

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



Ana Carolina Becci de Souza

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

Araraquara

2017



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



Ana Carolina Becci de Souza

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

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

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

Araraquara

2017

Ana Carolina Becci de Souza

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

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor

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

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

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

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

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

Araraquara, 04 de Agosto de 2017

## Dados Curriculares

### Ana Carolina Becci de Souza

Nascimento	29/06/1987, Santos, SP
Filiação	Flávio José Becci Maria de Lourdes de Oliveira Becci
2006 - 2010	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr - UNESP
2011-2013	Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - UNESP
2013-2017	Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr - UNESP

## **DEDICATÓRIA**

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

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

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

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

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

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

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

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

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

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

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAR – UNESP, Angela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Fernanda Lourenção Brighenti, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pela convivência durante estes anos e pelos conhecimentos transmitidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mahatma Gandhi

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

## RESUMO

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

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

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

# SUMÁRIO

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

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Materiais restauradores e a ocorrência de cárie secundária**

A afirmativa de que a cárie secundária é a causa mais comum para a substituição de restaurações é consistente em múltiplos estudos sobre o desempenho clínico das restaurações dentárias publicados nas últimas décadas.

Embora os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) apresentem liberação de flúor, o efeito cariostático dos mesmos não havia sido demonstrado em um ensaio clínico controlado a longo prazo. Tyas<sup>64</sup> (1991) compararam o desempenho clínico de um CIV e uma resina composta durante cinco anos. Foram realizadas 67 restaurações classe V em resina e 65 em CIV. O forramento cavitário foi feito com cimento a base de hidróxido de cálcio em todas cavidades restauradas com resina composta e, em alguns casos, nas restauradas com CIV. Após 2-3 semanas, as restaurações foram fotografadas para avaliação da cor e da descoloração marginal, que foi feita em comparação a um conjunto padrão de fotografias. Os pacientes foram reexaminados anualmente, as restaurações foram fotografadas e tiveram as margens avaliadas com uma sonda exploradora para determinação do aparecimento de lesões cariosas secundárias. Os resultados indicaram que no quesito cárie secundária, não houve diferença significativa entre os materiais. Com relação à coloração marginal, não houve diferença significativa inicial entre os materiais. No entanto, nos anos subsequentes, o CIV apresentou as melhores taxas de conservação das restaurações. Por ser um estudo pioneiro a longo prazo, os autores sugeriram que os resultados obtidos estimulam o uso dos CIVs em restaurações de classe

V pois este material parece prevenir o desenvolvimento de lesões de cárie secundária, em comparação às resinas compostas.

Estudos *in situ* permitem uma melhor compreensão sobre a contribuição da liberação de flúor pelos materiais restauradores na prevenção de lesões de cárie secundárias. No entanto, podem apresentar diferenças importantes das condições *in vivo*, dentre elas: duração do experimento coincidente com a o período em que as maiores taxas de flúor são liberadas, ocorrendo assim maior atividade antibacteriana; blocos de esmalte e dentina utilizados não reproduzem a localização e relações anatômicas existentes *in vivo*; além do corte e polimento das estruturas dentárias induzirem a importantes alterações estruturais. Baseado nessas limitações dos estudos *in situ*, Papagiannoulis et al.<sup>51</sup> (2002) investigaram *in vivo* o potencial anticariogênico de um CIV convencional e uma resina composta empregando um modelo padronizado de *gap* interfacial. Os autores também tiveram como objetivo avaliar e validar um modelo de cárie artificial *in vitro*. Para a realização do estudo *in vitro*, cavidades limitadas ao esmalte foram preparadas na superfície vestibular de pré-molares extraídos. A parede oclusal das cavidades não recebeu nenhum tratamento e foi protegida com espaçador metálico de 40  $\mu\text{m}$  de espessura para a padronização do *gap* marginal. As cavidades foram restauradas com CIV ou resina composta e após 4 semanas de imersão em um gel ácido (pH 4) os dentes foram seccionados e examinados por microscopia de luz polarizada. Para o estudo *in vivo*, quatro voluntários com baixa atividade de cárie, possuindo os quatro primeiros pré-molares com indicação de extração por razões ortodônticas, participaram do estudo. As cavidades foram preparadas como já citado anteriormente e preenchidas

contralateralmente com CIV e resina composta. Após 6 meses, os dentes foram extraídos, seccionados e observados por microscopia de luz polarizada, microscopia Raman e microanálise de Raios X SEM-EDS. No estudo in vitro, foi constatado o desenvolvimento de lesões nas margens oclusal e cervical em todas as restaurações. Na região livre de *gap*, o CIV apresentou lesão de menores dimensões em comparação com a resina composta. Nas regiões com *gaps*, não foram encontradas diferenças significativas na profundidade das lesões entre os materiais restauradores testados, sendo o comprimento maior em comparação com as regiões sem o *gap* marginal. Já no estudo in vivo, nenhuma lesão foi observada em regiões sem o *gap* marginal. Nas regiões de *gap*, 75,5% das restaurações em CIV e 62,5% das restaurações em resina composta desenvolveram lesões. As dimensões das lesões foram significativamente maiores no CIV. Uma redução de fosfato, carbonato, cálcio e fósforo foi encontrada nessas lesões em comparação aos tecidos íntegros. Não foi detectado flúor ou fluoreto de cálcio nas margens do esmalte voltadas para o *gap* adjacente ao CIV e não houve correlação entre os modelos in vivo e in vitro utilizados no estudo. Os autores concluíram que os resultados dos estudos de cárie desenvolvida artificialmente devem ser interpretados sem qualquer extrapolação in vivo, uma vez que ainda não existem evidências que apoiem a relevância clínica destes testes.

Materiais restauradores que liberam flúor foram desenvolvidos com a intenção de fornecer este íon para locais específicos com risco a ocorrência de cárie secundária. No entanto, o efeito cariostático dos CIVs sobre as lesões de cárie secundárias não foi comprovado em estudos clínicos, sugerindo que as restaurações com materiais contendo flúor não poderiam prevenir a cárie

secundária in vivo. Hara et al.<sup>27</sup> (2006) testaram a hipótese de que as restaurações em CIV, envelhecidas ou não, não preveniriam a cárie secundária na raiz, mesmo quando o dentifrício fluoretado era utilizado. Neste estudo crossover, dezesseis voluntários utilizaram dispositivos palatinos em duas fases de 14 dias. Em cada fase, foram colocados nos dispositivos espécimes de dentina radicular bovina restaurados com CIV ou resina composta. Os espécimes foram expostos ao desafio cariogênico (solução de sacarose 20%) 4 vezes ao dia e ao dentifrício fluoretado 3 vezes ao dia. O conteúdo de flúor no biofilme formado sobre os espécimes e a perda mineral ao redor das restaurações foram analisados. Os autores constataram que não houve diferenças significativas entre os materiais restauradores em relação ao conteúdo de flúor no biofilme e a perda mineral ao redor das restaurações, independente dos espécimes terem sido envelhecidos ou não. Segundo os pesquisadores o CIV não foi necessário para prevenir lesões de cárie secundárias na dentina radicular quando o dentifrício fluoretado foi usado com frequência. Embora já tenha sido demonstrado que o uso de dentifrício fluoretado pode inibir a cárie radicular, nenhuma evidência clínica desse efeito na prevenção de cárie secundária havia sido observada anteriormente. Dessa forma, a escolha do material restaurador para as lesões radiculares não deve ser guiada pelo seu suposto potencial antibacteriano, quando outras fontes de flúor são usadas. Devem ser consideradas as propriedades mecânicas e adesivas, bem como as características superficiais e estéticas destes materiais.

Outro fator fortemente associado ao desenvolvimento de lesões de cárie secundária é a microinfiltração marginal, sendo o volume e a cariogenicidade do biofilme formado ao redor das restaurações parcialmente relacionados às

propriedades do material restaurador. Lai et al.<sup>39</sup> (2013) avaliaram a capacidade anticariogênica e a integridade marginal de 3 materiais restauradores usando um modelo in vitro de desenvolvimento de cárie. Cavidades de classe II foram preparadas em 60 pré molares não cariados extraídos. Estes dentes foram divididos em três grupos e restaurados com amálgama, CIV e resina composta. Após termociclagem e esterilização, os dentes foram suspensos em meio cariogênico durante 10 dias. Dez dentes de cada grupo foram utilizados para a avaliação das bactérias existentes nas margens da restauração. Em uma segunda etapa, os mesmos dentes selecionados para a avaliação das bactérias foram utilizados para a avaliação quantitativa da microinfiltração pela imersão em azul de metileno. Por fim, foi realizada uma avaliação quantitativa do tecido dentário desmineralizado ao redor da restauração nos outros 10 dentes de cada grupo. A desmineralização do tecido dentário ao redor da restauração foi classificada como: lesão artificial externa, lesão artificial em parede de esmalte, lesão artificial em parede de dentina. Os pesquisadores não observaram diferenças significativas na contagem de bactérias ao redor das restaurações dos três materiais. A microinfiltração marginal nas restaurações de amálgama foi menor do que nas restaurações de CIV e resina composta. A profundidade das lesões externas em esmalte ao redor do CIV foram as menores e as lesões em parede dentinária foram menores no grupo com restaurações de amálgama. Neste estudo, assim como em vários outros, os benefícios do material restaurador com liberação de flúor não foram completamente demonstrados, pois o efeito antibacteriano na dentina é obtido apenas quando a liberação de flúor é grande. Além disso, como as restaurações foram armazenadas em solução cariogênica durante todo o estudo, a quantidade de flúor liberado pelo

CIV foi relativamente baixa para proteger os tecidos dentários do ácido. Não só a liberação de flúor, mas também vários fatores como a rugosidade e hidrofobicidade dos materiais restauradores, bem como o fluxo de saliva e a higiene bucal podem influenciar a formação do biofilme dental.

O desenvolvimento de lesões de cárie secundárias em torno de qualquer material restaurador é determinado por suas propriedades físico-químicas e capacidade de selamento da cavidade. Assim, a capacidade de um material prevenir a microinfiltração marginal e lesões de cárie secundárias determina em grande parte o êxito ou falha da restauração. Conseqüentemente, uma maior ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de materiais com propriedades anticariogênicas como os cimentos de ionômero de vidro. Naik et al.<sup>46</sup> (2017) avaliaram a formação de lesões de cárie secundárias em torno de materiais fotopolimerizáveis que liberam flúor, com propriedades físico-mecânicas melhoradas. Cavidades de Classe V padronizadas foram preparadas nas superfícies vestibular e lingual de quarenta pré-molares extraídos. Os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de dez e restaurados com um dos seguintes materiais: Fuji II LC e Vitremer (CIVs modificados por resina), F-2000 (compômero) e Z-100 (resina composta, controle), foram termociclados e imersos em frascos contendo gel ácido para formação de lesões semelhantes a cárie. Após 15 semanas, as amostras foram removidas, lavadas e seccionadas em uma espessura de 80-100  $\mu\text{m}$  as quais foram montadas em lâminas e examinadas, medidas e fotografadas em microscópio. Os resultados obtidos demonstraram que a profundidade da lesão externa nos dentes restaurados com Z-100 foi significativamente maior que os dentes restaurados com F-2000, Vitremer e Fuji II LC.

A profundidade da lesão externa se mostrou significativamente maior nos dentes restaurados com F-2000 do que nos dentes restaurados com Vitremer e Fuji II LC, e não houve diferenças entre estes dois grupos. Nenhuma lesão na parede das cavidades foi observada nos dentes restaurados com Vitremer e Fuji II LC. O comprimento e a profundidade das lesões nas paredes das cavidades nos dentes restaurados com Z-100 foram significativamente maiores do que nos dentes restaurados com F-2000. Portanto, os CIVs modificados por resina exibiram proteção contra a formação de lesões secundárias no esmalte da parede da cavidade e a extensão da lesão externa também foi reduzida significativamente o que pode ser atribuído ao flúor liberado do material, captação deste flúor pelo esmalte/dentina ou uma menor infiltração marginal.

## **2.2 Cimentos de ionômero de vidro associados a agentes antibacterianos**

Embora os CIVs apresentem a propriedade de liberação de flúor, evidências clínicas a respeito de sua efetividade antibacteriana a longo prazo são inconclusivas. A fim de desenvolver um material que ofereça proteção duradoura contra o desenvolvimento de lesões de cárie secundárias, diversos agentes antibacterianos têm sido associados aos CIVs, sendo a clorexidina (CLX) o mais estudado.

Jedrychowski et al.<sup>34</sup> (1983) foram os pioneiros, fazendo a associação do gluconato ou dicloridrato de CLX à uma resina composta e um CIV nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 5% e 10% em massa. Após a confecção dos espécimes, realizaram ensaios de resistência à compressão, resistência à tração e ao cisalhamento para avaliar a força de união entre o material restaurador e o

esmalte dentário. A atividade antibacteriana foi observada pelo teste de difusão em ágar contra cepas de *S. viridans*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. coli*. Os resultados mostraram que a adição dos agentes antibacterianos aumentou a atividade antibacteriana da resina composta e do CIV contra as cepas testadas. Entretanto, as propriedades mecânicas dos materiais foram afetadas, tendo a adição do dicloridrato de CLX resultado em propriedades mecânicas mais próximas do grupo controle, sem adição de antibacterianos.

Ribeiro e Ericson<sup>52</sup> (1991) relataram que os CIVs possuem alguma atividade antibacteriana, relacionada principalmente à liberação de flúor e ao baixo pH inicial. Com o intuito de potencializar esta ação antibacteriana, os pesquisadores avaliaram o efeito da adição de diacetato ou digluconato de clorexidina em diferentes concentrações aos CIVs. Foram utilizados dois tipos de CIV: um de cimentação (Aqua Cem) e um restaurador (Chem Fil II). Solução aquosa de digluconato de CLX foi adicionada aos CIVs em concentrações que variaram de 0 a 10,3% e a avaliação antibacteriana foi feita em cultura de *S. mutans* em caldo. Em uma segunda etapa, digluconato e diacetato foram associados aos CIVs de cimentação e restauração em várias concentrações e a atividade antibacteriana foi avaliada, pelo método de difusão em ágar contra os microrganismos *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei*. Por fim foi avaliada a liberação de CLX por espectrofotometria a 251 nm para as amostras contendo diacetato e 253 nm para as contendo digluconato, após imersão dos espécimes em água destilada por 42 a 48 dias. No ensaio realizado em caldo de cultura, quanto maior a concentração de CLX na mistura, maior o tempo do efeito antibacteriano sobre *S. mutans* e maior a tendência de deterioração do material. Ambos os cimentos sem adição de CLX não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Os

testes de difusão de ágar revelaram que a inibição bacteriana apresentou comportamento dose-dependente. As cepas bacterianas testadas foram inibidas de forma semelhante e as propriedades antibacterianas diminuíram com o tempo. Neste teste, os grupos sem adição de CLX apresentaram halo de inibição. A diferença de comportamento dos grupos sem adição da CLX em ambos testes foi explicada devido à uma maior diluição dos compostos liberados dos cimentos para o caldo. Além disso, uma pequena quantidade da CLX adicionada foi liberada de forma dose-dependente, o que segundo os autores se deve ao fato da CLX ter se combinado a outros componentes do CIV e formado sais insolúveis.

Sanders et al.<sup>54</sup> (2002) tiveram como objetivo determinar o efeito da adição de diacetato de CLX nas propriedades físicas e antimicrobianas de um CIV modificado por resina. As cápsulas do CIV modificados por resina foram abertas e o conteúdo foi misturado a diacetato de CLX 5%. Foram realizadas análises de dureza, resistência à tração diametral e erosão após 24 horas e 6 semanas de armazenamento dos espécimes em água destilada a 37°C. Para a determinação dos níveis de liberação de CLX os espécimes foram imersos em solução salina e armazenados em estufa a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> durante 6 semanas. A atividade antimicrobiana após 6 semanas foi testada contra cepas de *S.mutans*. O teste de dureza demonstrou que em 24 horas não houve diferença entre o grupo contendo CLX e o grupo controle, porém o grupo controle apresentou valores de dureza significativamente maiores após seis meses. Na avaliação de resistência à tração diametral não houve diferença entre os grupos nos períodos de 24 horas e 6 meses. A erosão se mostrou significativamente menor no grupo contendo CLX após 24 horas, porém, após 6 meses a erosão

deste grupo foi significativamente maior do que a do grupo controle. Houve um pico de liberação de CLX na primeira semana, sendo que quantidades residuais foram liberadas na segunda e terceira semanas. A avaliação da atividade antimicrobiana demonstrou que houve redução no número de *S.mutans* por até 3 semanas, mas depois disso não houve diferença entre os grupos. A redução da atividade antimicrobiana foi correspondente à redução da quantidade de CLX disponível. Esta redução pode ser explicada devido à eluição do material ou pela formação de sais insolúveis com o CIV.

