

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Odontologia

Delcio Ildfonso Abreu Branco

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO METACRILATO
DE METILA ENRIQUECIDO COM NANOMONTMORILONITA
CARREGADA COM METRONIDAZOL E CLOREXIDINA**

São Paulo

2018

Delcio Ildfonso Abreu Branco

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO METACRILATO
DE METILA ENRIQUECIDO COM NANOMONTMORILONITA
CARREGADA COM METRONIDAZOL E CLOREXIDINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia C. Cidreira Boaro

São Paulo

2018

B813a Branco, Delcio Ildfonso Abreu

Avaliação da atividade antimicrobiana do metacrilato de metila enriquecido com nanomontmorilonita carregada com metronidazol e clorexidina / Delcio Ildfonso Abreu Branco. – São Paulo, 2018.

41 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Santo Amaro, 2018.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Leticia Cristina Cidreira Boaro

1. Clorexidina. 2. Metronidazol. 3. Polímeros. 4. Nanopartículas. I. Boaro, Leticia Cristina Cidreira, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Delcio Ildfonso Abreu Branco

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO METACRILATO
DE METILA ENRIQUECIDO COM NANOMONTMORILONITA
CARREGADA COM METRONIDAZOL E CLOREXIDINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

São Paulo, ____ de _____ de 2018.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Letícia C. Cidreira Boaro (orientadora)

Instituição: UNISA Julgamento: _____

Profa. Dra. Lilian Costa Anami

Instituição: UNISA Julgamento: _____

Prof. Dr. Haroldo Arid Soares

Instituição: UNIMES Julgamento: _____

Conceito Final: _____

Dedico este trabalho à minha família que esteve ao meu lado, sempre me motivando a seguir em frente, neste desafio que é: me tornar mestre.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Rosa Maria Abreu Branco** e **Delcio de Santana Branco** pelo apoio incondicional.

À minha amada esposa **Cátia Regina Roriz Silva** e filha **Lívia Roriz Branco** pela torcida e compreensão durante esses anos. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos grandes mestres do programa de mestrado em odontologia da UNISA, professores doutores: **Caio, Débora, Angélica, Fabiana, Heloisa, Lílian, William, Wilson, Yeon**, em especial **Dr^a Letícia Boaro**, minha orientadora, pela paciência em me conduzir neste trabalho e pelas palavras de incentivo sempre que precisei.

Sua conduta na docência é um exemplo para mim.

À **Larissa Tavares Sampaio Silva** pelo apoio durante a fase laboratorial deste trabalho. Obrigado pela ajuda.

Aos **amigos** que conquistei nestes anos no mestrado. Obrigado por dividirem suas vitórias, angústias e conquistas comigo.

Ao **programa de mestrado em odontologia da Universidade Santo Amaro**, obrigado por me proporcionar essa experiência única.

*“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas,
e sim quem faz as verdadeiras perguntas”.*

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

A incorporação de nanocompósitos poliméricos reforçados com argila mineral na matriz de polímeros promove melhoria das propriedades mecânicas do material. Tais partículas possuem ainda a capacidade de absorção de moléculas orgânicas, o que possibilita a mesma de ser um veículo de liberação controlada de fármacos. O presente trabalho objetiva comparar a atividade antimicrobiana do metacrilato de metila (MMA) enriquecido com montmorilonita (MMT) carregada com metronidazol e clorexidina. Foram utilizados 15 corpos de prova de compósitos de MMA quimicamente ativados, preparados com nanopartículas de MMT divididas previamente em três grupos de acordo com o tipo de solução incorporada, controle (sem incorporação de solução), metronidazol e clorexidina (inserção em solução aquosa do respectivo fármaco). A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita através do cultivo de *P. gingivalis* e *E. faecalis* em meio BHI caldo e/ou BHI ágar, sob condições de anaerobiose. Os dados referentes aos halos formados entre os dois fármacos foram analisados através do teste “t” de Student. O valor global de significância adotado foi de 5%. A clorexidina e o metronidazol apresentaram atividade antimicrobiana para o *E. faecalis*, porém foram ineficazes no controle da colonização da *P. gingivalis*, quando incorporados ao complexo MMA-MMT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a atividade dos dois fármacos (teste t, $p \geq 0,05$). Ambos os fármacos pesquisados do presente estudo mostraram efetividade no controle antimicrobiano para cepas do *E. faecalis*, mesmo quando incorporados ao complexo MMA-MMT, porém tais agentes antimicrobianos não foram efetivos para o controle da *P. gingivalis*.

Palavras-chave: Clorexidina. Metronidazol. Polímeros. Nanopartículas.

ABSTRACT

The incorporation of polymeric nanocomposites reinforced with mineral clay in the polymer matrix promotes improvement of the mechanical properties of the material. Such particles further possess the ability to absorb organic molecules, which enables it to be a controlled drug delivery vehicle. The present work aims to compare antimicrobial activity of methyl methacrylate (MMA) enriched with montmorillonite (MMT) loaded with metronidazole and chlorhexidine. Fifteen specimens of chemically activated MMA composites were prepared with MMT nanoparticles previously divided into three groups according to the type of solution incorporated, control (without incorporation of solution), metronidazole and chlorhexidine (aqueous solution of each respective drug). Evaluation of antimicrobial activity was performed through cultivation of *P. gingivalis* and *E. faecalis* in BHI medium broth and / or BHI agar under anaerobic conditions. Data of halos formed between the two drugs were analyzed by Student's t-test. The overall significance level was 5%. Chlorhexidine and metronidazole showed antimicrobial activity for *E. faecalis*, but were ineffective in controlling the colonization of *P. gingivalis* when incorporated into the MMA-MMT complex. There was no statistically significant difference between the activity of the two drugs (t test, $p \geq 0.05$). Both drugs investigated in the present study showed antimicrobial effectiveness for strains of *E. faecalis*, even when incorporated into the MMA-MMT complex, but such antimicrobial agents were not effective for the control of *P. gingivalis*.

