, Spolidório DM, Puppim-Rontani RM. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent*. 2013;41(2):155-63.
- Caldeira MMP. In situ anticariogenic effect of conventional glass ionomer cement by dentifrice dependence [dissertação]. Campinas: Universidade de Campinas;. 2011
- Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dent Mater*. 2012;28(5):573-83.
- Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig*. 2014;18(4):1119-27.
- Duque C, Negrini TC, Hebling J, Spolidório DM. Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper Dent*. 2005;30(5):636-40.
- Forsten L. Fluoride release and uptake by glass-ionomers and related materials and its clinical effect. *Biomaterials*. 1998;19:503–8.
- Harris RS, Nizel AE, Walsh BN. The effect of phosphate structure on dental caries development in rats. *J Dent Res* 1967;46:290-4.
- Henry CA, Navia JM. Sodium trimetaphosphate influence on the early development of rat caries and concurrent microbial changes. *Caries Res*. 1969;3:326-38.

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;41(10):927-34

Jensen OE, Handelman SL. Effect of na autopolymerizing sealant on viability of microflora in occlusal dental caries. *J Dent Res*. 1980;88(5):382-8.

Kemoli AM, Van Amerongen WE. Effects of oral hygiene, residual caries and cervical marginal-gaps on the survival of proximal atraumatic restorative treatment approach restorations. *Contemp Clin Dent*. 2011;2(4):318–23.

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;106(4):381-6.

Lessa FC, Aranha AM, Nogueira I, Giro EM, Hebling J, Costa CA. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sc*. 2010;18:50–8.

Marti LM, Mata M, Ferraz-Santos B, Azevedo ER, Giro EMA, Zuanon CC. Addition of chlorhexidine gluconate to a glass ionomer cement: a study on mechanical, physical and antibacterial properties. *Braz Dent J*. 2014;25(1):33-7.

Martins LR, Lima Navarro MF, Francischone CE, Lovadino JR, Almeida JV. Glass ionomer cement and composite resin mixed restorations. *Rev Odontol Univ Sao Paulo*. 1988;2(4):229-32.

Ngo H. Glass-ionomer cements as restorative and preventive materials. *Dent Clin North Am*. 2010;54(3):551-63

Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials*. 2004;25:5423–31.

Pancote LP, Manarelli MM, Danelon M, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: in vitro study. *Arch Oral Biol*. 2014;59:336-40.

Silva DF, Silva MER, Paula AB, Sinhoreti MAC, Pedrini D, Delbem ACB, Duque C. Efeito da associação de micropartículas de clorexidina nas propriedades

microbiológicas e mecânicas de cimento de ionômero de vidro. *Braz Oral Res* 2014;28(1):476.

Silva MER. Influência da incorporação de nanopartículas de trimetafostato de sódio associado ou não à clorexidina nas propriedades microbiológicas, físico-mecânicas e de redução da desmineralização de cimento de ionômero de vidro. 2015. 84f. Dissertação. Mestre em Ciência Odontológica, Área de Saúde bucal da criança, Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Araçatuba, 2015.

Städtler P, Müller-Bruckschwaiger K, Schäfer F, Huntington E. The effect of sodium trimetaphosphate on caries: a 3-year clinical toothpaste trial. *Caries Res*. 1996;30:418-22.

Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater*. 2006;22:647-52.

Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res*. 2009;43(1):50-6.

Takeshita EM, Exterkate RAM, Delbem ACB, ten Cate JM. Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel De- and Remineralization in vitro. *Caries Res*. 2011;45:494-7.

Ten Cate JM, van Duinen RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *J Dent Res*. 1995;74:1266–71.

Tiveron ARF, Delbem, ACB, Gaban G, Sasaki KT, Pedrini D. Effect of resin composites with sodium trimetaphosphate with or without fluoride on hardness, ion release and enamel demineralization. *Am J Dent*. 2013;26:201-6.

Tobias RS, Browne RM, Wilson CA. Antibacterial activity of dental restorative materials *Int Endod J*. 1985;18(3) 161-171.

Türkün LS, Türkün 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):29-40.

Xie Z, Thompson A, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. A quantitative real-time RT-PCR assay for mature *C. albicans* biofilms. *BMC Microbiol*. 2011;11:93.