Botelho.<sup>10</sup> (2003) enfatizaram os benefícios da associação de agentes antibacterianos aos CIVs, uma vez que sua ação antimicrobiana em casos de remoção parcial de cárie tem sido questionada. Possíveis microinfiltrações, limitações associadas às suas propriedades físicas e a constatação de que microrganismos podem se manter viáveis por até 2 anos sob as restaurações de CIV, são as causas que justificam a necessidade de um maior potencial antimicrobiano destes materiais. Neste estudo, os autores investigaram os efeitos da associação de quatro agentes antibacterianos incorporados a um CIV convencional sobre bactérias relacionadas a cárie dental. Os agentes antibacterianos: cloridrato de clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, cetrimida e cloreto de benzalcônio foram adicionados ao FUJI IX nas concentrações de 1%, 2% e 4%. O CIV sem adição de agentes antibacterianos foi utilizado como controle. O teste de difusão em ágar foi realizado utilizando as espécies: *S. salivarius*, *S. mutans*, *L.casei*, *L. acidophilus*, *A. odontolyticus*, *A. naeslundii*. Os halos de inibição formados foram observados após 24 h de incubação. Os procedimentos metodológicos foram repetidos semanalmente até a 11ª semana, quando as superfícies das amostras foram lixadas previamente à colocação nas

placas de ágar. Este procedimento não foi realizado para simular o desgaste clínico da restauração e sim para examinar se a ação antibacteriana foi efeito da liberação superficial ou profunda. Os espécimes do grupo controle não demonstraram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. Os espécimes com associação de agentes antibacterianos demonstraram efeito inibitório significativo dose-dependente que diminuiu ao longo do período experimental. O lixamento da superfície dos espécimes resultou em grande aumento da ação antibacteriana, similar a primeira semana. O CIV contendo cetrimida mostrou o maior efeito inibitório durante o período experimental para 4 das 6 bactérias testadas. Os autores admitem que diversas falhas estão relacionadas ao teste de difusão em ágar, uma vez que este teste não fornece nenhuma informação sobre a viabilidade dos microrganismos, e os resultados apresentados em seu estudo apenas confirmam resultados de trabalhos anteriores.

Os CIVs podem ser utilizados para a liberação lenta de espécies ativas como o flúor e diversos agentes antibacterianos. Palmer et al.<sup>50</sup> (2004) investigaram a liberação de CLX de um CIV modificado por diacetato de CLX em concentrações que variaram de 0,5% a 13,0% em massa. A liberação em água foi examinada usando cromatografia líquida de alta performance. A maior parte da clorexidina mensurável foi liberada durante os primeiros 20 dias, no entanto, a quantidade total liberada foi inferior a 10% da quantidade incorporada aos espécimes. A liberação apresentou comportamento dose-dependente, mas a maior parte da CLX foi mantida no cimento. Para explorar o efeito da associação de CLX nas propriedades do CIV, a resistência a compressão, o tempo de trabalho e de presa também foram analisados. Em geral, a resistência a compressão diminuiu de acordo com a proporção de CLX adicionada, enquanto

que os tempos de trabalho e de presa aumentaram. Embora em pequena quantidade, os autores concluíram que a CLX pode ser incorporada e posteriormente liberada dos CIVs, sendo esta liberação prolongada de acordo com a concentração de CLX associada ao material.

No ano de 2006, Takahashi et al.<sup>58</sup> tiveram como objetivo encontrar a concentração ótima do agente antibacteriano a ser associado a um CIV comumente utilizado na técnica do tratamento restaurador atraumático (TRA). Os autores descrevem o TRA como uma técnica de mínima intervenção na qual os tecidos dentários desmineralizados são removidos com o auxílio de instrumentos manuais e a cavidade é restaurada com um material adesivo, geralmente o CIV. A taxa de incidência de cárie secundária em dentições permanentes quando utilizada esta técnica foi reportada como sendo de 1,5 a 2,4% e por isso aumentar a eficácia antibacteriana destes cimentos seria de grande relevância. O diacetato de CLX foi associado ao CIV nas concentrações de 1%, 2% e 3% e também na combinação diacetato 1% + dicloridrato 1% e diacetato 2% + dicloridrato 2%. Espécimes sem adição do agente antibacteriano foram utilizados como controle. A atividade antimicrobiana foi testada pelo teste de difusão em ágar contra cepas de *S. mutans*, *L. casei* e *A. naeslundii*. A liberação de CLX foi avaliada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) após a imersão dos espécimes em água destilada por 24 horas a 37°C. A resistência à compressão foi avaliada de acordo com a ISO 9917 após a armazenagem dos espécimes em água destilada durante 24 horas ou 7 dias. Foi analisado também o tempo de presa e a resistência de união à dentina sadia pelo teste de tração após armazenagem dos espécimes por 24 horas a 37°C em 100% de umidade. Os espécimes do grupo controle não produziram halo de

inibição. Todos os outros grupos exibiram inibição das três bactérias porém os tamanhos das áreas de inibição não foram dependentes da concentração do agente antimicrobiano. A liberação de CLX também não foi dependente da concentração associada ao CIV. A incorporação de 2% ou mais reduziu significativamente a resistência a compressão, e o tempo de presa se estendeu um pouco em todos os grupos contendo CLX. Já a resistência de união à dentina se mostrou menor nos grupos contendo 2% ou mais, porém não houve diferença nos grupos contendo 1% com relação ao controle. Concluíram que a adição de diacetato de CLX 1% melhorou a atividade antimicrobiana sem afetar diretamente as outras propriedades do CIV, sendo o CIV modificado com CLX 1% um material promissor para o uso em TRA.

Frencken et al.<sup>22</sup> (2007) conduziram um estudo piloto in vivo para avaliar os efeitos da adição de diacetato de CLX em um CIV. Foram selecionadas 50 crianças de 6 a 11 anos com pelo menos uma cavidade extensa em superfícies oclusais de diferentes quadrantes em dentes decíduos ou permanentes. As paredes de contorno da cavidade foram limpas com instrumento manual estéril. Para avaliar o efeito do material experimental, o assoalho da cavidade foi dividido em duas partes. Na parte mesial foi coletada uma amostra de dentina infectada, na distal, a dentina infectada foi removida e uma amostra de dentina afetada foi coletada. As cavidades foram então restauradas com um CIV convencional contendo CLX 1% ou apenas o CIV (controle). Decorridos 7 dias, as restaurações foram removidas e outra amostra de dentina foi coletada. As amostras foram processadas, cultivadas e foi feita a contagem de *S. mutans*, *Lactobacillus* e bactérias totais. Sete dias após o tratamento, houve diminuição significativa na contagem de bactérias.

No grupo experimental houve menor contagem de *Lactobacillus* e de bactérias totais, mas não de *S.mutans*. Na dentina infectada, observou-se redução significativa de *Lactobacillus* quando foi utilizado o tratamento com o CIV contendo CLX. Na dentina afetada, *S. mutans*, *Lactobacillus* e bactérias totais viáveis foram significativamente menores 7 dias após o tratamento, no grupo contendo CLX. Estes resultados demonstraram que as variáveis microbiológicas foram claramente associadas ao tipo de dentina, material utilizado e tempo de tratamento. A diferença na redução de microrganismos entre o grupo controle e o grupo CIV associado a CLX 1% justifica mais estudos com acompanhamento a longo prazo.

Hoszek e Ericson<sup>33</sup> (2008) reiteram em seu estudo a importância da CLX como um agente efetivo e seguro na redução dos microrganismos bucais, principalmente o *S. mutans*. De acordo com os autores, a CLX é retida nas estruturas bucais e liberada lentamente, razão pela qual o seu efeito antibacteriano é prolongado. Neste estudo o objetivo foi avaliar a liberação de flúor e a ação antibacteriana in vitro de um CIV após a adição de gluconato de CLX 10% ou da associação de CLX 10% com ácido tartárico 11%. Após a presa, os espécimes foram imersos em 10 mL de água deionizada e transferidos para novos frascos nos períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas, e depois 4, 10, 15, 20 e 30 dias, mantidos a 37°C. A efetividade antibacteriana contra cepas de *S. mutans* foi avaliada pelo teste de difusão em ágar em três períodos: imediatamente após a presa, após 2 horas e 60 dias de armazenagem. Foi observado que a liberação diária média de flúor diminuiu rapidamente nos primeiros dias, estabilizou após 10 dias e diminuiu lentamente até os 60 dias. Após 60 dias, a liberação média de flúor acumulada no grupo contendo CLX foi cerca de 27% menor quando

comparada ao grupo CIV e 30% menor no grupo contendo CLX + ácido tartárico. Segundo os autores isto pode ser explicado pela interação entre o íon flúor e a CLX, que resulta na precipitação de sais com menor solubilidade, deixando o flúor menos disponível. Já o teste da atividade antibacteriana mostrou que no início não houve diferenças na inibição bacteriana entre os grupos. No entanto, após 2 horas e 60 dias, o grupo contendo CLX + ácido tartárico determinou menor inibição bacteriana. Este achado pode ter ocorrido devido à uma possível interação entre o cátion divalente da CLX e os grupos carboxílicos do ácido. Concluíram que a adição dos agentes testados pode melhorar as propriedades antibacterianas do CIV embora reduza a liberação de flúor.

Neste mesmo ano, Türkun et al.<sup>62</sup> (2008), avaliaram o efeito antibacteriano a longo prazo e as propriedades físicas de um CIV associado ao diacetato ou digluconato de CLX. O CIV sem adição de antibacterianos foi utilizado como controle. A CLX foi associada ao CIV nas concentrações de 0,5%, 1,25% e 2,5%. O tempo de presa, a resistência à compressão e a erosão ácida foram testados de acordo com a norma ISO 9917-1. O tempo de trabalho, a dureza, a resistência à tração diametral e a resistência à flexão biaxial também foram determinados. A atividade antimicrobiana a longo prazo contra *S. mutans*, *L. acidophilus* e *C. albicans* foi testada pelo método de difusão em ágar. Com relação ao efeito antibacteriano imediato para *S. mutans*, todos os grupos testados mostraram inibição em comparação com o grupo controle, com efeito dose-dependente. Para *L. acidophilus*, todos os grupos foram efetivos em comparação ao controle, mas o maior efeito antibacteriano foi observado com diacetato de CLX 2,5%. O grupo diacetato de CLX 2,5% apresentou atividade antibacteriana até 90 dias contra *S. mutans* e até 60 dias contra *L. acidophilus*. O tempo de trabalho e de

presa, teste de erosão ácida, resistência à tração diametral e resistência à flexão biaxial dos grupos testados não foram diferentes do grupo controle. No entanto, os grupos diacetato de CLX 1,25% e 2,5% apresentaram resistência à compressão significativamente menor do que o grupo controle. Valores de dureza inferiores foram obtidos com os grupos digluconato de CLX 0,5% e 2,5% em comparação ao grupo controle. Concluíram que tanto o diacetato quanto o digluconato de CLX, adicionados ao CIV em determinadas concentrações, exibiram efeitos antibacterianos a longo prazo contra *S. mutans* e *L. acidophilus* sem comprometer as propriedades físicas do material.

Tüzüner et al.<sup>63</sup> (2011) salientam que o TRA é uma técnica utilizada principalmente em países subdesenvolvidos onde faltam eletricidade e equipamentos odontológicos ou em casos envolvendo crianças muito pequenas, a fim de reduzir os níveis de ansiedade e estresse. Nessas condições, é improvável que as bactérias sejam eliminadas adequadamente acarretando o desenvolvimento de lesões de cárie sob as restaurações e consequente falhas nas mesmas. Assim, a associação de agentes antibacterianos aos CIVs é vista como uma alternativa para solucionar este problema. Neste estudo o objetivo foi avaliar a atividade antibacteriana, a dureza de superfície e os padrões de liberação de flúor de dois CIVs convencionais contendo misturas de diacetato de CLX e cetrimida. Os CIVs Fuji IX e Ketac Molar foram utilizados como controle. A mistura de diacetato de CLX 2,5% + cetrimida 2,5% foi incorporada ao pó dos CIVs. O efeito antibacteriano dos materiais modificados foi avaliado pelo teste de difusão em ágar contra *S. mutans* e *L. casei* nos períodos de 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. A dureza Vickers foi testada após 24 horas de armazenagem dos espécimes 37°C. Por fim, foi avaliada a liberação cumulativa de flúor dos

espécimes após imersão em água destilada durante 1, 7, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que os grupos controle não exibiram halo de inibição contra as cepas testadas, e os grupos contendo CLX e cetrimida apresentaram efeito antibacteriano durante todo o período estudado. O Ketac Molar contendo agentes antibacterianos exibiu maiores halos de inibição contra *L. Casei* em todos períodos e contra *S. mutans* após 1, 7 e 60 dias. A dureza Vickers foi reduzida nos grupos contendo agentes antibacterianos, não havendo diferenças entre os dois grupos. O padrão de liberação cumulativa de flúor foi menor nos grupos contendo agentes antibacterianos, no entanto, diferenças não foram observadas entre estes grupos. Os autores citam as vantagens da associação da CLX ao CIV e explicam que seu uso em conjunto com a cetrimida seria interessante para resultar em uma maior eficácia antibacteriana também contra os *Lactobacillus*. Concluíram que a adição de diacetato de CLX + cetrimida na concentração final de 5% aos CIVs convencionais pode resultar em um efeito antibacteriano prolongado sem deteriorar gravemente a sua dureza superficial e liberação de flúor.

A fim de avaliar as propriedades antibacterianas, citotóxicas e mecânicas in vitro e a ação antimicrobiana in vivo de um CIV modificado por resina utilizado para forramento, de Castilho et al.<sup>14</sup> (2013) associaram 0,2%, 0,5%, 1,25% e 2,5% de digluconato de CLX a este material. A avaliação microbiológica consistiu em teste de difusão em ágar sobre bactérias cariogênicas por 24 h. O metabolismo das células odontoblásticas e as análises de morfologia mostraram os efeitos citotóxicos do CIV modificado após 24h. Os mesmos grupos foram submetidos aos testes de resistência à compressão e resistência à tração diametral. Para a análise in vivo o CIV foi associado à concentração de CLX com

melhores resultados nos testes *in vitro*. Foram selecionados 16 primeiros molares de 10 crianças com idade entre 4 e 9 anos. O tratamento pulpar indireto foi realizado em duas sessões pelo mesmo operador. As avaliações clínicas e microbiológicas foram realizadas antes e após 3 meses. O uso de digluconato de CLX 1,25% melhorou significativamente os efeitos antibacterianos do CIV modificado, sem causar quaisquer efeitos prejudiciais para as células odontoblásticas e em suas propriedades mecânicas. Esta combinação eliminou completamente os estreptococos mutans na avaliação após 3 meses. Os autores concluíram que a associação de CLX a um CIV de forramento abre uma nova perspectiva para a prevenção do surgimento de lesões de cárie residuais após o tratamento pulpar indireto.

Em estudo recente, Becci et al.<sup>8</sup> (2016) salientaram que as condições da microbiota do biofilme na cavidade bucal diferem das observadas *in vitro*. Diante deste princípio, tiveram como objetivo analisar a composição microbiológica e quantificar os polissacarídeos totais no biofilme formado *in situ* na superfície de um CIV, ao qual se adicionou diacetato de CLX em diferentes concentrações. O estudo foi conduzido em quatro fases de 7 dias cada com um intervalo de *washout* de 15 dias entre elas. Em cada fase, oito voluntários usaram aparelhos palatinos contendo quatro espécimes confeccionados com o mesmo material: CIV (controle), CIV contendo diacetato de CLX 0,5%, 1% e 2%. Os biofilmes foram coletados, resuspensores em solução fosfatada salina, diluídos e foi feita a inoculação em placas contendo meios específicos para o crescimento de microrganismos totais; estreptococos totais; *S. mutans* e *Lactobacillus*. As placas foram incubadas a 37 °C sob condições de microaerofilia durante 24 e 48 horas, de acordo com o microrganismo. Em seguida, foi feita a contagem do número de

unidades formadoras de colônias com o auxílio de um contador de colônias. Para a dosagem de polissacarídeos totais, os biofilmes foram resuspenso em solução fosfatada salina, centrifugados e o sobrenadante foi filtrado e usado para a quantificação pelo método fenol-sulfúrico. Os resultados das contagens de microrganismos mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos apenas para lactobacilos, que foram significativamente maiores para o grupo CIV contendo CLX 2%. Uma possível explicação para tal fato é que as moléculas catiônicas da CLX reagiram com componentes do CIV, como fosfatos, silicatos e flúor, resultando na precipitação de sais de baixa solubilidade. Esta precipitação pode ter diminuído a disponibilidade de flúor e CLX reduzindo os efeitos antimicrobianos. Já a concentração de polissacarídeos totais no biofilme foi menor nos grupos contendo CLX 1% e 2%. Uma menor quantidade de polissacarídeos pode ser indicativa de que a patogenicidade do *S. mutans* seja diminuída pela redução de sua capacidade de adesão. Outros estudos foram sugeridos para otimizar a adição de CLX aos CIVs e melhorar a sua liberação, tendo o cuidado de usar modelos que proporcionam condições mais próximas da realidade clínica.