Key words: Chlorhexidine. Metronidazole. Polymers. Nanoparticles.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura da nanopartícula de MMT	15
Figura 2 – Tipos de estruturas que podem ocorrer quando uma argila é adicionada em uma raiz polimérica	16
Figura 3 – Molde de silicone de condensação interposto por placas de vidro para confecção de corpos de prova de resina acrílica	24
Figura 4 – Metodologia da confecção dos corpos de prova dos diferentes grupos experimentais	25
Figura 5 – Placa de petri contendo <i>E. faecalis</i> cultivada em meio TSB	27
Figura 6 – Placa de petri com meio ágar sangue cultivada com <i>P. gingivalis</i>	27

Lista de Quadros

Quadro 1 – Propriedades da montmorilonita	17
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Valor das médias (e desvio-padrão) dos halos de inibição em mm dos grupos experimentais testados para <i>E. faecalis</i> e <i>P. gingivalis</i>	29
--	----

Lista de abreviaturas e símbolos

$Al^2(OH)^6$	Hidróxido de alumínio
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BisGMA	Dimetacrilato de glicidila bisfenol A
Ca	Cálcio
CHX	<i>Chlorhexidine</i> - Clorexidina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO_2	Dióxido de Carbono
CP	Corpo de prova
DNA	Ácido desoxirribonucléico
g	Gramas
H^2	Hidrogênio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MMA	Metacrilato de metila
MMT	Montmorilonita
MET	Metronidazol
$Mg^3(OH)^6$	Hidróxido de magnésio
mV	Milivolt
Na	Sódio
nm	Nanômetro
PAT	Pasta antibiótica tripla
PMMA	Polimetilmetacrilato
PTE	Proteína de transferência de elétrons
s	Segundos
SiO^4	Nesosilicatos ou ortossilicatos
TEGDMA	Dimetacrilato de trietilenoglicol
TSB	Caldo Soja Trispticaseína
w/w	<i>weight to weight</i>
%	Porcento
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVO.....	13
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1	Nanocompósitos poliméricos reforçados com argila mineral.....	14
3.2	Ação antimicrobiana do Metronidazol.....	17
3.2.1	Mecanismo de ação.....	17
3.2.2	Uso clínico do Metronidazol.....	18
3.3	Eficácia da Clorexidina.....	20
3.3.1	Ação antimicrobiana.....	20
3.3.2	Uso clínico na odontologia.....	21
3.4	Montmorilonita enriquecida com fármacos.....	22
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Confecção do metacrilato de metila enriquecido com MMT e metronidazol ou clorexidina.....	24
4.2	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	26
4.2.1	Microrganismos e condições de cultivo.....	26
4.2.2	Teste de sensibilidade bacteriana pela técnica de difusão em ágar.....	26
4.3	Análise estatística.....	28
5	RESULTADOS.....	29
6	DISCUSSÃO.....	30
7	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Compósitos encontrados comercialmente são constituídos por uma matriz orgânica de monômeros de metacrilato de metila (MMA), éster mais importante do ácido metacrílico comercialmente em uso, que possui ampla utilização em odontologia.^{1,2}

Resinas à base de MMA são os materiais usados em maior escala para a confecção de restaurações temporárias. Entretanto, frente a restaurações extensas, abrangendo três ou mais elementos dentários, em que seu uso se faz necessário por um período prolongado, a resistência e a estabilidade das mesmas parecem não suprir perfeitamente as necessidades clínicas.³

Incorporação de pequena quantidade de nanocompósitos poliméricos reforçados com argila mineral (montmorilonita – MMT) na matriz de polímeros leva a uma notável melhoria das propriedades mecânicas, físicas e químicas do composto resultante em comparação com os materiais convencionais.^{4,5} A montmorilonita é uma das formas disponíveis de nanopartículas, que consiste em pequenas camadas octaédricas internas interpostas por duas camadas de tetrasilicato. Tal estrutura evita a formação de fraturas e, portanto, é capaz de melhorar a resistência à flexão.⁵

Nanopartículas de montmorilonita atraíram muito interesse de pesquisa na última década e são amplamente utilizados para a dispersão em polímeros devido à alta relação de aspecto, grande interface da interação polímero-nanopartículas e sua capacidade de absorção de moléculas orgânicas. Esta argila é reconhecida por sua alta capacidade de troca iônica e princípio de absorção de moléculas orgânicas pela têm sido explorado pela indústria farmacêutica em muitos países como veículo de liberação controlada de fármacos.⁶

Na cavidade oral humana saudável, existem populações bacterianas complexas com cerca de 500 a 700 espécies bacterianas diferentes, essa complexidade na composição torna difícil distinguir os papéis de espécies bacterianas específicas durante o processo saúde e doença. No entanto, certas bactérias estão fortemente associadas as patologias da cavidade oral, como a *Porphyromonas gingivalis* e o *Enterococcus faecalis*⁷⁻⁹, bactérias com grande potencial destrutivo aos tecidos.

Em 1985 a associação de metronidazol com montmorilonita foi primeiramente testada por Shrivastava, Jain e Frank¹⁰ com o objetivo de desenvolver um meio para melhorar a terapia gastrointestinal local da amebíase. Posteriormente, em 2013, Calabrese et. Al¹¹ associaram o metronidazol (MTE) a argila K10-montmorilonita (MMT-K10) para avaliar o potencial da MTE/MMT-K10 como um sistema controlado de administração de fármacos no cólon. Os autores observaram que tal formulação prolongou com sucesso a ação da droga no local desejado.