### **2.3 Desenvolvimento de nanopartículas de clorexidina**

A clorexidina (CLX) é um fármaco que possui amplo espectro de ação sem apresentar uma real resistência antimicrobiana, o que a difere dos antibióticos. Por esta razão, é um dos agentes mais pesquisados para o desenvolvimento de materiais e dispositivos com propriedades antimicrobianas.

Lboutounne et al.<sup>41</sup> (2002) foram os primeiros pesquisadores a desenvolverem um novo material similar às nanopartículas de CLX utilizadas neste estudo. Estes autores investigaram a atividade bactericida de nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (um poliéster biodegradável) contendo CLX contra várias cepas bacterianas hospitalares (in vitro) e contra *Staphylococcus epidermidis* (ex vivo). Segundo os autores, o uso das nanocápsulas foi sugerido principalmente por permitirem uma liberação contínua do fármaco. Para avaliar a atividade antimicrobiana in vitro, foram utilizadas nanocápsulas carregadas com 0,15% de CLX, nanocápsulas sem CLX e solução aquosa de digluconato de CLX 0,15%. Foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) contra as cepas *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. O teste ex vivo foi realizado em pele da orelha de porco contra *S. epidermidis* nos tempos de 8 e 12 horas. Para este teste foram utilizadas nanocápsulas contendo CLX 0,6%, nanocápsulas sem clorexidina imersas em hidrogel e solução aquosa de digluconato de CLX 1%. Foram avaliadas também a absorção de CLX no extrato córneo e a localização das nanocápsulas nas estruturas da pele. Os resultados mostraram que as nanocápsulas contendo CLX exibiram MICs similares ao digluconato e para a cepa *E. faecalis* os valores de MIC foram superiores. Na avaliação ex vivo houve redução significativa no número de colônias no grupo das nanocápsulas contendo CLX em relação ao digluconato após 8 horas de contaminação artificial, porém após 12 horas não houve redução para ambas as formulações. A análise do extrato córneo mostrou que houve uma quantidade de CLX residual três vezes maior quando utilizadas as nanocápsulas. Sendo assim os autores

concluíram que uma liberação estendida de CLX a partir das nanocápsulas propiciou o contato mais direto e prolongado entre estas e as bactérias, a superfície e os folículos da pele, levando a uma atividade antimicrobiana tópica *ex vivo* prolongada contra *S. epidermidis*.

Barbour et al.<sup>5</sup> (2013) inovaram ao realizar a síntese e caracterização de nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP). Neste estudo, os pesquisadores observaram os perfis de eluição da CLX, sua distribuição, estrutura e eficácia antimicrobiana. O preparo das nanopartículas se deu pela mistura de solução aquosa de digluconato de CLX e hexametáfosfato de sódio na concentração final de 5 mmol L<sup>-1</sup> e 0.5 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O potencial zeta e o tamanho das partículas foram analisados por espalhamento de luz dinâmico. Espécimes de vidro, curativo elastomérico e titânio foram cobertos com as nanopartículas e então observados por microscopia eletrônica de varredura. A eluição de CLX dos materiais funcionalizados com as nanopartículas foi observada durante 60 dias de imersão dos espécimes em água deionizada, por espectrofotometria ultravioleta. Foram realizados também os testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC) contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, contagem de células viáveis totais e análise da biomassa obtido pelo modelo de biofilme estático. Os autores constataram que as nanopartículas possuíam carga altamente negativa (-50 mV) e tamanho médio de 20-160 nm. As nanopartículas aderiram rapidamente aos espécimes de forma dose-dependente. Todos os espécimes funcionalizados exibiram liberação de CLX; sendo que a magnitude, resposta à dose e dependência do tempo variaram de acordo com o material. Houve eluição gradual durante um período de pelo menos 50 dias. Com relação às análises microbiológicas, a

suspensão coloidal de NPs CLX-HMP se mostrou eficaz contra as cepas testadas em condições planctônicas e biofilme. Sendo assim os autores concluíram que as NPs CLX-HMP poderiam ser aplicáveis em uma variedade de materiais biomédicos e de consumo. Além disso, apontaram para uma potencial aplicação destas nanopartículas em cimentos de ionômero de vidro, uma vez que as tentativas de aumentar a capacidade antimicrobiana deste material, por adição de digluconato ou diacetato de CLX, apresentou algum sucesso embora tenham ocorrido alterações indesejáveis em suas propriedades mecânicas bem como uma perda da eficácia antimicrobiana ao longo de algumas semanas.

Partindo dessa premissa, Hook et al.<sup>31</sup> (2014) desenvolveram um novo CIV funcionalizado com NPs CLX-HMP. Neste estudo os autores reiteraram as várias características favoráveis que tornam os CIVs aplicáveis em diversas situações clínicas e quão benéfico seria aumentar suas propriedades antimicrobianas com o auxílio da nanotecnologia. As nanopartículas foram sintetizadas utilizando método semelhante ao de Barbour et al.<sup>5</sup> (2013). Foram observados o tamanho e o potencial zeta das nanopartículas em suspensão e também o tamanho, morfologia e agregação das mesmas por microscopia de força atômica. Em seguida, foi realizada a mistura de um CIV comercialmente disponível (Diamond Carve™, Kement, Purton, UK) às nanopartículas nas concentrações de 1%, 2%, 5%, 10%, 20% e 30%. Na concentração de 30%, a manipulação foi dificultada e o material ficou quebradiço, por esta razão, para os testes posteriores foram utilizadas as concentrações de até 20%. Os autores avaliaram, a liberação de flúor e CLX e a resistência à tração diametral do material modificado. Os resultados mostraram que as NPs CLX-HMP estavam carregadas negativamente, possuíam diâmetro entre 80 e 90 nm e formaram

agregados com diâmetro médio de 196 nm. Foi observado que todos os cimentos com diferentes concentrações do agente antimicrobiano liberaram CLX durante todo o período do experimento, e que a liberação foi dose-dependente. Já a liberação de flúor não foi afetada na maioria das formulações e a estrutura do material não foi comprometida com a associação de até 10% de nanopartículas. A resistência à tração diametral diminuiu com a adição de 10% e 20%, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa. Com base nestes resultados os autores acreditam que estes cimentos possam ter uma aplicação clínica como nanomateriais antimicrobianos que ajudem a prevenir ou reduzir a cárie secundária protegendo os tecidos dentários da infecção bacteriana.

Wood et al.<sup>68</sup> (2015), testaram a hipótese de que as NPs CLX-HMP não apresentariam eficácia antimicrobiana quando usadas como revestimento para titânio utilizado em implantes dentários. Após a síntese, a suspensão coloidal foi levada ao microscópio eletrônico de varredura para formação das imagens. Utilizou-se espectroscopia de Raios X energizante in situ para determinar a sua composição elementar. Após o recobrimento das amostras de titânio por 30 segundos com as NPs CLX-HMP foram obtidas imagens utilizando microscopia eletrônica de varredura. Em uma segunda etapa foi observada a eluição da CLX após 99 dias de imersão em água deionizada. A fim de determinar se a eluição seria influenciada pela presença de película salivar, espécimes contendo esta película também foram avaliados. Por fim foi avaliada a eficácia antimicrobiana contra a cepa *S. gordonii*. Os autores observaram que as nanopartículas mostraram diâmetro médio de 49 nm havendo formação de agregados de tamanho micrométrico, e em sua composição foi confirmada a presença de cloro e fósforo. Houve liberação prolongada de CLX, tanto na ausência como na

presença da película salivar, durante o período de estudo sem atingir um platô. Os corpos de prova do grupo controle não exibiram liberação de CLX. As superfícies revestidas com as NPs CLX-HMP exibiram eficácia antimicrobiana contra a colonização bacteriana primária da cepa *S. gordonii* durante 8 horas. Houve mais bactérias viáveis nas amostras de titânio não revestidas com as nanopartículas após 24 e 48 h. Este resultado se mostrou de forma mais pronunciada na presença da película salivar, o que pode ter ocorrido devido à retenção de CLX solúvel pela mesma.

Neste mesmo ano, Garner e Barbour<sup>24</sup> (2015) dando continuidade aos estudos sobre as NPs CLX-HMP tornaram públicos os resultados de uma pesquisa que teve como objetivo comparar a retenção da CLX quando administrada na forma de digluconato ou NPs CLX-HMP. A hipótese foi de que não haveria diferença na liberação entre a forma nanoparticulada ou aquosa. A síntese das nanopartículas foi realizada de acordo com metodologia já descrita no estudo de Barbour et al.<sup>5</sup> (2013), de forma que a concentração final fosse de 1, 2,2 e 5 mM. Soluções aquosas de digluconato de CLX foram preparadas nas mesmas concentrações. Discos de hidroxiapatita (n=6 por grupo) foram imersos na suspensão/solução de CLX e a liberação foi avaliada por espectrofotometria ultravioleta após imersão em água deionizada durante 60 dias. Outro grupo de espécimes contendo CLX na forma aquosa e nanoparticulada a 5mM e espécimes sem CLX foram observados por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicaram que a liberação foi de 2 a 3 vezes maior e sustentada por mais tempo quando a CLX foi administrada na forma de NPs CLX-HMP nas concentrações de 2,2 e 5 mM. Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de 1 mM.

Neste estudo, as concentrações usadas foram selecionadas com base nos produtos comerciais que possuem concentração de CLX 0,2% o que corresponde a uma concentração molar de 2,2 mM. Assim, as soluções foram preparadas com uma concentração de 2,2 mM, bem como a metade e o dobro, para investigar os efeitos das concentrações que fossem clinicamente relevantes. Em conclusão, as NPs CLX-HMP apresentaram potencial para o tratamento de infecções bucais, bem como, para a prevenção da transferência microbiana para o trato respiratório.

Bellis et al.<sup>9</sup> (2016) avaliaram as propriedades de um protótipo de CIV funcionalizado com uma pasta concentrada de NPs CLX-HMP. Segundo os autores os métodos de síntese anteriormente relatados por Barbour et al.<sup>5</sup> (2013) poderiam resultar em grandes agregados de NPs CLX-HMP que se formariam durante o processo de confecção. Segundo eles, é possível que esses agregados sejam responsáveis pelos efeitos adversos sobre as propriedades mecânicas observadas, por isso neste estudo o objetivo foi incorporar as nanopartículas ao CIV (Diamond Carve™, Kemdent, Purton, UK) de uma outra forma. A pasta de NPs CLX-HMP foi sintetizada pela mistura de soluções aquosas (concentração 10mM) de digluconato de CLX e hexametáfosfato de sódio associadas a cloreto de potássio (1M). O teor de água da pasta foi estabelecido para permitir que a concentração do componente líquido do CIV fosse ajustado de modo a representar a água adicional na pasta. Foi observado que a pasta consistia 83% água e 17% nanopartículas. A pasta foi associada ao CIV nas concentrações de 0,17%, 0,34%, 0,85%, 1,70% em massa de nanoprtículas (1%,2%,5% e 10% em massa da pasta). Foram realizados os testes de resistência à compressão após 7 dias da confecção dos espécimes,

resistência à tração diametral após 7 e 436 dias, análise da liberação de CLX e análise *in vitro* da atividade antimicrobiana contra cepas de *S. mutans*. Observou-se que houve liberação de CLX sustentada por 436 dias e que esta liberação ocorreu de forma dose-dependente e relação não linear. A resistência à tração diametral dos espécimes após 7 dias não foi afetada até a concentração de 0,85% (5% em massa da pasta). Os valores de resistência à tração diametral não foram afetados pelo envelhecimento, mas a quantidade de NPs CLX-HMP necessária para afetar adversamente a resistência à tração foi menor após o envelhecimento, 0,34% (2% em massa da pasta). A resistência à compressão foi afetada negativamente pelas NPs CLX-HMP em substituições de 0,85% ou mais. A concentração testada na análise antimicrobiana (0,34%) mostrou a formação de halos de inibição contra *S. mutans* diferente do grupo controle, no qual não houve formação do halo. Sendo assim, os autores concluíram que para uma aplicação clínica deste novo protótipo seria melhor que a pasta de nanopartículas fosse incorporada aos CIVs em baixas concentrações uma vez que as mesmas não afetaram negativamente as propriedades mecânicas e demonstraram algum efeito antibacteriano.

Buscando uma nova aplicação para este material nanométrico, Haseeb et al.<sup>28</sup> (2016) estudaram a síntese, caracterização e eficácia antimicrobiana de nanocápsulas de CLX, para uso na desinfecção de canais radiculares. O preparo das nanopartículas se deu pela síntese do polímero e encapsulação do fármaco. A caracterização foi feita pela avaliação da eficiência de encapsulamento, composição, morfologia e tamanho das partículas. As nanopartículas foram imersas em solução PBS e caldo BHI durante 1 hora, 7, 14 e 21 dias e depois utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana contra a cepa *E. faecalis*. Esta

etapa foi realizada a fim de investigar o potencial de inibição bacteriana e liberação do fármaco e para observar quanto tempo as nanocápsulas seriam capazes de permanecer ativas dentro dos túbulos dentinários. A investigação do comportamento térmico dos materiais sintetizados mostrou que a encapsulação da CLX foi alcançada. As nanopartículas variaram em tamanho entre 300-500 nm, tamanho considerado pequeno o suficiente para a penetração nos túbulos dentinários. As nanopartículas mostraram inibição bacteriana aumentada durante períodos de tempo mais longos, sendo assim, demonstraram potencial como veículo de fármacos para uso em tratamentos endodônticos, pois o seu tamanho e velocidade de liberação podem permitir uma inibição sustentada das bactérias no sistema de canais radiculares.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **Proposição Geral**

Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP) e avaliar as propriedades físico-química, antibacteriana e mecânica de um CIV de alta viscosidade modificado pela incorporação dessas nanopartículas.

#### **Proposições específicas:**

- Avaliar a capacidade de liberação de clorexidina e de liberação de flúor antes e após o recarregamento.
- Avaliar a composição microbiológica, a atividade metabólica e a biomassa do biofilme formado sobre a superfície do material.
- Avaliar a resistência de união do material à dentina hígida e afetada por cárie, nos períodos imediato e após seis meses.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Síntese e preparo das nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP)**

Solução de digluconato de CLX a 20% e hexametáfosfato de sódio (HMP) (Sigma Aldrich, Gillingham, Reino Unido) foram misturadas em água deionizada, de modo que a concentração final foi de 4 mM de CLX e 5 mM de HMP (Hook et al.<sup>31</sup>, 2014). A suspensão resultante de nanopartículas de CLX-HMP foi cuidadosamente colocada em ultrassom por aproximadamente 15 minutos para dispersão das partículas. Após a dispersão das partículas, as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas em um liofilizador de bancada Enterprise I (Terroni Equipamentos Científicos, São Carlos, SP, Brasil) por aproximadamente 3 dias. O material resultante foi armazenado em tubos de polietileno.

### **4.2 Caracterização das nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP)**

#### **4.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico**

O tamanho das partículas foi analisado pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS – Dynamic Light Scattering). As nanopartículas foram solubilizadas em água e a solução colocada em ultrassom por 5 minutos. Utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS Malvern, na Embrapa Instrumentação, São Carlos - SP, em temperatura ambiente, com tempo de equilíbrio de 10 e 120 segundos. As medidas foram realizadas em triplicata e foi considerada a média da distribuição do tamanho das partículas.

#### 4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observar o tamanho, a morfologia e a agregação das nanopartículas, estas foram depositadas sobre lamínulas de vidro. As lamínulas foram limpas por ultrasonificação durante 10 minutos em acetona, seguido por 10 minutos em etanol. Em seguida, estas lamínulas foram imersas por 30 segundos no preparado fresco de nanopartículas. O conjunto foi lavado em água deionizada corrente durante 10 segundos, e seco à temperatura ambiente. As lamínulas revestidas por nanopartículas foram observadas nos aumentos de 20000x e 40000x usando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Inspect F50, FEI Company, Oregon, EUA).

#### **4.3 Determinação da quantidade de pó de nanopartículas incorporado ao CIV**

O cimento de ionômero de vidro usado foi o Ketac Molar EasyMix (3M- ESPE Dental Products, St Paul, MN, EUA).

Inicialmente dez porções de pó do CIV, correspondentes a uma colher medida cada, foram individualmente pesadas, com a finalidade de determinar a média aritmética de uma colher medida do pó do CIV. Com base nesta média foi calculada a quantidade de pó de NPs CLX-HMP que foi usada para substituir o pó do CIV nas frações de 1%, 2% e 5% em massa. O pó de nanopartículas foi incorporado ao pó do CIV imediatamente antes da manipulação do cimento.

Para todos os experimentos, o CIV sem adição de nanopartículas foi utilizado como grupo controle.

#### **4.4 Avaliação da liberação de clorexidina e da liberação de flúor antes e após o recarregamento**

##### **4.4.1 Confeção dos espécimes**

A manipulação do material foi realizada mantendo a proporção pó:líquido (2,9:1) determinada pelo fabricante do CIV, em ambiente com temperatura controlada ( $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ). Imediatamente após a mistura, os materiais foram introduzidos com o auxílio de seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio S.A., Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brasil) em matrizes de silicone medindo 6 mm de diâmetro interno e 3 mm de altura. Sobre a superfície do material, foram colocadas uma tira matriz de poliéster e uma placa de vidro para auxiliar na eliminação dos excessos de material e garantir uma superfície plana e lisa.