O metronidazol pertence à classe dos antibióticos nitroimidazóis e é efetivo contra bactérias anaeróbias estritas, incluindo aquelas da cavidade oral.¹² Seu uso têm sido amplamente descrito na odontologia como terapia coadjuvante para tratamento da periodontite crônica, osteonecrose dos maxilares e do sistema de canais de raízes necróticas e infectadas.¹³⁻¹⁵

A clorexidina é considerada um agente antimicrobiano de amplo espectro. Age pela adsorção à parede celular dos microorganismos, causando vazamento dos seus componentes intracelulares. Sua atividade antimicrobiana mostra efeitos residuais, denominamos de substantividade, que variam de 7 dias a até 12 semanas.^{16,17}

Boaro e colaboradores¹⁸, desenvolveram nanocompósitos de MMT carregadas de clorexidina (CHX) em uma matriz orgânica a base de BisGMA/TEGDMA. Os autores encontraram atividade antibacteriana no complexo MMT/CHX, que foi dependente da concentração do fármaco e da espécie bacteriana.

Apesar da capacidade de absorção de moléculas orgânicas apresentada pela MMT e de possibilitar a incorporação de fármacos nos nanocompósitos, não se conhece ainda a ação antimicrobiana do metacrilato de metila quando este é incorporado com nanocompósitos poliméricos reforçados com argila mineral em associação com o metronidazol ou clorexidina.

2 OBJETIVO

Avaliar a atividade antimicrobiana do metacrilato de metila enriquecido com nanomontmorilonita carregada com metronidazol e clorexidina.

A hipótese nula desta pesquisa é que os fármacos em questão (metronidazol e clorexidina) não acrescentam atividade antimicrobiana ao metacrilato de metila.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Polímeros à base de resina acrílica são empregados na confecção de aparelhos protéticos, dentes artificiais, aparelhos ortodônticos e ortopédicos maxilares, facetas e coroas. O polímero sintético mais utilizado como material base na reabilitação protética é o polimetilmetacrilato (PMMA), que é apresentado nas formas de pó (polímero) e líquido (monômero - metacrilato de metila).^{1,2}

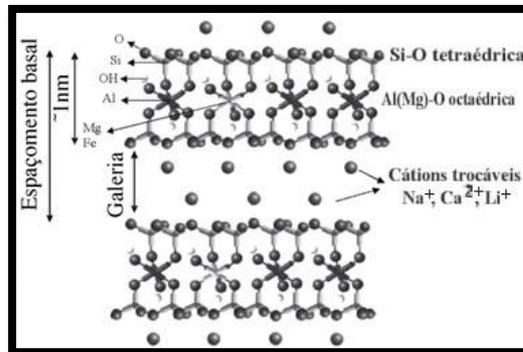
A aplicação de diferentes tipos de montmorilonita em materiais restauradores dentários resultou em melhores propriedades físicas, mecânicas e de adesão.⁵

3.1 Nanocompósitos poliméricos reforçados com argila mineral

Montmorilonita (nanopartícula argilomineral originária de Montmotillon, região de Poitou na França) foi descrita inicialmente por Knigh em 1896. Constituída pela sobreposição de duas lâminas tetraédricas de SiO_4 e uma centralizada de octaedros ($\text{Al}^2(\text{OH})^6$ e $\text{Mg}^3(\text{OH})^6$), que são ligadas entre si por átomos de oxigênio, formando então uma única estrutura, denominada lamela. A estrutura lamelar da referida nanopartícula é formada pela orientação paralela dos planos cristalinos.⁶

As lamelas da nanopartícula de MMT apresentam espessura de cerca de 1 nm, diâmetro de 100 nm e dimensão lateral em torno de 30 nm. A disposição empilhada da estrutura lamelar é mantida por forças polares de van der Waals. Embora as forças de van der Waals sejam consideradas forças intermoleculares fracas, elas se tornam significativas em nanoescala devido à grande área superficial por unidade de massa do material.¹⁹ Aproximadamente 80% dos cátions trocáveis da nanopartícula de MMT estão presentes nas galerias e 20% se encontram nas superfícies laterais.^{20,21} Na Figura 1 é possível observar a estrutura da galeria e o espaçamento basal da nanopartícula de MMT.

Figura 1: Estrutura da nanopartícula de MMT.

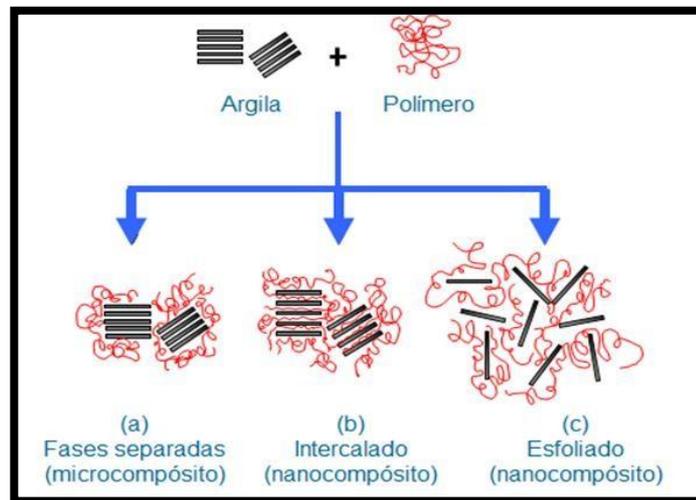


Fonte: Adaptado de (Paiva *et al.*, 2008)²²

Nanocompósitos são materiais utilizados para melhorar as propriedades dos polímeros compostos e acrílicos. Os compostos de polímero-MMT envolvem a interação da matriz de polímero com as nanoplaquetas de argila, esses materiais híbridos podem ser obtidos por incorporação do polímero em camadas ou canais de argila ou por dispersão de plaquetas do composto inorgânico na matriz polimérica.²³

A estrutura dos nanocompósitos adicionados com nanopartículas de MMT podem apresentar diferenças, sendo classificada como: (a) estrutura de fases separadas – onde o nanocompósito apresenta propriedades iguais a um compósito convencional; (b) estrutura intercalada – onde as cadeias poliméricas estão intercaladas entre as lamelas da nanopartícula e as propriedades seriam superiores aos compósitos convencionais; (c) estrutura esfoliada – onde a nanopartícula está uniformemente dispersa na matriz polimérica e melhores propriedades físicas e mecânicas seriam esperadas, em relação aos outros tipos de estruturas.^{6,22,24} Na Figura 2 observam-se um esquema dos tipos de estruturas que podem ocorrer quando uma nanopartícula argilomineral é adicionada a uma matriz polimérica.

Figura 2: Tipos de estruturas que podem ocorrer quando uma argila é adicionada em uma matriz polimérica.



Fonte: Adaptado de (Alexandre e Dubois, 2000)²⁵

A adição desse tipo de partículas de reforço às matrizes poliméricas à base de dimetacrilatos convencionais possui o intuito de reduzir a contração volumétrica e a tensão residual em compósitos de uso odontológico.^{5,26} O desempenho mecânico dos polímeros é significativamente aumentado com a adição de pequena quantidade (0,5-5,0% em peso) de MMT, como melhoria do desempenho de tempo de vida, resistência ao atrito e resistência à absorção de solventes.²⁷ O módulo de tração do material polimérico mostra-se significativamente melhor quando nanocompositos são formados com argilas prístinas ou organicamente modificadas.¹⁹

A montmorilonita tem a capacidade de adsorver alguns cátions e retê-los em um estado de troca catiônica o qual permite que cátions intercalados sejam trocados por outros cátions em solução aquosa. Cátions sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}) são os mais comuns. A montmorilonita pode ser classificada em alguns tipos, entre estes a montmorilonita de sódio (Na/MMT) e a montmorilonita de cálcio (Ca/MMT).²⁸ O Quadro 1 apresenta algumas características e propriedades físico-químicas da montmorilonita.

Quadro 1 – Propriedades da montmorilonita

Montmorilonita (MMT)	Características
Classe	Silcatos
Subclasse	Filossilicatos
Sistema cristalino	Monoclínico, C2/m
Grupo	Esmectitas
Cor	Branco, branco acinzentado, amarelo
Superfície específica	800 m ² /g
Dimensões das lamelas	0,1-1µm em comprimento e 1nm em espessura
Dureza de Mohs	1,5-2,0
Gravidade específica média (g/cc)	2,3-3
Peso molecular (g/mol)	540,46
Densidade média (g/cm ³)	2,35
Propriedade	Cristais expandem o volume em água

Fonte: (Uddin, 2008)²⁸

O desenvolvimento da matriz de polímero reforçada com cargas nanométricas tem sido uma área de pesquisa ativa há mais de duas décadas. Entre as várias cargas nanométricas utilizados para reforço, argila (montmorilonita), nanotubos de carbono e grafeno são as mais estudados. O reforço de sistemas poliméricos por enchimentos nanométricos abriu a possibilidade de melhorar o módulo e a força dos compósitos usando um conteúdo muito menor. A dispersão homogênea da carga nanométrica na matriz polimérica e a forte interação entre o material de enchimento e o polímero são absolutamente necessárias para um bom reforço.¹⁹

Nanoapartículas de argila podem ser modificadas por uma ampla gama de organo-modificadores para melhorar a compatibilização com diferentes polímeros e ajudar a alcançar as morfologias de intercalação e esfoliação necessárias para alcançar as melhores propriedades mecânicas. Estas nanopartículas são relativamente menos dispendiosas, quando comparadas aos nanotubos de carbono e grafeno, e possuem aplicações industriais, como na indústria automobilística.¹⁹

3.2 Ação antimicrobiana do Metronidazol

3.2.1 Mecanismo de ação

O espectro de atividade do metronidazol, embora amplo, é limitado aos organismos cujo metabolismo é anaeróbio ou pelo menos microaerófilo. Este agente

antimicrobiano atua numa reação bioquímica única para anaeróbios e estudos iniciais identificaram isso como a reação fosforoclástica de piruvato, tipo *clostridium ssp.* Nesta reação, o piruvato combina-se com fosfato para produzir fosfato de acetila, H^2 e CO^2 , e é a evolução de H^2 , que é especificamente inibida pelo metronidazol. Este fármaco inibe a enzima responsável pela geração de H^2 (hidrogenase) ou a função da proteína de transferência de elétrons (PTE).²⁹

A inibição de H^2 , a evolução e a redução concomitante do nitrogrupo de metronidazol não são, no entanto, o evento letal em micróbios suscetíveis, uma vez que a reação fosforoclástica se recupera uma vez que toda a droga é reduzida. A base para a toxicidade seletiva do metronidazol em relação aos anaeróbios reside no potencial de redução no qual o nitrogrupo é reduzido e que é termodinamicamente compatível com o das ferredoxinas (ca - 430 - 460 mV). O menor potencial de redução obtido por aeróbios é de cerca de - 350 mV tão claramente, esses organismos são incapazes de reduzir o metronidazol.²⁹