Após a presa inicial do material, os espécimes foram removidos das matrizes, colocados em recipientes plásticos individuais em atmosfera de 100% de umidade e mantidos a  $37\text{ °C}$  durante 24 horas.

##### **4.4.2. Liberação de CLX e Flúor**

Foram usados 12 espécimes (superfície total igual a  $113,1\text{ mm}^2$ ) de cada grupo experimental (CIV + CLX-HMP 1%; CIV + CLX-HMP 2% e CIV + CLX-HMP 5%) e do grupo controle (CIV) para avaliar a liberação de CLX e a liberação e recarregamento de flúor. Vinte e quatro horas após a sua confecção, cada espécime foi suspenso em um microtubo contendo 2 mL de água deionizada (razão superfície total/líquido igual a  $56,5\text{ mm}^2/\text{mL}$ ) e mantido sob agitação a  $37\text{°C}$  (Banho maria metabólico dubnoff reciprocante CE-160/RE, CIENLAB, Campinas, São Paulo, Brasil). As avaliações foram realizadas nos períodos de

1 h, 24 h, 7, 15 e 30 dias após a imersão dos espécimes em água deionizada e foram apresentados dados cumulativos. Decorrido cada período, os espécimes foram removidos dos microtubos, lavados com água deionizada por 10 segundos, secos em papel absorvente e transferidos para um novo microtubo contendo 2 mL de água deionizada.

Para cada período de imersão dos espécimes, duas alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  da água deionizada de cada recipiente foram transferidas para poços de placas de 96 poços e a concentração de CLX foi medida por espectrofotometria ultravioleta (ELX 800 – Universal Microplate Reader; Bio-Tek instrument, Inc., VT, EUA) em comprimento de onda de 255 nm. A leitura foi convertida para concentração de CLX com referência a padrões de calibração de 2,5-30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , sendo os resultados apresentados em  $\mu\text{mol/mL}$ . A normalização foi feita pela subtração da leitura para o grupo controle (CIV sem adição de nanopartículas), corrigindo assim a absorção a 255 nm por quaisquer outras moléculas presentes no sistema (Hook et al.<sup>31</sup>, 2014).

Para a dosagem do flúor foi feita leitura em duplicata. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  dos extratos obtidos dos CIVs foram misturadas com TISAB III (Total Ionic Strength Adjustment Buffer – Orion, nº 940911, Orion Research Inc., Boston, Ma, EUA) na razão de 1: 0,1 para evitar a formação de complexos entre o flúor e outros íons liberados pelos materiais. Essa análise foi realizada utilizando um eletrodo específico para íons flúor (Modelo 51928, Hach Company, Loveland, Colorado, EUA), acoplado a um potenciômetro (Analisador de Íons Digital – EA – 940, Orion Research Inc., Boston, MA, EUA) previamente calibrado pela leitura em triplicata de uma série de soluções padrão (0,03125  $\mu\text{g}$ ; 0,0625  $\mu\text{g}$ ; 0,125  $\mu\text{g}$ ; 0,25  $\mu\text{g}$ ; 0,5  $\mu\text{g}$ ; 1,0  $\mu\text{g}$ ; 2,0  $\mu\text{g}$  e 4,0  $\mu\text{g}$  de flúor/mL). Após a calibração e a

dosagem de cada 10 amostras foi realizado o teste de exatidão com um padrão de concentração conhecido (2,0 µg de flúor/mL). Os resultados foram obtidos em milivolts (mV) e transformados em microgramas de flúor por mililitro (µg F/mL)

Completados 30 dias de imersão em água deionizada, os espécimes (n=10 por grupo) foram imersos em gel neutro de fluoreto de sódio a 2% (Flugel, Nova DFL, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) por 4 minutos, lavados em água deionizada, secos em papel absorvente e recolocados em água deionizada. As análises para a avaliação da concentração de flúor liberado foram repetidas nos períodos de 1 h, 24 h, 7, 15 e 30 dias após a aplicação tópica de flúor.

#### **4.5 Análise microbiológica, da atividade metabólica e da biomassa do biofilme formado sobre a superfície do material**

##### 4.5.1 Coleta da saliva

A aprovação para coleta da saliva foi obtida junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CAAE 38991514.0.0000.5416) (ANEXO A). Foi coletada a saliva estimulada de quatro voluntários adultos com idade entre 25 e 30 anos, saudáveis, dentição completa e que não tivessem feito uso de antibióticos ou antifúngicos nos últimos seis meses. A saliva foi coletada no período da manhã e os doadores estavam em jejum e sem escovar os dentes por 24 horas (van de Sande et al.<sup>53</sup>, 2011). Durante a coleta, a saliva foi mantida em gelo. A saliva coletada por cinco minutos foi diluída em glicerol (concentração final 30%), alíquotas de 2 mL foram transferidas para tubos esterilizados e armazenadas a – 80 °C.

Uma das alíquotas foi imediatamente processada para a determinação da concentração microbiana inicial da saliva de cada voluntário e da mistura da saliva de todos os voluntários, a fim de se verificar a taxa de crescimento bacteriano dos microrganismos estudados.

#### 4.5.2 Crescimento dos biofilmes polimicrobianos

Para o crescimento do biofilme polimicrobiano, foi usado o modelo de aderência ativa de Exterkate et al.<sup>21</sup> (2010), com algumas modificações no dispositivo para manutenção da posição dos espécimes. Espécimes (n=10 por grupo e tipo de análise) dos grupos CIV (controle) e CIV com NPs CLX-HMP nas concentrações de 1%, 2% e 5%, com dimensões de 6 mm de diâmetro e 3 mm de altura, foram confeccionados conforme descrito anteriormente, e em condições assépticas.

Os espécimes ficaram suspensos verticalmente, em poços de placas de 24 poços (Modelo 92024, TPP - Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça), contendo 1,8 mL do meio de cultura McBain composto por: mucina gástrica suína (2,5 g/L), peptona bacteriológica (2,0 g/L), triptona (2,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L), NaCl (0,35 g/L), KCl (0,2 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,2 g/L), cloridrato de cisteína (0,1 g/L), hemina (0,001 g/L) e vitamina K1 (0,0002 g/L), pH 7,0. Um inóculo 0,4 mL da saliva congelada foi adicionado e as placas foram incubadas a 37 °C em condições de anaerobiose (5-10% CO<sub>2</sub> e <1% O<sub>2</sub>), obtidas em gerador (BD GasPak EZ Gas Generating Container Systems) por 5 dias. O meio de cultura foi substituído por um meio fresco a cada 24 horas.

#### 4.5.3 Análise microbiológica do biofilme

Após o crescimento dos biofilmes, os espécimes foram removidos dos poços, lavados por 10 segundos em NaCl 0,9% para remoção de células não aderidas e transferidos individualmente para tubos contendo 2 mL de NaCl 0,9%. Os biofilmes foram dispersos em ultrassom (Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA, Campo Mourão, Paraná, Brasil) durante 10 segundos. As suspensões foram seqüencialmente diluídas e inoculadas em triplicata nos seguintes meios de cultura: ágar sangue para análise de microrganismos totais; ágar BHI com pH 4,7 para análise de bactérias acidúricas totais; ágar mitis salivarius suplementado com 0.2 U/mL de bacitrina e 15% de sacarose, para análise de estreptococos do grupo mutans.

As placas foram incubadas a 37 °C, em anaerobiose (5-10% CO<sub>2</sub> e <1% O<sub>2</sub>) por 48 horas para o ágar sangue, em 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas para o ágar MSBS e em anaerobiose 96 horas para o ágar BHI com pH 4,7. Em seguida, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi obtido com o auxílio de um contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix Indústria de Equipamentos Científicos, Araraquara, SP, Brasil). No caso de dúvida na identificação das colônias de estreptococos do grupo mutans foram observadas as características morfotintoriais por meio da coloração de Gram. Os resultados foram apresentados em UFC/ mL.

#### 4.5.4 Análise da atividade metabólica e da biomassa dos biofilmes

Os biofilmes foram obtidos pelas mesmas condições descritas anteriormente.

Para a avaliação da atividade metabólica dos biofilmes foi usado o ensaio de XTT (Jin et al.<sup>35</sup>, 2004). As soluções de XTT (1 mg/mL em PBS) e de menadiona (0,4 mmol/L) foram preparadas, esterilizadas por filtração e misturadas na razão de 5:1. Em seguida, 1,5 mL dessa mistura foram colocados em cada poço de placas de 24 poços, nos quais foram imersos os espécimes contendo os biofilmes. As placas foram incubadas por 3 horas a 37 °C, e os valores de absorbância foram lidos a 490 nm.

A coloração por cristal violeta foi usada para analisar a biomassa, utilizando um outro conjunto de biofilmes. Os espécimes contendo os biofilmes foram colocados em etanol por 15 min, secos a temperatura ambiente por aproximadamente 20 min e imersos em solução de cristal violeta por 5 min. Em seguida, foram lavados com água deionizada, secos novamente em temperatura ambiente e imersos em ácido acético 33% para remoção do cristal violeta. O conteúdo dos poços foi transferido em triplicata (200 µL cada) para placas de 96 poços e a absorbância foi lida a 570 nm.

#### **4.6 Avaliação da resistência de união à dentina sadia e afetada por cárie, nos períodos imediato e após seis meses**

##### **4.6.1 Seleção e distribuição dos dentes**

Oitenta terceiros molares humanos hígidos extraídos foram obtidos junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, após

aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da mesma instituição (CAAE 38991514.0.0000.5416). Foram selecionados apenas os dentes sem defeitos anatômicos e estruturais. Estes foram armazenados em solução de timol a 0,1% sob refrigeração (4<sup>o</sup>C) até o momento da sua utilização. Os dentes foram aleatoriamente divididos em dois grupos (n=40) de acordo com a condição do substrato (dentina afetada por cárie e dentina sadia) e, em seguida, cada um destes grupos foi dividido em quatro sub grupos (n=10) (CIV; CIV + CLX-HMP 1%; CIV + CLX-HMP 2% e CIV + CLX-HMP 5%).

#### 4.6.2 Obtenção da superfície de dentina

Os dentes foram cortados transversalmente no terço oclusal da coroa, com a finalidade de produzir uma superfície plana em dentina. O corte foi realizado com o auxílio de cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltd, Lake Bluf, IL, EUA) equipada com disco diamantado (n.11-4254, Buehler Ltd. Lake Bluf IL, EUA), com velocidade de 300 rpm e força de 200 gf, sob refrigeração constante. As superfícies foram inspecionadas em lupa estereoscópica (Modelo SZX7, Olympus, São Paulo, Brasil) com aproximadamente 40 vezes de aumento para comprovar a ausência de remanescentes de esmalte sobre a superfície dentinária.

#### 4.6.3 Indução artificial de lesão de cárie

Os dentes que passaram pelo processo de indução artificial de cárie (n=40) tiveram uma das raízes perfurada e transfixada com um fio ortodôntico para permitir que eles ficassem suspensos no meio cariogênico. Estes foram

impermeabilizados com duas camadas de esmalte ácido resistente, deixando apenas a superfície dentinária exposta, e foram posicionados em um béquer e enviados para esterilização com óxido de etileno. Em seguida, os dentes foram suspensos em solução cariogênica (caldo BHI suplementado com 2% de sacarose, 1% de glicose e 0,5% de extrato de levedura; 25 mL/ dente) e foi feita a inoculação com  $10^5$  UFC/mL de *S. mutans* ATCC 25175 (Coleção de Culturas Tropical Fundação André Toselo). O conjunto foi incubado em microaerofilia por 14 dias a 37 °C, com trocas da solução cariogênica a cada 48 horas, sem a inoculação de novos microrganismos. Após o período de incubação, o biofilme foi removido com gaze e o material isolante com o auxílio de lâminas de bisturi. Os dentes foram abundantemente lavados em água deionizada e a superfície de dentina apresentou-se escurecida e amolecida ao toque com sonda exploradora aplicada sem pressão.

#### 4.6.4 Inclusão dos dentes em resina acrílica e remoção do tecido cariado

Todos os dentes foram incluídos em resina acrílica autopolimerizável, usando como matriz um tubo cilíndrico de PVC com 20 mm de diâmetro externo por 18 mm de altura, de forma que a superfície de dentina ficasse centralizada e paralela à base do tubo.

Nos dentes artificialmente cariados, a dentina infectada foi manualmente removida com lixas de carbetto de silício de granulação 320, até a obtenção de uma dentina endurecida e resistente ao toque com sonda exploradora sem pressão (dentina afetada). Na tentativa de obter uma profundidade dentinária semelhante entre os dentes afetados por cárie e os dentes mantidos

hígidos, os últimos também foram desgastados com a mesma lixa. Todos os procedimentos foram realizados por um único operador previamente treinado.

#### 4.6.5 Confeção dos espécimes

Na superfície dentinária de cada dente foram confeccionados dois espécimes. Inicialmente, foi realizada a delimitação das áreas adesivas utilizando-se fita adesiva dupla face ácido resistente (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil) com duas perfurações (diâmetro de 1,2 mm) confeccionadas com o auxílio de um perfurador de lençol de borracha adaptado (modelo Ainsworth, Wilcos do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Em seguida, as áreas delimitadas em dentina foram tratadas com o líquido do CIV por 10 segundos, lavadas com jato de água-ar por 10 segundos e secas com papel absorvente. Matrizes cilíndricas transparentes de silicone com 1 mm de altura e orifício de 1 mm de diâmetro foram obtidas pelo corte de sonda uretral descartável (Embramed, São Paulo, SP, Brasil). Estas foram posicionadas sobre as áreas de dentina exposta e utilizadas como matriz para a confecção dos espécimes.

O material foi manipulado em temperatura ambiente controlada ( $24 \pm 1$  °C), conforme as recomendações do fabricante do CIV (3M – ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA) e inserido nas matrizes com o auxílio de uma seringa Centrix (DFL, Indústria e Comércio S.A, Jacarepaguá, RJ, Brasil). A superfície do material foi protegida com vaselina e o conjunto (troquel + matriz plástica + espécime) foi armazenado em estufa a 37 °C com 100% de umidade durante 24 horas. Em seguida, a matriz de um dos espécimes de cada dente foi cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Embramed,

Jurubatuba, SP, Brasil) e removida. Este espécime foi tracionado imediatamente após a remoção da matriz.

Em seguida, a matriz do outro espécime foi removida e este foi armazenado em saliva artificial, pH 6,8 (20 mL/espécime), a 37 °C, por seis meses para posterior realização do teste de microcisalhamento. Durante este período a saliva artificial teve seu pH monitorado mensalmente com o auxílio de um pHmetro (Modelo Q400AS, Quimis Aparelhos Científicos, Diadema, SP, Brasil).

#### 4.6.6 Ensaio mecânico de microcisalhamento

O ensaio mecânico de microcisalhamento foi realizado em máquina para testes mecânicos (DL-Digital Line, EMIC, Paraná, Brasil), previamente ajustada para forças de tração. Para a execução do teste, foi usado um fio metálico de 0,2 mm de diâmetro laçando simultaneamente o corpo-de-prova o mais próximo possível da união material/dentina e o prolongamento da célula de carga. Os movimentos de tração foram realizados utilizando célula de carga de 100 N a uma velocidade de 0,5 mm/min. Os testes foram iniciados por meio de um programa computadorizado específico (Tesc-Test Script, EMIC Equipamentos de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e prosseguiram até que ocorresse a fratura. Os resultados de resistência de união foram dados pelos valores de tensão máxima suportada pela união dentina/material, em MegaPascal.

#### 4.6.7 Análise dos padrões de fratura

O padrão de fratura de cada espécime foi avaliado por um único examinador treinado, com o auxílio de microscópio de luz (Modelo SZX7 Olympus, São Paulo, Brasil) e aumento que permitisse a análise adequada (aproximadamente 40x). As fraturas foram classificadas como adesivas (falha entre substrato e material restaurador), coesivas em dentina ou em material (falha em dentina ou em material, respectivamente) e mistas (combinação de falhas adesiva e coesiva). O operador desconhecia o grupo ao qual cada espécime pertencia.

#### 4.7 Análise estatística

Os resultados das análises de caracterização das NPs CLX-HMP foram apresentados de forma descritiva.

Para a liberação de CLX, apenas os grupos contendo 2% e 5% de nanopartículas apresentaram liberação em níveis detectados pelo método utilizado. Os dados não apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk,  $p \leq 0,036$ ), foram então aplicados o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os materiais e o teste de Friedman complementado pela comparação múltipla de médias de ordens para identificar os períodos em que a liberação mostrou diferença significativa.