Nos micróbios suscetíveis, a redução do metronidazol diminui a sua concentração intracelular, proporcionando assim um gradiente de concentração que favorece a absorção do fármaco em anaeróbios, mas não nos aeróbios. É claro a partir dessas observações que o efeito microbicida do fármaco é devido não à molécula original, mas um produto ou produtos de redução gerados por este.²⁹

O principal sítio de ação do metronidazol é o DNA. O fármaco reduzido liga-se a este e provoca a ruptura de fitas, dissolução da formação de hélice e degradação da macromolécula que pode ser exacerbada por uma inibição concomitante de um mecanismo de reparo do DNA. Esses efeitos levam a uma ruptura geral da replicação e transcrição do DNA e leva à morte da célula dentro de 2 a 3 gerações, dependendo da concentração do fármaco.^{29,30}

3.2.2 Uso clínico do Metronidazol

O metronidazol é um derivado sintético bactericida da azomicina, detectado originalmente em culturas de *Streptomyces spp.* durante a década de 1950. Apenas em 1962 durante o tratamento de vaginite associada ao protozoário *Trichomonas vaginalis*, foi percebido que o metronidazol também foi eficaz no tratamento da

gingivite no mesmo paciente.³⁰

Este fármaco tem sido utilizado contra microaerófilos, incluindo *Helicobacter pylori*, protozoários incluindo *Entamoeba histolytica* (disenteria amebiana) e *Giardia lamblia* (giardíase), bem como arqueias metanogênicas. O metronidazol continua a ser uma boa escolha para a colite associada ao *Clostridium difficile* e para infecções da cavidade oral, como a periodontite.³⁰

Na odontologia, o metronidazol é vastamente utilizado na periodontia por ser muito ativo contra bactérias anaeróbicas e por ter uso indicado diretamente na bolsa periodontal, devido à alteração da microbiota específica.³¹ Dessa maneira, é o antibiótico de primeira escolha nos casos de gengivite ulcerativa necrosante e periodontite ulcerativa necrosante e, em combinação com procedimentos mecânicos de raspagem radicular, no tratamento de periodontite agressiva, refratária e crônica, devido sua conhecida eficácia contra bacilos Gram negativos.³²

Antibióticos como amoxicilina, metronidazol e tetraciclina podem ser aplicados localmente no bolso periodontal ou administrados sistematicamente sob a forma de comprimido, porém essa terapia é adjuvante ao controle de infecção mecânica.³³ Entre as mais de 700 espécies bacterianas diferentes que foram identificadas na microbiota oral, apenas um pequeno grupo de 10 a 15 espécies foi identificado como significativamente associado à iniciação e progressão da periodontite. O objetivo principal da terapia periodontal é impedir a progressão da doença e prevenir a perda adicional do tecido de suporte.

Apesar de o fármaco metronidazol ser pouco utilizado em tratamentos endodônticos como medicação intracanal, sua ação mostrou-se eficiente e, além disso, não há relatos de efeitos colaterais na utilização do metronidazol quando associado a outros medicamentos no combate de microrganismos.³⁴

Várias combinações de antibióticos tópicos podem ser usadas para desinfetar canais radiculares infectados e necróticos. Uma combinação que é eficaz contra bactérias comumente encontradas em canais radiculares infectados é uma mistura de ciprofloxacina, metronidazol e cefaclor.¹⁵ Em seu estudo, Hoshino e colaboradores³⁵, observaram que em combinação, estas drogas proporcionaram uma esterilização consistente de todas as amostras bacterianas. Logo, tais farmacos quando utilizados em associação, são eficazes para eliminar bactérias nas camadas profundas da

dentina radicular.

Yamashita e McCauley¹³, recomendam o uso de colutório antisséptico intraoral associado a antibióticos de amplo espectro como amoxicilina com ácido clavulânico, clindamicina ou o metronidazol no controle microbiano de pacientes que serão submetidos a cirurgia intraoral e que fazem terapia anti-reabsorção para doenças metastáticas, a fim de reduzir os riscos de osteonecrose dos maxilares.

3.3 Eficácia da Clorexidina

3.2.1 Ação antimicrobiana

Ela se caracteriza por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos. Ela possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos.^{36,37} Vários estudos relatam ainda sua eficácia contra o *Streptococcus mutans* agente iniciador da carie dentária.³⁸

Devido à sua natureza catiônica, ela adsorve-se a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral.^{9,37}

O seu mecanismo de ação antibacteriano é explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente. Assim, em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular.^{9,37}

Com a sua capacidade antisséptica junto à adsorção, tributo de suma importância que é o poder de retenção na superfície oral e de fazer lentamente a liberação, a interação eletrostática de grupos com cargas negativas existentes na

cavidade bucal, como dentes, e biofilme a clorexidina que possui carga positiva se atrai, e com isso ocorre um aumento da permeabilidade celular, o que leva ao rompimento do citoplasma levando a morte celular.³⁹

3.2.2 Uso clínico na odontologia

Com 30 anos de história na odontologia, a clorexidina é a solução mais utilizada e pesquisada nos últimos anos, por possuir boa eficácia na ação antibacteriana.³⁸ Pode ser utilizada de várias formas e concentrações nas soluções, atua no tratamento de feridas, queimaduras, antisséptico urinário e das mucosas. Na cavidade oral encontramos ainda outras forma de empregá-la como irrigações, spray, goma de mascar e vernizes.³⁹

Ainda, é capaz de auxiliar na diminuição da placa bacteriana presente na cavidade bucal, a qual leva à injúrias à saúde bucal do indivíduo. A molécula presente no dentífrício e no enxaguante bucal apresenta biocompatibilidade aos tecidos bucais, não provocando irritações desde que haja um conhecimento sobre a sua administração.

O poder antimicrobiano da clorexidina contra o *E. faecalis* situado nos túbulos dentinários e no canal radicular tem sido comprovado em vários estudos, como no de Costa e colaboradores⁴⁰ em 2010, que compararam a ação antimicrobiana da clorexidina com extratos, em diferentes concentrações, de quatro espécies vegetais, a saber: aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius Raddi*), aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*), ameixa-do-mato (*Ximenia americana L.*), quixabeira (*Syderoxylum obtusifolium*). Neste estudo, os autores observaram que nenhuma substância testada produziu halo de inibição maior do que aquele produzido pela clorexidina a 0,12%, substância que os autores elegeram como controle positivo em seu experimento devido a sua comprovada eficácia.

Na terapia endodôntica, a clorexidina tem sido usada como substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico e como medicação intracanal, apresentando bons resultados apesar de não dissolver tecidos pulpares remanescentes.⁴⁰

Segundo a literatura, é capaz, ainda, de diminuir a frequência e a intensidade das mucosites orais em pacientes em tratamento quimioterápico de leucemias agudas

sem apresentar efeitos deletérios significativos no paciente, reduzindo a dor e o desconforto.⁴¹

Apesar de mínimos, alguns autores^{38,42} descrevem efeitos colaterais que podem estar associados à clorexidina, como o manchamento extrínseco dos tecidos bucais (dentes e língua), presença de gosto metálico na boca, sensação de queimação, perda de paladar, descamação da mucosa e reações alérgicas.

3.3 Montmorilonita enriquecida com fármacos

Apesar das formas farmacêuticas de liberação rápida e imediata serem as mais comercializadas, em algumas situações seu uso está associado com alta frequência de administração e concentração plasmática irregular, que por sua vez podem levar a efeitos adversos ou a uma fraca eficácia do fármaco. Esta situação provocou esforços para se desenvolverem sistemas que forneçam liberação controlada de substâncias ativas.⁶

A integração da nanotecnologia nas pesquisas farmacêuticas tem gerado novas ideias e perspectivas para o tratamento de diferentes patologias. A utilização de nanopartículas complexadas com fármacos tem criado uma nova tendência terapêutica. As nanopartículas podem ser preparadas utilizando diferentes materiais, incluindo polímeros sintéticos e naturais, lipídeos, açúcares, metais, argilas e materiais biológicos, os quais podem gerar formas esféricas, ramificadas, anelar e em camadas. Cada tipo de forma estrutural oferece características únicas que tornam os nanossistemas candidatos promissores para liberação de fármacos.⁴³

As argilas minerais são materiais inorgânicos que atualmente recebem atenção do setor farmacêutico devido às propriedades físico-químicas destes silicatos. As propriedades as quais fazem as argilas minerais úteis em aplicações farmacêuticas são a capacidade de absorção, grande área de superfície, capacidade de trocas catiônicas, inércia química e baixa toxicidade.⁴⁴

Devido as características estruturais das argilas nas quais as folhas lamelares são dispostas em camadas formando um espaço interlamelar, compostos orgânicos podem ser adsorvidos nas galerias entre as camadas e nas superfícies lamelares. Esta propriedade não apenas favorece a geração de novos materiais com distintas

propriedades com a inserção de polímeros, como a formação de carreadores contendo fármacos.⁴⁵

Alguns sistemas híbridos já foram testados na literatura, envolvendo a montmorilonita em associação a diversas partes poliméricas (poliuretano, ácido polilático, polietileno glicol, etc) e fármacos como o atenolol, diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol, clorexidina, cafeína, sulfato de gentamicina, dentre outros.⁶

Boaro e colaboradores¹⁸ observaram em seu estudo a atividade antibacteriana complexo MMT/CHX. Os compostos que continham clorexidina apresentaram maior atividade antimicrobiana do que os nanocompósitos sem o fármaco, sugerindo que a CHX foi liberada do compósito para o meio de ágar para promover uma zona de inibição ao redor dos discos. Neste estudo os *S. mutans* e *P. gingivalis* mostraram-se mais sensíveis à CHX do que *S. aureus*.

Em 2014, Zhang e colaboradores⁴⁶ observaram que os compósitos misturados diretamente com CHX reduziram as propriedades mecânicas, tiveram superfícies ásperas e um excesso de liberação de CHX em um curto período de tempo, enquanto que quando a CHX foi associada ao um tipo de sílica porosa as propriedades mecânicas foram mantidas, e a liberação foi mais prolongada. Ambos os tipos de compósitos mostraram inibição bacteriana contra as espécies testadas. Isso demonstra que a clorexidina deve estar associada a algum tipo de carregador, pois quando sozinha pode alterar negativamente propriedades mecânicas fundamentais dos compósitos.

4 METODOLOGIA

4.1 Confeção do metacrilato de metila enriquecido com MMT e metronidazol ou clorexidina

Foram utilizados 15 corpos de prova (CP) fabricados com compósitos de Metacrilato de metila (VIPI, Pirassunga, São Paulo, Brasil) quimicamente ativados. Para a confecção dos CP foram utilizadas duas placas de vidro interpostas por silicone de condensação (Zhermack, Badia Polesine, Itália). Após a presa do material, foram modelados 15 moldes com o auxílio de um perfurador circular. Os moldes do silicone foram preenchidos após a mistura de 2,1 mL de polímero e 0,70 mL de monômero (proporção equivalente ao volume de 3:1 indicada pelo fabricante) incorporados com MMT. O líquido (monômero) foi despejado em um pote Dappen e sobre ele foi dispensado o pó (polímero), sendo misturados suavemente por 5 segundos. A mistura foi inserida no modelo na fase plástica com uma espátula de inserção. Para a padronização da presa final dos materiais, cada bloco permaneceu por dez minutos no modelo, evitando assim a ocorrência de discrepâncias (Figura 3). Os CP foram então levados para a estufa à 37 °C onde permaneceram por três dias para que todo o monômero residual fosse liberado.