A significância da influência da adição de diferentes concentrações de NPs CLX-HMP ao CIV sobre a liberação de flúor antes e após a aplicação tópica de gel neutro de fluoreto de sódio, nos cinco períodos de análise foi avaliada pelo teste ANOVA de medidas repetidas mista. Antes da aplicação tópica, a maioria dos grupos mostraram distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,077$ ), e,

após a aplicação tópica, todos os grupos apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,079$ ). Entretanto, para ambos os grupos de dados, o pressuposto de esfericidade da matriz de variâncias-covariâncias não foi alcançado (Mauchly;  $p \leq 0,001$ ). Portanto, aplicou-se a correção pelo fator Épsilon de Greenhouse-Geisser e, para identificar os pares de médias que diferiam entre si, para a interação entre os fatores e para os momentos avaliados, procedeu-se à comparação múltipla de médias com correção de Bonferroni.

Os dados de contagem de microrganismos do biofilme foram transformados em logaritmo na base 10, não apresentando distribuição normal (Shapiro-Wilk;  $p \leq 0,027$ ) e foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Na avaliação do metabolismo celular todos os grupos apresentaram distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,066$ ), com exceção de um deles (Shapiro-Wilk;  $p = 0,025$ ), e houve homogeneidade de variâncias (Levene;  $p = 0,865$ ). Portanto, considerou-se uma tendência à normalidade e a análise foi conduzida pelo teste de Análise de variância a um fator. A análise da biomassa mostrou distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,050$ ), porém não houve homogeneidade de variâncias (Levene;  $p = 0,008$ ), por este motivo foi aplicada a Análise de variância a um fator, com correção de Welch.

Para os dados de resistência de união (em Mpa), a maioria dos grupos mostraram normalidade (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,065$ ), com exceção de dois grupos ( $p = 0,036$  e  $p = 0,039$ ). Assim, considerou-se uma tendência a normalidade e optou-se pela análise paramétrica pois trata-se de um experimento fatorial onde a ANOVA a 3 fatores possui robustez de análise. Como o pressuposto de homocedasticidade não foi obedecido (Levene,  $p < 0,001$ ), a complementação da

análise, quando necessária foi feita pelo pós-teste de Games-Howell para dados heterocedásticos.

Para os padrões de fratura, foram realizadas duas leituras e aplicada a estatística Kappa ( $K=0,69$  - concordância substancial) (Landis, Koch<sup>40</sup>, 1977). Em seguida, foi selecionada a primeira leitura, e aplicado o teste de Qui-quadrado para comparar as proporções dos padrões de fratura entre as condições do substrato, os períodos de envelhecimento e entre as diferentes concentrações de nanopartículas adicionadas ao CIV. As falhas pré-teste foram computadas, porém não foram consideradas para a análise estatística.

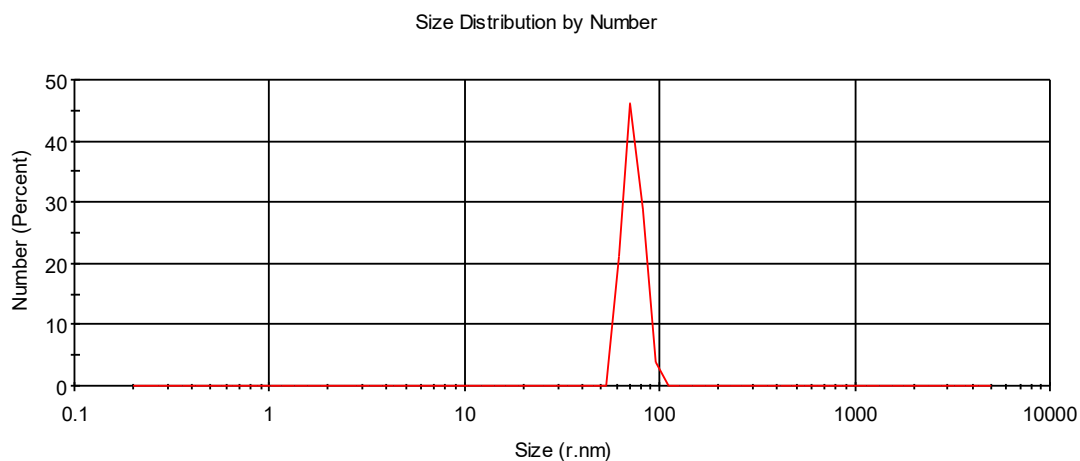
Todos os testes estatísticos foram efetuados pelo *software PASW Statistics* (v.22, SPSS Inc, Chicago, IL) considerando-se uma probabilidade de erro tipo I ( $\alpha$ ) de 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das nanopartículas CLX-HMP

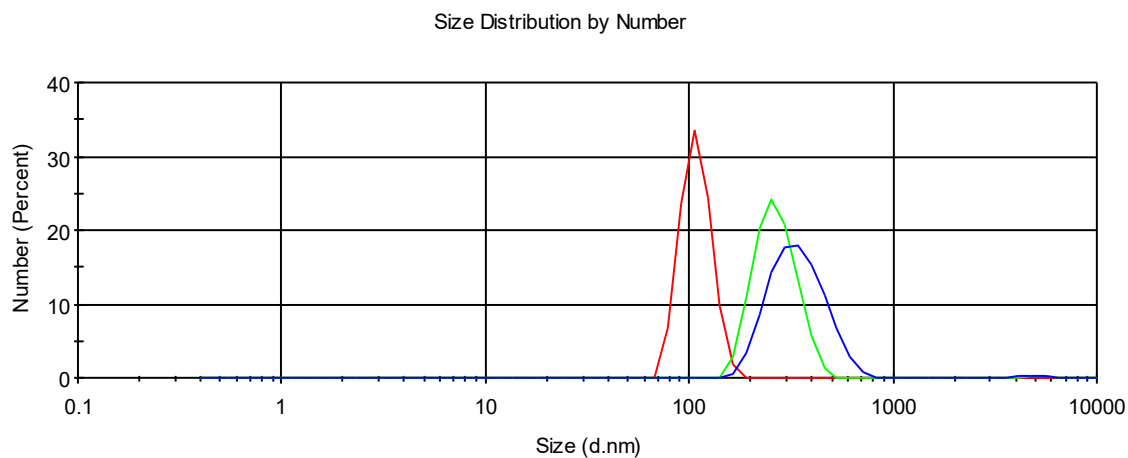
Os resultados entre as três medidas de dispersão usando o Teste de Espalhamento de Luz Dinâmica, com o tempo de equilíbrio em 10 s mostraram picos de tamanho centrados em torno de 60 nm, variando até cerca de 100 nm (Figura 1). Quando o tempo de equilíbrio foi alterado para 120 s, pode-se notar que houve precipitação das nanopartículas e formação de aglomerados (Figura 2).

Figura 1- Gráfico representativo da dispersão das nanopartículas com tempo de equilíbrio em 10 segundos.



Fonte: Autoria própria com a colaboração da Dr<sup>a</sup> Lidiane Patrícia Gonçalves, do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC), Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

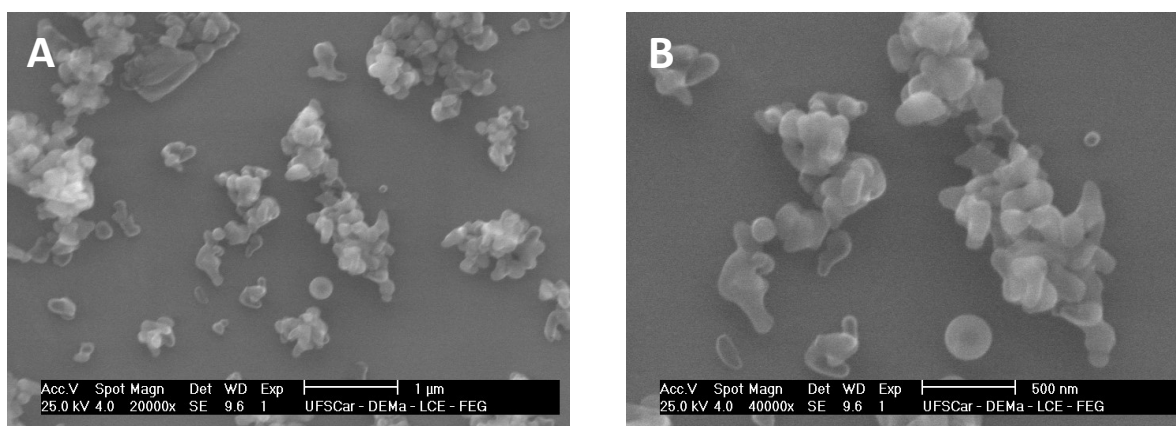
Figura 2- Gráfico representativo da dispersão das nanopartículas com tempo de equilíbrio em 120 segundos



Fonte: Autoria própria com a colaboração da Dr<sup>a</sup> Lidiane Patrícia Gonçalves, do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC), Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

As imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostram que os agregados formados pelas nanopartículas de CLX-HMP podem ser grandes atingindo vários micrometros. As nanopartículas individuais que compõem estes agregados se apresentaram regularmente com forma globular (Figura 3).

Figura 3 - (A) Imagem em MEV das NPs CLX-HMP com aumento de 20.000x e (B) detalhe da figura A com aumento de 40.000x.



Fonte: Autoria própria com a colaboração da Dr<sup>a</sup> Lidiane Patrícia Gonçalves, do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC), Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

## 5.2 Liberação de CLX e liberação de flúor antes e após recarregamento

Os grupos CIV e CIV + CLX-HMP 1% não apresentaram níveis de liberação de clorexidina detectáveis pelo método utilizado neste estudo. Os grupos CIV + CLX-HMP 2% (Md=0,3  $\mu\text{mol/mL}$ ) e CIV + CLX-HMP 5% (Md=0,1  $\mu\text{mol/mL}$ ) não apresentaram diferença significativa (Mann-Whitney,  $p=0,072$ ), mas em ambos a liberação de CLX foi influenciada pelos períodos de análise (Friedman,  $p=0,013$  e  $p\leq 0,001$ ). Como mostram as comparações múltiplas apresentadas na Tabela 1, diferenças significativas na liberação de CLX ocorreram apenas entre os períodos de 1 hora e 15 dias para os grupos CIV + CLX-HMP 2% ( $p=0,002$ ) e CIV + CLX-HMP 5% ( $p=0,037$ ), e entre os períodos de 1 dia e 15 dias para o grupo CIV + CLX-HMP 5% ( $p=0,022$ ).

Tabela 1- Liberação cumulativa de clorexidina (mediana, percentil 25 e percentil 75) observada no cimento de ionômero de vidro contendo diferentes concentrações de nanopartículas CLX-HMP, de acordo com o período de análise

Período	Liberação Cumulativa de Clorexidina ( $\mu\text{mol/mL}$ )	
	CIV + CLX-HMP2% (n=10)	CIV + CLX-HMP5% (n=10)
1hora	0,1 (0,0-0,3) <sup>b</sup>	0,0 (0,0-0,1) <sup>b</sup>
1dia	0,3 (0,0-0,7) <sup>ab</sup>	0,0 (0,0-0,1) <sup>b</sup>
7dias	0,9 (0,0-1,1) <sup>ab</sup>	0,3(0,2-0,6) <sup>ab</sup>
15 dias	1,2 (0,5-1,9) <sup>a</sup>	0,5 (0,2-1,2) <sup>a</sup>
30 dias	1,2 (0,0-1,3) <sup>ab</sup>	0,6 (0,0-1,0) <sup>ab</sup>

Para cada material, letras iguais na comparação entre períodos indicam grupos homogêneos e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% (teste de Friedman com pós-teste não paramétrico de comparação aos pares;  $p\leq 0,037$ ).

Fonte: Elaboração própria.

A liberação média inicial de flúor foi significativamente diferente entre os CIVs contendo diferentes concentrações de nanopartículas ( $p \leq 0,001$ ,  $\text{Eta} = 0,649$ ,  $\text{Poder} = 1,000$ ), sendo a liberação maior no grupo CIV + CLX-HMP 5% ( $p \leq 0,001$ ), seguido pelos grupos CIV + CLX-HMP 2% e CIV + CLX-HMP 1%, que não apresentaram diferença ( $p = 0,504$ ). O grupo CIV, não apresentou diferença quando comparado ao CIV + CLX-HMP 1% ( $p = 0,239$ ), mas liberou quantidade de flúor inferior ao grupo CIV + CLX-HMP 2% ( $p = 0,002$ ).

Com relação aos períodos de análise, observou-se diferenças estatisticamente significativas e de magnitude elevada na liberação de flúor entre os cinco períodos ( $p \leq 0,001$ ,  $\text{Eta} = 0,984$ ,  $\text{Poder} = 1,000$ ), com maior concentração de flúor liberada quanto maior o período ( $p \leq 0,001$ ).

Além disso, a liberação de flúor nos diferentes períodos sofreu a influência da concentração de nanopartículas adicionada ao CIV, conforme demonstrado pela interação significativa entre esses fatores ( $p \leq 0,001$ ,  $\text{Eta} = 0,758$ ,  $\text{Poder} = 1,000$ ).

A Tabela 2 mostra um resumo do efeito do período e da concentração de nanopartículas de CLX-HMP adicionadas ao CIV, na liberação de flúor. De acordo com as comparações múltiplas, diferenças estatisticamente significativas ocorreram entre os 5 períodos, para todos os materiais estudados ( $p \leq 0,001$ ), e, nos períodos de 7, 15 e 30 dias, a liberação de flúor foi significativamente maior no grupo CIV + CLX-HMP 5% ( $p \leq 0,017$ ).

Tabela 2- Liberação cumulativa de flúor (média e desvio padrão) observada no cimento de ionômero de vidro contendo diferentes concentrações de nanopartículas de CLX-HMP, de acordo com o período de análise

Período	Liberação cumulativa de flúor ( $\mu\text{gF/mL}$ )				Total
	CIV (n=12)	CIV + CLX- HMP1% (n=12)	CIV + CLX- HMP2% (n=12)	CIV + CLX- HMP5% (n=12)	
1hora	5,14 (1,69) <sup>Ea</sup>	5,15 (1,48) <sup>Ea</sup>	6,01 (1,05) <sup>Ea</sup>	5,63 (0,62) <sup>Ea</sup>	5,48 (1,29) <sup>E</sup>
1dia	21,08 (3,56) <sup>Db</sup>	23,67 (6,63) <sup>Dab</sup>	26,04 (4,41) <sup>Dab</sup>	27,47 (1,68) <sup>Da</sup>	24,56 (4,95) <sup>D</sup>
7dias	56,75 (6,80) <sup>Cc</sup>	66,91 (16,38) <sup>Cbc</sup>	72,41 (8,01) <sup>Cb</sup>	84,35 (4,84) <sup>Ca</sup>	70,11 (13,98) <sup>C</sup>
15 dias	78,36 (8,66) <sup>Bc</sup>	89,85 (20,80) <sup>Bbc</sup>	98,76 (10,35) <sup>Bb</sup>	127,72 (6,82) <sup>Ba</sup>	98,67 (22,26) <sup>B</sup>
30 dias	104,71 (11,61) <sup>Ac</sup>	119,65 (26,49) <sup>Abc</sup>	134,69 (18,30) <sup>Ab</sup>	180,66 (9,64) <sup>Aa</sup>	134,93 (33,51) <sup>A</sup>
Total	53,21 (37,43) <sup>c</sup>	61,05 (45,43) <sup>bc</sup>	67,58 (48,36) <sup>b</sup>	85,17 (64,94) <sup>a</sup>	62,72 (30,24)

Letras maiúsculas (comparação entre períodos) e minúsculas (comparação entre materiais) iguais indicam grupos homogêneos e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

Após aplicação tópica, a liberação média de flúor foi significativamente diferente entre os grupos ( $p \leq 0,001$ ,  $E_{\text{ta}} = 0,580$ , Poder = 1,000), sendo a liberação do grupo CIV + CLX-HMP 5% estatisticamente superior aos demais grupos ( $p \leq 0,007$ ). O grupo CIV + CLX-HMP 2% foi semelhante aos grupos CIV + CLX-HMP 1% e CIV ( $p = 0,903$  e  $p = 0,160$ , respectivamente), e o CIV + CLX-HMP 1% foi superior ao CIV ( $p = 0,002$ ).

Com relação aos períodos de análise, observou-se diferenças estatisticamente significativas e de magnitude elevada na liberação de flúor entre os cinco períodos ( $p \leq 0,001$ ,  $\text{Eta} = 0,981$ ,  $\text{Poder} = 1,000$ ), tendo os materiais no período de 30 dias apresentado liberação significativamente maior, seguido por 15 dias, 7 dias, 1 dia e 1 hora ( $p \leq 0,001$ ).

Adicionalmente, após o recarregamento, a liberação de flúor nos diferentes períodos sofreu a influência da concentração de nanopartículas, conforme demonstrado pela interação significativa entre esses fatores ( $p \leq 0,001$ ,  $\text{Eta} = 0,729$ ,  $\text{Poder} = 1,000$ ). A Tabela 3 mostra um resumo das comparações múltiplas evidenciando o efeito do período e da concentração das NPs CLX-HMP na liberação de flúor após o recarregamento.