Figura 3 – Molde de silicone de condensação interposto por placas de vidro para confecção de corpos de prova de resina acrílica.



Fonte: Própria do autor

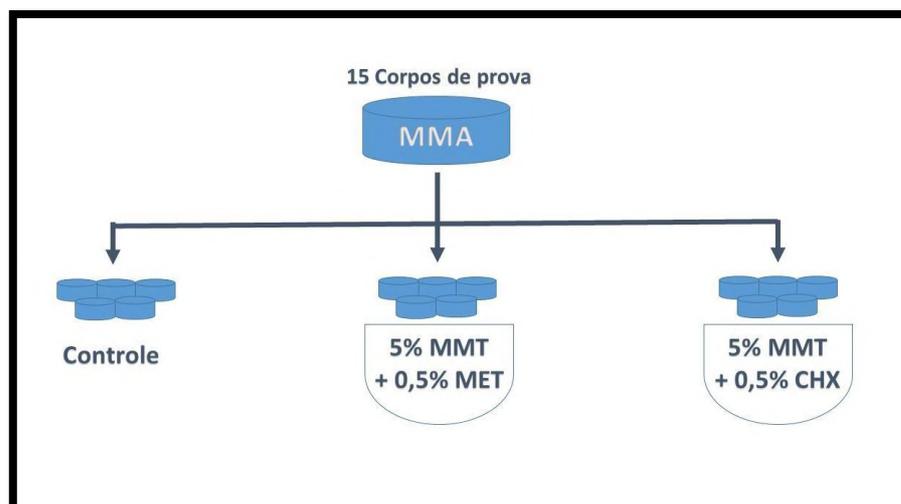
Os corpos de prova foram divididos em três grupos (n=5), onde parte das nanopartículas de montmorilonita (Cloisite Southern Clay Products, Texas, Estados Unidos da América) não tiveram incorporação de nenhuma substância, outra parte foi inserida em uma solução aquosa de metronidazol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e solução aquosa de clorexidina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), numa proporção em peso equivalente a 10% w/w. Ambas misturas foram realizadas em constante agitação por 3 horas a uma temperatura de 80 °C. Após o processo de emulsão, cada um dos compostos foi liofilizado por cerca de 6 horas.

Um terço dos espécimes não recebeu nenhuma nanopartícula e recebeu o nome de grupo Controle. Outro terço recebeu 5% em peso de MMT carregada de metronidazol, o que equivaleu a uma concentração final de 0,5% de metronidazol, sendo este grupo denominado de MET e os espécimes restantes (último terço), receberam 5% em peso de MMT carregada de clorexidina, o que equivaleu a uma concentração final de 0,5% de clorexidina, sendo este grupo denominado de CHX (Figura 4).

Tal concentração foi estabelecida com base num estudo prévio do nosso grupo de pesquisa¹⁸.

O complexo MMT/fármaco foi adicionado ao pó antes da manipulação dos espécimes e agitado vigorosamente para permitir uma homogeneização deste.

Figura 4 – Metodologia da confecção dos corpos de prova dos diferentes grupos experimentais.



Fonte: Própria do autor

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, os seguintes microrganismos foram avaliados: *Porphyromona gingivalis* e *Enterococcus faecalis*. Esses microrganismos foram rotineiramente mantidos em BHI glicerol à 20%, à -70 °C. Os microrganismos foram cultivados em meio ágar sangue e TSB respectivamente.

4.2.2 Teste de sensibilidade bacteriana pela técnica de difusão em ágar

A técnica de difusão em ágar foi realizada segundo as recomendações do CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição, M2-A8). Uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 0,1 (absorbância, $OD^{625} = 0.1$) foi preparada com cada um dos microrganismos com auxílio de um espectrofotômetro. As placas de petri contendo os meios ágar sangue e TSB foram inoculadas com as respectivas suspensões bacterianas (*P. gingivalis* e *E. faecalis*) utilizando espátula estéril, esfregando-a em toda a superfície estéril do ágar (Figura 5). Foram confeccionados espécimes utilizando uma matriz de silicone com 7,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura, entre duas laminas de vidro. Para cada grupo foram confeccionados 5 espécimes que foram então posicionados na superfície da placa de ágar semeada. A placa de cultura da *P. gingivalis* foi acondicionada num saco de anaerobiose com comprimido de CO₂ (Figura 6). Todas as placas foram mantidas a 37 °C, por 18 horas. Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição total foram mensurados com uso de um paquímetro digital, em mm. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu.

Figura 5 – Placa de petri contendo *E. faecalis* cultivada em meio TSB.



Fonte: Própria do autor

Figura 6 – Placa de petri com meio ágar sangue cultivada com *P. gingivalis* acondicionada em saco de anaerobiose.



Fonte: Própria do autor

4.3 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o teste “t” de Student, comparando os halos formados entre os dois fármacos utilizados. O valor global de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

A clorexidina e o metronidazol apresentaram atividade antimicrobiana para o *E. faecalis* quando incorporados ao complexo polímero-MMT. Os halos de inibição para a bactéria *E. faecalis* obtidos neste estudo, conforme descrito na Tabela 1, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os dois fármacos (teste t, $p \geq 0,05$), contudo, observou-se ação antibacteriana positiva de ambos.