Tabela 3- Liberação cumulativa de flúor após recarregamento (média e desvio padrão) observada no cimento de ionômero de vidro contendo diferentes concentrações de nanopartículas CLX-HMP, de acordo com o período de análise

Liberação cumulativa de flúor ( $\mu\text{gF/mL}$ ) após recarregamento					
Período	CIV (n=10)	CIV + CLX-HMP1% (n=12)	CIV + CLX-HMP2% (n=10)	CIV + CLX-HMP5% (n=12)	Total
1hora	17,70 (5,73) <sup>Ec</sup>	30,19 (7,34) <sup>Eab</sup>	22,78 (6,46) <sup>Ebc</sup>	34,96 (9,08) <sup>Ea</sup>	26,97 (9,76) <sup>E</sup>
1dia	22,65 (6,47) <sup>Dc</sup>	37,19 (8,09) <sup>Dab</sup>	29,20 (6,58) <sup>Dbc</sup>	41,02 (9,69) <sup>Da</sup>	33,11 (10,47) <sup>D</sup>
7dias	38,64 (7,79) <sup>Cc</sup>	56,13 (10,61) <sup>Cab</sup>	49,01 (7,39) <sup>Cbc</sup>	62,94 (11,60) <sup>Ca</sup>	52,39 (13,00) <sup>C</sup>
15 dias	49,55 (9,13) <sup>Bc</sup>	66,93 (11,51) <sup>Bb</sup>	61,78 (8,60) <sup>Bbc</sup>	83,51 (13,11) <sup>Ba</sup>	66,33 (16,23) <sup>B</sup>
30 dias	69,93 (11,10) <sup>Ac</sup>	86,37 (14,06) <sup>Ab</sup>	84,36 (9,30) <sup>Abc</sup>	121,98 (16,24) <sup>Aa</sup>	91,89 (23,42) <sup>A</sup>
Total	39,69 (20,67) <sup>c</sup>	55,36 (22,89) <sup>b</sup>	49,43 (23,74) <sup>bc</sup>	68,88 (33,99) <sup>a</sup>	53,78 (19,35)

Letras maiúsculas (comparação entre períodos) e minúsculas (comparação entre materiais). Letras iguais indicam grupos homogêneos e letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95%.

Fonte: Elaboração própria.

### 5.3 Análise microbiológica, atividade metabólica e biomassa do biofilme

Na Tabela 4 são apresentadas as medianas, percentil 25 e percentil 75 da contagem de microrganismos em Log<sub>10</sub> UFC/mL em biofilmes formados sobre os espécimes de cada grupo experimental. O teste de Kruskal-Wallis não apontou diferenças significativas na contagem de bactérias anaeróbias totais, *S. mutans* e bactérias acidúricas totais, para as diferentes concentrações de nanopartículas adicionadas ao CIV ( $p \geq 0,470$ ).

Tabela 4- Quantificação de microrganismos no biofilme formado sobre o cimento de ionômero de vidro contendo diferentes concentrações de nanopartículas CLX-HMP, por um período de 5 dias (mediana, Percentil 25, Percentil 75)

Material	Contagem Microrganismos (Log <sub>10</sub> UFC/mL)		
	Bactérias anaeróbias totais	<i>S. mutans</i>	Bactérias acidúricas totais
CIV (n=10)	7,71 (7,05-7,74)	4,82 (4,46-6,63)	7,49 (6,89-7,76)
CIV + HMP-CLX 1% (n=10)	7,66 (6,93-7,72)	4,11(3,12-5,81)	6,79 (6,66-7,85)
CIV + HMP-CLX 2% (n=9)	7,62 (7,09-7,69)	3,90 (3,09-4,88)	7,38 (6,60-7,77)
CIV + HMP-CLX 5% (n=9)	7,62 (7,23-7,75)	5,36 (3,06-6,03)	7,62 (6,76-7,74)
valor de p*	0,875	0,470	0,984

\*Ausência de diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% (teste de Kruskal-Wallis;  $p > 0,05$ ).

Fonte: Elaboração própria.

A atividade metabólica (ensaio do XTT) e a análise da biomassa (coloração por cristal violeta) dos biofilmes polimicrobianos formados sobre os espécimes não apresentaram diferença estatisticamente significativa para as diferentes concentrações de nanopartículas adicionadas ao CIV. Isto é, a adição dessas nanopartículas não melhorou a atividade antibacteriana do CIV (Tabela 5).

Tabela 5- Atividade metabólica e quantificação da biomassa (média e desvio-padrão) em biofilmes polimicrobianos formados sobre a superfície de cimentos de ionômero de vidro contendo diferentes concentrações de nanopartículas CLX-HMP durante 5 dias.

Material	Absorbância	
	Atividade Metabólica**	Biomassa***
CIV (n=10)	1,31 (1,11)	2,81 (0,55)
CIV + HMP-CLX 1% (n=10)	1,22 (0,96)	3,09 (0,19)
CIV + HMP-CLX 2% (n=10)	1,34 (0,99)	3,01 (0,30)
CIV + HMP-CLX 5% (n=10)	1,06 (1,03)	2,86 (0,51)
valor de p*	0,928	0,335

\* Ausência de diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% (\*\*ANOVA a um fator e \*\*\*ANOVA a um fator com correção de Welch;  $p > 0,05$ ).

Fonte: Elaboração própria.

#### 5.4 Resistência de união do material à dentina sadia e afetada por cárie, nos períodos imediato e após seis meses.

A Tabela 6 mostra as médias e desvios-padrão da resistência de união para o CIV modificado nas duas condições de substrato e períodos de envelhecimento.

Na comparação entre as condições do substrato, a média de resistência de união foi 6,70 ( $\pm 2,25$ ) MPa para a dentina sadia, e 5,07 ( $\pm 2,80$ ) MPa para a dentina afetada por cárie, sendo a diferença significativa ( $p \leq 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,115$ , Poder=0,988). Para os períodos de envelhecimento, a diferença também mostrou-se significativa ( $p \leq 0,008$ ,  $\eta^2 = 0,049$ , Poder=0,756), sendo as médias para 24 horas e 6 meses, 6,38 ( $\pm 2,46$ ) MPa e 5,40 ( $\pm 2,78$ ) MPa,

respectivamente. Também houve diferença significativa entre os valores de resistência de união quando se analisou as diferentes concentrações de nanopartículas de CLX-HMP adicionadas ao CIV ( $p \leq 0,009$ ,  $\text{Eta} = 0,080$ ,  $\text{Poder} = 0,834$ ), e, não houve interação significativa entre nenhum dos fatores estudados (ANOVA a três fatores,  $p \geq 0,501$ ).

Assim, independente da condição da dentina e do tempo de armazenamento, a comparação aos pares mostrou ausência de diferença significativa entre os grupos CIV, CIV + CLX-HMP 1% e CIV + CLX-HMP 2% (Games-Howell,  $p \geq 0,192$ ). O grupo CIV + CLX-HMP 5% apresentou valores de resistência de união similares aos grupos CIV + CLX-HMP 1% e CIV + CLX-HMP 2% (Games-Howell,  $p \geq 0,163$ ), porém significativamente inferiores apenas aos do grupo controle CIV (Games-Howell,  $p = 0,014$ ).

Tabela 6 – Resistência de união do cimento de ionômero de vidro de acordo com a condição do substrato dentinário, período de envelhecimento e concentração de nanopartículas adicionadas ao material.

Condição do Substrato	Material	Resistencia de união (em Mpa)	
		Média $\pm$ DP*	
		Período de envelhecimento	
		24 horas	6 meses
Dentina Sadia	CIV	8,4 $\pm$ 2,7	7,4 $\pm$ 2,0
	CIV + CLX-HMP 1%	7,4 $\pm$ 2,1	6,7 $\pm$ 2,4
	CIV + CLX-HMP 2%	6,8 $\pm$ 1,8	6,0 $\pm$ 1,8
	CIV + CLX-HMP 5%	5,8 $\pm$ 2,6	5,1 $\pm$ 1,3
Dentina Afetada por cárie	CIV	6,2 $\pm$ 2,0	5,0 $\pm$ 3,1
	CIV + CLX-HMP 1%	5,6 $\pm$ 2,7	5,1 $\pm$ 3,9
	CIV + CLX-HMP 2%	5,6 $\pm$ 3,0	3,6 $\pm$ 2,0
	CIV + CLX-HMP 5%	5,3 $\pm$ 1,4	3,5 $\pm$ 3,4

\* n=10 por grupo, com exceção para os grupos CIV + CLX-HMP 2% (n=9) e CIV + CLX-HMP 5% (n=8), no período de 6 meses, em dentina afetada por cárie.

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 7 mostra o número e a porcentagem de falhas de acordo com o tipo. Apenas a condição do substrato mostrou uma influência significativa nos tipos de falha (Qui-quadrado;  $p=0,009$ ), tendo a união do material com a dentina sadia apresentado 20% de falhas adesivas, enquanto na união com a dentina afetada por cárie, a porcentagem de falhas adesivas foi de apenas 3,75%. Também foi observada maior porcentagem (5%) de falhas coesivas na dentina afetada por cárie quando comparada com a dentina sadia (1,25%). Falhas mistas prevaleceram para todos os materiais ( $\geq 52,5\%$ ), independente do período de envelhecimento dos espécimes e da condição do substrato. Falhas pré-teste ocorreram em apenas 3 espécimes na dentina afetada por cárie, no período tardio.

Tabela 7 – Distribuição dos tipos de falha em função das condições do substrato, período de envelhecimento e concentração de nanopartículas de CLX-HMP adicionadas ao cimento de ionômero de vidro.

		Tipo de Falha*					TOTAL	valor de p
		Adesiva	Mista	Coesiva de material	Coesiva de Dentina	Pré-teste		
Substrato	Dentina sadia	16 (20,00%)	47 (58,75%)	16 (20,00%)	1 (1,25%)	0 (0,00%)	80 (100,00%)	0,009**
	Dentina afetada por cárie	3 (3,75%)	48 (60,00%)	22 (27,25%)	4 (5,00%)	3 (3,75%)	80 (100,00%)	
Período	24 horas	11 (13,75%)	47 (58,75%)	20 (25,00%)	2 (2,50%)	0 (0,00%)	80 (100,00%)	0,866
	6 meses	8 (10,00%)	48 (60,00%)	18 (22,50)	3 (3,75%)	3 (3,75%)	80 (100,00%)	
Material	CIV	7 (17,5%)	23 (57,5%)	10 (25,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	40 (100,00%)	0,081
	CIV + HMP-CLX 1%	7 (17,50%)	26 (65,00%)	6 (15,00%)	1 (2,50%)	0 (0,00%)	40 (100,00%)	
	CIV + HMP-CLX 2%	3 (7,50%)	21 (52,50%)	11 (27,50%)	4 (10,00%)	1 (2,50%)	40 (100,00%)	
	CIV + HMP-CLX 5%	2 (5,00%)	25 (62,50%)	11 (27,50%)	0 (0,00%)	2 (5,00%)	40 (100,00%)	

\* Os valores representam frequência absoluta (porcentagem do total de espécimes do grupo)

\*\* Diferença estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% (teste de Qui-quadrado;  $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaboração própria.

## 6 DISCUSSÃO

Aspectos desfavoráveis da cavidade bucal, como alterações constantes de temperatura e pH salivar, contribuem para a solubilidade de alguns materiais restauradores e ocorrência de deficiências na qualidade do selamento marginal das restaurações, proporcionando condições propícias para o desenvolvimento de lesões de cárie secundária (Naik et al.<sup>46</sup>, 2017). As propriedades físico-químicas do material restaurador podem exercer influência sobre o volume e a cariogenicidade do biofilme formado ao redor e sobre as restaurações, e, desta forma, interferir diretamente no desenvolvimento dessas lesões (Lai et al.<sup>39</sup>, 2013; Naik et al.<sup>46</sup>, 2017).

Entre os materiais existentes, os cimentos de ionômero de vidro (CIVs) tem se mostrado a melhor opção em inúmeras situações clínicas (Tyas<sup>64</sup>, 1991), pois possuem adesão às estruturas dentárias requerendo um mínimo preparo da superfície, menor sensibilidade à técnica do que as resinas compostas, biocompatibilidade e liberação de íons (Hook et al.<sup>31</sup>, 2014). Estudos in vitro demonstraram que a liberação de flúor oferece um efeito protetor contra a desmineralização dos tecidos dentários próximos a restauração (Hicks, Flaitz<sup>30</sup>, 2000; Glasspole et al.<sup>25</sup>, 2001). Além de atuar no processo de des/remineralização dos tecidos dentários, o flúor pode interferir na formação do biofilme (Wiegand et al.<sup>67</sup>, 2007). No entanto, como a liberação de íons apresenta um padrão inicial intenso e diminui rapidamente, a capacidade dos CIVs em controlar a formação do biofilme é limitada (Al Naimi et al.<sup>2</sup>,2008).

Entre as diversas substâncias utilizadas para melhorar a propriedade antibacteriana dos CIVs, a clorexidina tem sido a mais pesquisada por não provocar uma real resistência antimicrobiana (Meyer, Cookson<sup>45</sup>, 2010;Barbour

et al.<sup>5</sup>, 2013; Garner, Barbour.<sup>24</sup>, 2015). As formas mais comuns de apresentação da clorexidina usadas em associação com os CIVs são: o diacetato, forma estável e de fácil mistura ao pó (Türkun et al.<sup>62</sup>, 2008), e o digluconato, um sal altamente solúvel em água (Barbour et al.<sup>5</sup>, 2013). Embora estudos *in vitro* tenham mostrado algum sucesso com estas formas de apresentação, o uso da clorexidina em concentrações elevadas acarreta alterações indesejáveis nas propriedades físico-mecânicas do material e a eficácia antimicrobiana dura apenas algumas semanas (Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006; Türkun et al.<sup>62</sup>, 2008; Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011).

Com o intuito de potencializar o efeito antibacteriano a longo prazo de um CIV de alta viscosidade, propôs-se neste estudo, associar este cimento a nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (NPs CLX-HMP), uma tecnologia recentemente desenvolvida.

A síntese deste tipo de nanopartículas se dá pela reação de precipitação entre a solução aquosa de digluconato de clorexidina a 20% e o hexametáfosfato de sódio em água deionizada, sob agitação e temperatura ambiente controlada, resultando na formação instantânea de um colóide constituído por NPs CLX-HMP. Com base no estudo de Hook et al.<sup>31</sup> (2014) no qual foram observados danos às propriedades físico-mecânicas do CIV após a adição de NPs CLX-HMP numa concentração de 10% ou mais, e também, em treinamento prévio ao presente estudo, onde verificou-se que a manipulação do material se tornou bastante difícil e o material extremamente seco e sem brilho com a adição dessa mesma concentração, optou-se pela adição de nanopartículas ao CIV nas concentrações de 1% a 5%.

A caracterização das nanopartículas por espalhamento de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering – DLS) indicou a presença de estruturas de até 100 nm. Com a alteração do tempo de equilíbrio, identificou-se a presença de partículas bem maiores, as quais foram caracterizadas como agregados de nanopartículas, pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura. Estas observações estão de acordo com aquelas feitas por Barbour et al.<sup>5</sup> (2013) e Hook et al.<sup>31</sup> (2014) que sintetizaram nanopartículas de CLX-HMP usando metodologia semelhante a usada neste estudo.

Após a síntese e caracterização das nanopartículas, as mesmas foram associadas ao CIV e foi realizada uma análise das propriedades físico-químicas, mecânica e antibacteriana do material resultante. Para melhor compreensão destes aspectos, os mesmos serão discutidos em tópicos independentes.

### **6.1 Liberação de clorexidina e de flúor antes e após recarregamento**

Pressupõe-se que dois mecanismos de liberação da CLX ocorram simultânea e independentemente nos CIVs funcionalizados: um “washout” inicial que ocorre antes da presa final dos CIVs, seguido por uma liberação por difusão que ocorre de maneira mais lenta (Palmer et al.<sup>50</sup>, 2004).

A liberação da clorexidina pelos CIVs em água foi previamente demonstrada (Ribeiro, Ericson<sup>52</sup>, 1991, Palmer et al.<sup>50</sup>, 2004; Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006), no entanto, é importante ressaltar que outros compostos iônicos são liberados dos CIVs juntamente com a CLX, e que a solubilidade da mesma nesta solução pode ser diferente daquela encontrada em água pura. (Palmer et al.<sup>50</sup>, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que houve liberação da clorexidina em pequena quantidade, apenas quando as NPs CLX-HMP foram adicionadas ao CIV nas concentrações de 2% e 5%, e que esta ocorreu durante todo o período estudado. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os períodos de 1 h e 15 dias em ambos os grupos. Ribeiro e Ericson<sup>52</sup>, (1991) sugerem que uma baixa liberação possa ocorrer pela formação de sais insolúveis da clorexidina com os componentes silicato e fosfato presentes no CIV, e que a CLX associada ao CIV na forma de pó pode ser retida dentro da matriz do cimento como partículas encapsuladas que só são liberadas à medida que o material sofre deterioração.

Igualmente importante é a reação que ocorre entre o flúor e a clorexidina. Barkvoll et al.<sup>6</sup> (1988), demonstraram que quando o digluconato de clorexidina e o monofluorofosfato de sódio foram associados em uma concentração clinicamente relevante, houve uma reação de precipitação e o teor de CLX dissolvido na solução foi reduzido em 96%.

No presente estudo, a liberação de CLX não apresentou uma relação dose-dependente, não sendo detectada diferença significativa entre os grupos contendo 2% e 5% de NPs CLX-HMP. Estes resultados diferem daqueles observados em outros estudos utilizando as mesmas nanopartículas associadas ao CIV. Hook et al.<sup>31</sup> (2014) adicionaram NPs CLX-HMP à um CIV nas concentrações de 0% a 20% observando uma liberação cumulativa de CLX sustentada por 33 dias. Entretanto, verificaram um aumento significativo na liberação relacionado ao aumento da concentração de nanopartículas adicionadas ao CIV, a partir da concentração de 2%. Bellis et al.<sup>9</sup> (2016) desenvolveram uma pasta concentrada de NPs CLX-HMP e a utilizaram nas

concentrações de 0,17%, 0,34%, 0,85%, 1,70% em massa de nanopartículas (1%, 2%, 5% e 10% em massa da pasta) e também observaram um comportamento dose dependente. Alguns fatores podem ter contribuído para que estas diferenças tenham ocorrido, como as características inerentes ao cimento utilizado. Alterações na viscosidade e dureza dos CIVs, podem resultar em variações na quantidade de CLX liberada independente do sal utilizado e da concentração adicionada (Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006). A solução de armazenagem dos espécimes é um outro fator que pode determinar diferenças na liberação de CLX. Nos estudos conduzidos por Hook et al.<sup>31</sup> (2014) e Bellis et al.<sup>9</sup> (2016), a saliva artificial foi usada como meio de armazenagem, enquanto neste estudo foi usada a água deionizada que permite a liberação de íons e componentes do material sem nenhuma influência de minerais ou moléculas orgânicas que estão presentes na saliva artificial.

Durante a reação de presa uma variedade de componentes iônicos é liberado pelos CIVs, sendo o flúor o íon de maior interesse. Sua liberação a curto e longo prazo está relacionada às características da matriz do material, reação de presa e conteúdo de fluoreto (Wiegand et al.<sup>67</sup>, 2007; Naik et al.<sup>46</sup>, 2017). Três mecanismos distintos são descritos para a liberação de flúor dos CIVs: dissolução superficial, difusão através de microcanais e poros e difusão em massa (Kuhn, Wilson<sup>37</sup>, 1985; Attar, Turgut.<sup>4</sup>, 2003).

No presente estudo, a liberação de flúor ocorreu durante todo o período de análise, em todos os grupos. Após o pico inicial de liberação de íons pelos CIVs convencionais, a liberação desacelera podendo seguir por um período prolongado, pois nesta fase as partículas de vidro são dissolvidas no meio

acidificado da matriz de hidrogel (Vermeersch et al.<sup>66</sup>, 2001; Wiegand et al.<sup>67</sup>, 2007).

A concentração de nanopartículas associada ao CIV e o período de análise tiveram influência significativa na liberação de flúor, sendo que uma interação entre esses fatores foi observada. Cada grupo estudado apresentou liberação crescente de íons flúor durante os 30 dias de armazenagem, o que era esperado uma vez que uma análise cumulativa foi realizada. Após 7 dias até 30 dias, a liberação de flúor nos grupos contendo 2% e 5% de NPs CHX- HMP foi significativamente maior do que no grupo CIV (controle), o que pode ter sido determinado por uma maior dissolução do material. Hook et al.<sup>31</sup> (2014) observaram valores semelhantes de liberação de flúor entre o grupo controle sem nanopartículas e os grupos contendo 2% e 5% de NPs CHX- HMP, e valores de liberação numericamente maiores ao final do experimento (33 dias) para o grupo contendo 20% de nanopartículas. Para estes autores, é possível que nessa concentração, as NPs CLX-HMP tenham alterado a reação de presa do material, tornando o flúor mais instável na estrutura do cimento. Uma alteração na reação de presa dos cimentos pode também torná-los mais solúveis levando à uma maior liberação de flúor (Vermeersch et al.<sup>66</sup>, 2001).

Diferentes resultados foram observados quando digluconato de clorexidina foi associado a um CIV convencional (Hoszek, Ericson<sup>33</sup>, 2008). Após 60 dias, a liberação cumulativa média de flúor no grupo contendo clorexidina foi cerca de 27% menor quando comparada ao CIV sem adição do agente antibacteriano. Os autores acreditam que a interação entre o fluoreto e a molécula catiônica de CLX tenha tornado o flúor menos disponível para a liberação. Um estudo sobre a compatibilidade da clorexidina e do flúor em

solução aquosa já citado anteriormente demonstrou que a combinação destes dois elementos reduziu a disponibilidade de ambos para a liberação (Barkvoll.<sup>6</sup>, 1988).

Após a recarga com gel neutro de fluoreto de sódio 2%, padrão semelhante de liberação foi observado para todos os grupos, ou seja, a concentração de nanopartículas e o período estudado tiveram influência significativa na liberação de flúor. A liberação após a aplicação de agentes fluoretados pode ocorrer parcialmente por “washout” dos íons flúor que estavam retidos na superfície ou nos poros do material restaurador (Gao et al.<sup>23</sup>, 2000; Wiegand et al.<sup>67</sup>, 2007). No entanto na maioria dos trabalhos, a liberação de flúor dos espécimes após a exposição ao flúor, não alcançou os níveis de liberação iniciais do material (Attar, Turgut<sup>4</sup>., 2003; Wiegand et al.<sup>67</sup>, 2007). O tipo, a concentração e a frequência de aplicação do flúor assim como o tipo e a permeabilidade do material restaurador são os principais fatores que afetam a capacidade do mesmo em atuar como um reservatório de flúor (Kucukyilmaz et al.<sup>38</sup>, 2017).

Em suma, uma comparação da liberação e recarregamento de flúor pelos materiais restauradores dentre os diversos estudos publicados na literatura se torna dificultada devido a diversidade nos métodos e protocolos experimentais existentes. A composição do pó e do líquido do CIV (Verrmeersch et al.<sup>66</sup>, 2001), bem como o tamanho da amostra, os meios utilizados para medir a liberação e absorção de flúor e o volume do meio utilizado são alguns exemplos (Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011). Assim como no presente estudo, a água deionizada tem sido a solução de escolha para armazenagem dos espécimes em diversos outros estudos (Hoszek, Ericson<sup>33</sup>, 2008; Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011; Kucukyilmaz et al.<sup>38</sup>,

2017). Um importante estudo de Carvalho e Cury<sup>13</sup> (1999) demonstrou que a liberação de flúor de diferentes materiais odontológicos manteve um padrão independente da solução de armazenagem utilizada. No entanto, o tipo de solução influenciou significativamente a quantidade de flúor liberado de cada material. Desta forma, comparações devem ser feitas considerando o comportamento dos materiais ao invés da quantidade absoluta de flúor liberado (Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011).

## **6.2 Composição microbiológica, atividade metabólica e biomassa do biofilme formado sobre a superfície do material**

A atividade antimicrobiana dos CIVs associados à CLX em diferentes formas de apresentação e concentrações, tem sido extensivamente estudada (Ribeiro, Ericson<sup>52</sup>, 1991; Botelho<sup>10</sup>, 2003; Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006; Frencken et al.<sup>22</sup>, 2007; Hoszek, Ericson<sup>33</sup>, 2008; Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011; Becci et al.<sup>8</sup>, 2016; Bellis et al.<sup>9</sup>, 2016). A clorexidina é um agente antimicrobiano com eficácia comprovada contra os microrganismos patogênicos da cavidade bucal (de Castilho et al.<sup>14</sup>, 2013). Seu mecanismo de ação ocorre por deslocamento de cátions divalentes ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) associados a grupos de fosfolipídeos (Davies<sup>20</sup>, 1973) e, em altas doses, a clorexidina provoca alterações na membrana celular bacteriana com rápida perda de conteúdo celular, levando a um desequilíbrio osmótico (Chawner, Gilbert<sup>16</sup>, 1989).

Na maioria das pesquisas sobre a eficácia antibacteriana dos CIVs associados a CLX (Ribeiro, Ericson<sup>52</sup>, 1991; Botelho<sup>10</sup>, 2003; Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006; Hoszek, Ericson<sup>33</sup>, 2008; Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011; Bellis et al.<sup>9</sup>, 2016), foram aplicados testes preliminares, de baixa complexidade, como o teste de difusão

em agar, que tem como desvantagem não fornecer nenhuma informação sobre a viabilidade dos microrganismos testados. Ou ainda, usaram microrganismos na forma planctônica, cujo comportamento frente aos agentes antibacterianos é diferente daquele apresentado pelos microrganismos organizados em biofilmes, como ocorre na cavidade bucal (ten Cate<sup>15</sup>, 2006; Kim et al.<sup>36</sup>, 2016; Touzel et al.<sup>61</sup>, 2016).

A adição de clorexidina aos CIVs tem como objetivo interferir nos microrganismos cariogênicos pela alteração da sua atividade metabólica ou da capacidade de adesão desses microrganismos ao material (Botelho<sup>10</sup>, 2003; Palmer et al.<sup>50</sup>, 2004). Com base nesse aspecto, foi empregado neste estudo, o modelo de biofilme polimicrobiano, também conhecido como biofilme multi-espécie ou biofilme microcosmo. As principais características deste modelo são a sua complexidade ecológica, bem como a capacidade de simular o ambiente bucal, fornecendo uma versão da placa bacteriana natural *in vitro*, sob condições altamente controladas (Tang et al.<sup>59</sup>, 2003; Signori et al.<sup>55</sup>, 2016). Para o crescimento dos biofilmes, os espécimes foram suspensos verticalmente em poços de placas de microtitulação, o que permitiu uma real aderência bacteriana ao invés de uma sedimentação sobre a superfície (Exterkate et al.<sup>21</sup>, 2010). Utilizando este método, os espécimes puderam ser manipulados sem que houvesse perturbações ao biofilme formado em sua superfície.

Sistemas onde os biofilmes são desenvolvidos *in vitro* são uma boa alternativa quando vários testes e condições precisam ser analisados (van de Sande et al.<sup>53</sup>, 2011). Um *pool* de saliva de quatro doadores foi utilizado como inóculo, por ser mais interessante em termos microbiológicos, uma vez que pode existir uma grande variabilidade de indivíduo para indivíduo. A saliva tem sido o

inóculo mais comumente utilizado em estudos prévios com biofilmes polimicrobianos (Exterkate et al.<sup>21</sup>, 2010; van de Sande et al.<sup>53</sup>, 2011; Kim et al.<sup>36</sup>, 2016).

Uma melhor compreensão sobre a atividade antibacteriana do CIV modificado exigiu uma análise de diversas características do biofilme formado sobre o material. Foram estudados tópicos relevantes como a composição microbiológica, avaliação da atividade metabólica do biofilme e sua biomassa. Em nenhum dos testes houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos contendo NPs CLX-HMP, ou seja, a associação das nanopartículas, neste estudo, não potencializou a atividade antibacteriana do CIV. Este fato pode ser explicado em parte pela baixa liberação de CLX, já discutida anteriormente. Entretanto, a diferenciação dos microrganismos em fenótipos mais resistentes também tem sido hipotetizada (Stewart, Constenton<sup>57</sup>, 2001).

Certas limitações da clorexidina contra microrganismos organizados em biofilmes já foram descritas, podendo-se observar que alguns microrganismos parecem ser mais tolerantes à este agente antibacteriano. Corroborando com o presente estudo, Becci et al.<sup>8</sup> (2016) verificaram que o biofilme formado in situ sobre espécimes contendo 0,5%, 1% e 2% de diacetato de clorexidina, não mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos contendo CLX, quando foi realizada a contagem de microrganismos totais e estreptococos do grupo mutans. Embora a CLX tenha se mostrado efetiva contra *Streptococcus mutans* in vitro, por exemplo, sua efetividade se torna reduzida quando estes microrganismos estão organizados em biofilmes (ten Cate<sup>15</sup>, 2006; Kim et al.<sup>36</sup>, 2016; Touzel et al.<sup>61</sup>, 2016). Além disso, a microbiota

bucal de cada indivíduo apresenta diferenças substanciais e o desenvolvimento dos biofilmes in vivo não ocorrem sob condições controladas (Kim et al.<sup>36</sup>, 2016), as quais são necessárias para uma melhor avaliação de materiais em estágio de desenvolvimento como os CIVs modificados por NPs CLX-HMP.

Levando em consideração a complexidade dos biofilmes bucais, para atingir um real controle sobre a patogenicidade e o desenvolvimento desses microrganismos, mais investigações devem ser realizadas. Outros aspectos do biofilme devem ser avaliados, uma vez que este estudo foi um dos pioneiros a pesquisar a eficácia antimicrobiana das NPs CLX-HMP em condições próximas a da cavidade bucal.

### **6.3 Resistência de união à dentina sadia e afetada por cárie, nos períodos imediato e após seis meses**

Os CIVs apresentam como uma de suas principais características a adesão ao esmalte e à dentina, requerendo assim um mínimo preparo da superfície dentária previamente à sua aplicação. O mecanismo de adesão dos CIVs à dentina é complexo e ainda não foi completamente elucidado. Segundo Lin et al.<sup>44</sup> (1992), ocorre uma interligação mecânica do cimento com os túbulos dentinários e o desenvolvimento de uma camada de troca iônica adjacente à dentina. Essa camada é constituída por íons cálcio e fosfato do substrato dentário e íons alumínio, silício, fluoreto, cálcio e estrôncio do material (Colucci et al.<sup>18</sup>, 2014)

Dentre os diversos fatores que podem afetar os valores de resistência de união in vitro estão o substrato biológico e a forma de armazenagem dos

espécimes (Heintze et al.<sup>29</sup>, 2013). No corrente estudo, a resistência de união aos substratos dentina sadia e afetada por cárie, foi avaliada imediatamente e após seis meses de armazenagem em saliva artificial. O ensaio mecânico selecionado para tal investigação foi o de microcislamento, pois métodos como o ensaio de microtração, embora eficazes para uso em pequenas áreas, são de difícil condução e preparo das amostras, especialmente no caso dos CIVs.

Clinicamente, a dentina sadia e a afetada por cárie podem coexistir nos preparos cavitários e uma adesão adequada a estes dois substratos é esperada. A dentina afetada, embora possua potencial de remineralização, difere da dentina sadia pois apresenta-se parcialmente desmineralizada, seus túbulos são ocluídos por cristais minerais e sua dentina intertubular exhibe um maior grau de porosidade devido à perda de mineral (Tosun et al.<sup>60</sup>, 2008; Zheng et al.<sup>72</sup>, 2003).

Neste estudo, os valores de resistência de união (RU) mostraram-se significativamente menores quando a união foi realizada em dentina afetada. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que compararam a resistência adesiva dos CIVs a estes dois substratos (Choi et al.<sup>17</sup>, 2006; Lenzi et al.<sup>43</sup>, 2013; Kucukyilmaz et al.<sup>38</sup>, 2017). Um menor conteúdo de íons cálcio na dentina cariada pode prejudicar a adesão, uma vez que a união química inicial dos CIVs envolve a quelação dos grupos carboxílicos do ácido polialcenoico com o cálcio da hidroxiapatita (Yoshida et al.<sup>71</sup>, 2000; Choi et al.<sup>17</sup>, 2006; Kucukyilmaz et al.<sup>38</sup>, 2017). Além disso, a superfície da dentina afetada pode reter traços de ácido láctico envolvido na lesão cariada, que reagem com as partículas de vidro formando sais de lactato de cálcio e de alumínio (Nicholson et al.<sup>49</sup>, 2000), com capacidade de afetar a qualidade da adesão.

Poucos trabalhos avaliaram a resistência de união dos CIVs à dentina afetada por cárie, principalmente dos CIVs modificados por agentes antibacterianos, e nenhum desses trabalhos utilizou CIVs modificados por NPs CLX-HMP, portanto uma comparação mais aprofundada dos resultados obtidos neste estudo é dificultada.

Colluci et al.<sup>18</sup> (2014) analisaram, dentre outras variáveis, a influência da armazenagem de espécimes confeccionados em CIV por seis meses, na sua resistência de união à dentina. Assim como neste estudo, os autores observaram uma redução da RU após a armazenagem, embora a superfície dentinária tenha sido preparada com instrumentos rotatórios. Hoshika et al.<sup>32</sup> (2015) estudaram o efeito do pré-tratamento do substrato e do envelhecimento dos espécimes sobre a RU e a morfologia interfacial da união do CIV à dentina. Após 6 meses de armazenagem em água destilada, a RU reduziu significativamente nos grupos em que a dentina não havia recebido nenhum tipo de pré-tratamento.

Quando a RU foi avaliada independentemente da condição do substrato dentinário e do período de envelhecimento, diferenças em relação ao grupo controle foram observadas apenas para o grupo contendo NPs CLX-HMP 5%, que apresentou valores de RU estatisticamente menores. É de amplo conhecimento que a adição de CLX aos CIVs pode alterar as propriedades físico-mecânicas do material, de acordo com a concentração utilizada (Palmer et al.<sup>50</sup>, 2004; Takahashi et al.<sup>58</sup>, 2006; Tüzüner et al.<sup>63</sup>, 2011; de Castilho et al.<sup>14</sup>, 2013)

Bellis et al.<sup>9</sup> (2016) constataram a deterioração das propriedades mecânicas do CIV quando uma pasta de NPs CLX-HMP em concentração acima de 2% foi adicionada ao cimento. Segundo os autores, com o aumento da concentração da pasta de nanopartículas, a relação entre o poliácido e o vidro é

alterada, o que afeta a reação de presa do material. Uma menor quantidade de vidro reduz a quantidade de íons bi e trivalentes disponíveis para uma interligação com a matriz de poliácido. Assim, os espécimes contendo maior concentração de nanopartículas tem maior propensão a não completarem sua reação de presa, resultando em uma menor resistência mecânica.

Tais resultados, bem como os encontrados em nosso trabalho, diferem daqueles observados por Hook et al.<sup>31</sup> (2014) que ao analisarem resistência à tração diametral de CIVs modificados por NPs CLX-HMP em concentrações de até 10% não observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Embora alguns estudos usando diacetato/digluconato de CLX não tenham descrito alteração em determinadas propriedades físico-mecânicas do CIV (Sanders et al.<sup>54</sup>, 2002, Türkun et al.<sup>62</sup>, 2008), concentrações elevadas de CLX devem ser cautelosamente analisadas antes de sua indicação para o uso, uma vez que podem exibir uma possível toxicidade. Segundo de Castilho et al.<sup>14</sup> (2013) altas concentrações de CLX causam danos às células odontoblásticas.

Assim como a análise dos valores de RU, a classificação dos padrões de fratura dos espécimes é parte importante do teste de resistência de união. Os padrões de fratura estão relacionados às propriedades de todos os componentes envolvidos na adesão: material, interface de união e substrato, além de sofrerem a influência do teste mecânico utilizado (Cruz et al.<sup>19</sup>, 2012).

Estudos tem demonstrado predominância de fraturas coesivas em material quando CIVs são submetidos a ensaios de resistência de união (Jedrychowski et al.<sup>34</sup>, 1983; Choi et al.<sup>17</sup>, 2006). Estes resultados têm sido interpretados como uma indicação de que os valores de RU representam uma baixa resistência do próprio material testado ao invés de sua verdadeira

resistência adesiva à dentina. Uma maior tendência a fraturas coesivas pelo CIVs pode ocorrer também devido a numerosas porosidades na estrutura do material, que podem atuar como pontos de estresse para que falhas coesivas ocorram com o tempo (Hoshika et al.<sup>32</sup>, 2015). No presente estudo, falhas coesivas em material foram observadas em 15,0% a 27,5% dos espécimes, no entanto, as fraturas do tipo mistas foram prevalentes (acima de 52% dos espécimes) para todos os materiais independente do substrato e do período de armazenagem.

Além disso, foi observado um maior número de falhas coesivas em dentina afetada por cárie. Neste grupo, após a armazenagem dos espécimes no período tardio houveram falhas prematuras, ou seja previamente ao ensaio mecânico. Isto se deve a uma baixa resistência de união apresentada pelos CIVs modificados a este substrato.

Em síntese, diversas funcionalidades podem ser atribuídas as NPs CLX-HMP e seu uso em associação aos CIVs parece ser promissor. Porém, estudos aprimorando a metodologia de síntese e incorporação bem como a avaliação de outras propriedades do material modificado ainda são necessários para que essa nova tecnologia possa ser indicada clinicamente com segurança e eficácia.

## CONCLUSÃO

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

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

**REFERÊNCIAS\***

1. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res.* 2010; 89 (11): 1175–86.
2. Al-Naimi OT, Itota T, Hobson RS, McCabe JF. Fluoride release for restorative materials and its effect on biofilm formation in natural saliva. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(3): 1243-8.
3. Askar H, Brouwer F, Lehmensiek M, Paris S, Schwendicke F. The association between loading of restorations and secondary caries lesions is moderated by the restoration material elasticity. *J Dent.* 2017; 58: 74-9.
4. Attar N, Turgut MD. Fluoride release and uptake capacities of fluoride-releasing restorative materials. *Oper Dent.* 2003; 28(4): 395-402.
5. Barbour ME, Maddocks SE, Wood NJ, Collins AM. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 3507-19
6. Barkvoll P, Rölla G, Bellagamba S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988; 96(1): 30-3.
7. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94 (2): 240-5.

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

8. Becci ACO, Marti LM, Zuanon ACC, Brighenti FL, Spolidório DMP, Giro EMA. Analysis of the biofilm formed on the surface of a glass-ionomer cement associated with different concentrations of chlorhexidine diacetate. *Am J Dent*. 2016; 29(5): 277-81.
9. Bellis CA, Nobbs AH, O'Sullivan DJ, Holder JA, Barbour ME. Glass ionomer cements functionalised with a concentrated paste of chlorhexidine hexametaphosphate provides dose-dependent chlorhexidine release over at least 14 months. *J Dent*. 2016; 45: 53-8.
10. Botelho MG. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res*. 2003; 37(2): 108-14.
11. da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. *J Dent*. 2014; 42(3): 256-62.
12. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Santos Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Synergistic effect of fluoride and sodium hexametaphosphate in toothpaste on enamel demineralization in situ. *J Dent*. 2015; 43(10): 1249-54.
13. Carvalho AS, Cury JA. Fluoride release from some dental materials in different solutions. *Oper Dent*. 1999; 24(1): 14.
14. de Castilho AR, Duque C, Negrini T de C, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA, et al. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent*. 2013; 41(2): 155-63.

15. ten Cate JM. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*. 2006; 94(1): 1-9.
16. Chawner JA, Gilbert P. Adsorption of alexidine and chlorhexidine to *Escherichia coli* and membrane components. *Int J Pharm*. 1989; 55 (2-3): 209-15.
17. Choi K, Oshida Y, Platt JA, Cochran MA, Matis BA, Yi K. Microtensile bond strength of glass ionomer cements to artificially created carious dentin. *Oper Dent*. 2006; 31(5): 590-7.
18. Colucci V, de Araújo Loiola AB, da Motta DS, do Amaral FL, Pécora JD, Corona SA. Influence of long-term water storage and thermocycling on shear bond strength of glass-ionomer cement to Er:YAG laser-prepared dentin. *J Adhes Dent*. 2014; 16(1): 35-9.
19. Cruz JB, Lenzi TL, Tedesco TK, Guglielmi Cde A, Raggio DP. Eroded dentin does not jeopardize the bond strength of adhesive restorative materials. *Braz Oral Res*. 2012; 26(4): 306-12.
20. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl*. 1973; 12: 68-75.
21. Exterkate RAM, Crielaard W, Ten Cate JM. Different response to amine fluoride by streptococcus mutans and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res*. 2010; 44(4): 372–9.
22. Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, et al. Antibacterial effect of chlorhexidine- containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study. *Caries Res*. 2007; 41(2): 102-7.

23. Gao W, Smales RJ, Gale MS. Fluoride release/uptake from newer glass-ionomer cements used with the ART approach. *Am J Dent.* 2000; 13(4): 201-4.
24. Garner S, Barbour ME. Nanoparticles for controlled delivery and sustained release of chlorhexidine in the oral environment. *Oral Dis.* 2015; 21(5): 641-4.
25. Glasspoole EA, Erickson RL, Davidson CL. Demineralization of enamel in relation to the fluoride release of materials. *Am J Dent.* 2001; 14(1): 8-12.
26. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102 (4): 544-50.
27. Hara AT, Turssi CP, Ando M, González-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL Jr, et al. Influence of fluoride-releasing restorative material on root dentine secondary caries in situ. *Caries Res.* 2006; 40(5): 435-9.
28. Haseeb R, Lau M, Sheah M, Montagner F, Quiram G, Palmer K, et al. Synthesis and characterization of new chlorhexidine-containing nanoparticles for root canal disinfection. *Materials.* 2016; 9(6): 452.
29. Heintze SD. Clinical relevance of tests on bond strength, microleakage and marginal adaptation. *Dent Mater.* 2013; 29(1): 59-84.
30. Hicks MJ, Flaitz CM. Resin-modified glass-ionomer restorations and in vitro secondary caries formation in coronal enamel. *Quintessence Int.* 2000; 31(8): 570-8.

31. Hook ER, Owen OJ, Bellis CA, Holder JA, Sullivan DJO, Barbour ME. Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. *J Nanobiotechnology*. 2014; 23: 12-3.
32. Hoshika S, De Munck J, Sano H, Sidhu SK, Van Meerbeek B. Effect of conditioning and aging on the bond strength and interfacial morphology of glass-ionomer cement bonded to dentin. *J Adhes Dent*. 2015; 17(2): 141-6.
33. Hoszek A, Ericson D. In vitro fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine gluconate. *Oper Dent*. 2008; 33 (6): 696-701.
34. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil*. 1983; 10(5): 373-81.
35. Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol*. 2004; 49(10): 789-98.
36. Kim YS, Kang SM, Lee ES, Lee JH, Kim BR, Kim BI. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *J Biomed Opt*. 2016; 21(10): 101409.
37. Kuhn AT, Wilson AD. The dissolution mechanisms of silicate and glass-ionomer dental cements. *Biomaterials* 1985; 6(6): 378-82.
38. Kucukyilmaz E, Savas S, Kavrik F, Yasa B, Botsali MS. Fluoride release/recharging ability and bond strength of glass ionomer cements to sound and caries-affected dentin. *Niger J Clin Pract*. 2017; 20(2): 226-34.

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

47. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater.* 2015; 31(11): 247-77.
48. Nhung DTT, Freydiere AM, Constant H, Falson F, Pirot F. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocápsulas (Nanoclhorex®). *Int J Pharm.* 2007; 334(1-2): 166-72.
49. Nicholson JW, Aggarwal A, Czarnecka B, Limanowska-Shaw H. The rate of change of pH of lactic acid exposed to glass-ionomer dental cements. *Biomaterials.* 2000; 21(19): 1989-93.
50. Palmer G, Jones FH, Billington RW, Pearson GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. *Biomaterials.* 2004; 25(23): 5423–31.
51. Papagiannoulis L, Kakaboura A, Eliades G. In vivo vs in vitro anticariogenic behavior of glass-ionomer and resin composite restorative materials. *Dent Mater.* 2002; 18(8): 561-9.
52. Ribeiro J, Ericson D. In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. *Scand J Dent Res.* 1991; 99(6): 533-40
53. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011; 27(9): 1057-63.
54. Sanders BJ, Gregory RL, Moore K, Avery DR. Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with chlorhexidine. *J Oral Rehabil.* 2002; 29(6): 553-8.

55. Signori C, van de Sande FH, Maske TT, de Oliveira EF, Cenci MS. Influence of the inoculum source on the cariogenicity of in vitro microcosm biofilms. *Caries Res.* 2016; 50(2): 97-103.
56. Soares JA, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Ito IY. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated p-monochlorophenol in calciumhydroxide-based root canal dressings. *Braz Dent J.* 2007; 18(1): 8-15.
57. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2010; 358(14): 135-8.
58. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mat.* 2006; 22(7): 647-52.
59. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* 2003; 31 (3):161–71.
60. Tosun G, Koyuturk AE, Sener Y, Sengun A. Bond strength of two total-etching bonding systems on caries-affected and sound primary teeth dentin. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18 (1): 62–9.
61. Touzel RE, Sutton JM, Wand ME. Establishment of a multi-species biofilm model to evaluate chlorhexidine efficacy. *J Hosp Infect.* 2016; 92(2): 154-60.
62. Türkun LS, Türkun M, Ertugrul F, Ates M, Brugger S. Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine containing glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent.* 2008; 20(1): 29-44.

63. Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent.* 2011; 23(1): 46-55.
64. Tyas MJ. Cariostatic effect of glass ionomer cement: a five-year clinical study. *Aust Dent J.* 1991; 36(3): 236-9.
65. Vaara M, Jaakkola J. Sodium hexametaphosphate sensitizes *Pseudomonas aeruginosa*, several other species of *Pseudomonas*, and *E. coli* to hydrophobic drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989. 33(10); 1741-7.
66. Vermeersch G, Leloup G, Vrenen J. Fluoride release from glass ionomer cements, compomers and resin composites. *J Oral Rehabil.* 2001; 28(1): 26-32.
67. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials - fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater.* 2007; 23(3): 343-62.
68. Wood NJ, Jenkinson HF, Davis SA, Mann S, O'Sullivan DJ, Barbour ME. Chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles as a novel antimicrobial coating for dental implants *J Mater Sci Mater Med.* 2015; 26(6): 201.
69. Yengopal V, Mickenautsch S, Bezerra AC, Leal SC. Caries-preventive effect of glass ionomer and resin-based fissure sealants on permanent teeth: a meta-analysis. *J Oral Sci.* 2009; 51(3): 373-82.
70. Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent.* 2009; 34(1):18-23.

71. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellemans L, Lambrechts P, et al. Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces. *J Dent Res.* 2000; 79(2) 709-14.
72. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111(3): 243-52.

## ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
ARARAQUARA - UNESP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito da adição de nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina em propriedades de um Cimento de Ionômero de Vidro de alta viscosidade.

**Pesquisador:** Elisa Maria Aparecida Giro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 38991514.0.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 916.286

**Data da Relatoria:** 08/12/2014

#### Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa bem elaborado, no qual foi enviado para apreciação os seguintes arquivos: formulário da Plataforma Brasil; dispensa do TCLE para o item 3.6 do projeto; Declaração do Banco de Dentes; Projeto de Pesquisa; TCLE para coleta de saliva; Folha de rosto; Termo de responsabilidade; Termo de compromisso de devolução dos dentes; Termo de ressarcimento; Publicação dos resultados; Cronograma; Carta de Encaminhamento; Autorização do responsável pelo laboratório; Autorização do responsável pela Clínica A; Autorização da pesquisa.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as propriedades físico – químicas, antibacteriana e mecânica de um cimento de ionômero de vidro (CIV) de alta viscosidade modificado pela adição de nanopartículas de hexametáfosfato de clorexidina (CLX – HMP). Especificamente: 1- Avaliar a capacidade de liberação de clorexidina e de liberação e recarregamento de flúor. 2- Avaliar a composição microbiológica, bioquímica, a atividade metabólica e a biomassa do biofilme formado sobre a superfície do material. 3- Avaliar a resistência de união do material à dentina hígida e afetada por cárie, nos períodos imediato e após seis meses.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para os eventuais riscos foram relatados procedimentos para minimizá-los. O voluntário para

Endereço: HUMAITA 1680  
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903  
UF: SP Município: ARARAQUARA  
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 916.286

coleta de saliva será beneficiado com profilaxia e os resultados da pesquisa poderão contribuir num futuro próximo.

**Riscos:**

Com relação ao voluntário participante da pesquisa, não haverá riscos, pois este fará apenas a doação da saliva, não tendo contato direto com os materiais estudados (Cimento de Ionômero de Vidro e nanopartículas de hexametáfosfato de Clorexidina nas concentrações de 1%, 2% e 5%). Além disso, para a coleta da saliva, eventuais riscos de contaminação serão minimizados pelo uso de materiais estéreis e descartáveis. Com relação aos

pesquisadores, durante todas as etapas da pesquisa serão utilizados os equipamentos de proteção individual (luvas, gorros, máscaras e óculos de proteção), bem como materiais descartáveis, minimizando os possíveis riscos. Os reagentes com potencial de toxicidade (como o fenol e o ácido sulfúrico, por exemplo) utilizados durante a análise bioquímica do biofilme formado sobre os espécimes, serão manipulados em capela com exaustão. Os terceiros molares extraídos serão esterilizados em óxido de etileno antes da sua utilização.

**Benefícios:**

Após a coleta da saliva, o voluntário receberá profilaxia dental e instruções de higiene bucal, realizada por um dos colaboradores da pesquisa. Isso só será informado para o voluntário no final do experimento para não influenciar na sua decisão quanto a participação ou não como voluntário na pesquisa. Os resultados desta pesquisa poderão contribuir num futuro próximo, para o desenvolvimento de um material que exiba um maior poder antibacteriano sem comprometer outras propriedades desejáveis dos cimentos de ionômero de vidro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nada a declarar.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nada existem pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: HUMAITA 1680  
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903  
UF: SP Município: ARARAQUARA  
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 916.286

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Protocolo APROVADO em reunião de 16 de dezembro de 2014.

ARARAQUARA, 16 de Dezembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Maurício Meirelles Nagle**  
**(Coordenador)**

Endereço: HUMAITA 1680  
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903  
UF: SP Município: ARARAQUARA  
Telefone: 1633-0164 Fax: 1633-0164 E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor)  
Araraquara, 04 de Agosto de 2017

Ana Carolina Becci de Souza