Na avaliação da atividade antibacteriana dos fármacos nas placas cultivadas com cepas de *P. gingivalis*, não foram observados halos de inibição pela ação da CHX ou do MET quando incorporados ao complexo polímero-MMT. Também não houve formação de halo de inibição no grupo controle para ambas as cepas bacterianas (Tabela 1).

Tabela 1 – Valor das médias (e desvio-padrão) dos halos de inibição em mm dos grupos experimentais testados para *E. faecalis* e *P. gingivalis*.

Grupo	Halo de inibição (mm)	
	<i>E. faecalis</i>	<i>P. gingivalis</i>
Controle	0	0
CHX	3,23 (1,23) A	0
MET	3,60 (1,40) A	0

Fonte: Própria do autor

6 DISCUSSÃO

A hipótese nula de que o metronidazol e a clorexidina não acrescentam atividade antimicrobiana ao metacrilato de metila foi descartada para as cepas da *E. faecalis*, uma vez que ambos os fármacos mostraram efetividade no controle antimicrobiano, quando incorporados ao complexo MMA/MMT. Entretanto, tal hipótese foi aceita para as cepas da *P. gingivalis*, uma vez que o resultado deste grupo foi similar ao do grupo controle.

Resinas acrílicas, à base de PMMA, são compostos orgânicos classificados como polímeros, produzidos sinteticamente e cuja química baseia-se no carbono, hidrogênio e em outros elementos não metálicos. Após serem moldadas e endurecidas, podem apresentar características fibrosas, borrachóides, resinosas e rígidas, estas determinadas por sua morfologia molecular. Dentre suas vantagens, encontram-se a biocompatibilidade, ausência de sabor e odor, propriedades térmicas satisfatórias, estabilidade dimensional, boa capacidade de polimento, aparência agradável e simplicidade técnica.⁴⁷

Tais materiais possuem ampla aplicação na odontologia: confecção da base de próteses parciais e totais, placas mio-relaxantes, moldeiras individuais, padrões fundição, próteses provisórias imediatas, coroas provisórias, dentes artificiais, reparo de próteses totais, acrilização de aparelhos ortodônticos, confecção de dentes artificiais, além de artefatos que substituam perdas ósseas ou tecidos moles da face, como reconstituição ocular, pavilhão auricular e obturadores palatinos, dentre outras aplicações.⁴⁷ Justificou-se a escolha deste material no presente estudo, devido ao seu amplo uso no meio intraoral.

Segundo Safavi e colaboradores⁴⁸, a presença do *E. faecalis* na cavidade oral tem sido associada a infecções odontogênicas persistentes. Logo, a escolha deste microrganismo para avaliação da efetividade da ação antimicrobiana da clorexidina e do metronidazol, se justificou para que a ação destes fármacos contra outros tipos microbianos menos resistentes da cavidade oral pudessem ser inferidas.

A periodontite crônica é caracterizada por uma perda progressiva induzida pela ação bacteriana, que inclui a destruição do ligamento periodontal e do osso de suporte adjacente. Para a identificação dos agentes patogênicos bacterianos responsáveis

pela periodontite, muitas pesquisas foram conduzidas com o uso de métodos de cultivo *in vitro* e identificação molecular.⁸

Treponema denticola, *Eubacterium saphenum*, *Porphyromonas endodontalis*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *Filifactor alocis*, *Prevotella denticola*, *Cryptobacterium curtum*, *Treponema médio*, *Treponema socranskii* e *Actinomyces naeslundii* são espécies que tem sido associadas à periodontite. Destas, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola* são amplamente consideradas como os principais agentes patogênicos periodontais.⁸ O uso de cepas da *P. gingivalis* neste estudo, se deve a forte associação que esta bactéria tem com a doença periodontal (DP). A relação de contato que a resina acrílica tem, quando assentada corretamente em boca, aos tecidos de suporte dentários, faz-nos supor que o uso de fármacos bactericidas incorporados na matriz polimérica é capaz de prevenir a progressão e ou o desenvolvimento da DP.

Embora Kluk e colaboradores³⁸ e Bonan, Batista e Hussne⁴² relatem alguns efeitos colaterais associados à clorexidina, como o manchamento na superfície dentária, a presença de gosto metálico na boca, a sensação de queimação, a perda de paladar, a descamação da mucosa e a possibilidade de reações alérgicas, segundo Hortense e colaboradores³⁹, devido a sua baixa toxicidade local e sistêmica, a falta de efeitos corrosivos relacionados à clorexidina e devido a mesma não alterar a flora local, o emprego deste fármaco pode ser feito com segurança.

Para tais autores³⁹, a clorexidina é uma alternativa na prevenção e no tratamento de doenças bucais. Na odontologia, atua de forma preventiva na redução da placa bacteriana, como, por exemplo, em deficientes físicos com limitações motoras, em deficientes mentais, em portadores de aparelhos ortodônticos e em pacientes geriátricos. Pode também ser utilizada na redução de infecções cruzadas (incorporada ao hidrocolóide irreversível), de bactérias viáveis em aerossóis gerados em procedimentos profiláticos, na diminuição de bacteremias pós-cirúrgicas antes de procedimentos cirúrgicos ou periodontais, na desinfecção de escovas de dente e de superfícies.

Moreira e colaboradores⁴⁹ demonstraram a eficácia da clorexidina a 0,12% e 0,2% como antisséptico bucal em um estudo *in vitro* com *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. aeruginosa*, *S. mutans*. Os autores constataram que ambas concentrações de CHX

foram capazes de inibir o crescimento de bactérias, resultando numa redução dos microrganismos presentes na saliva coletada. Semelhante resultado foi encontrado por Vianna e colaboradores⁵⁰, que avaliaram a ação da CHX nas concentrações de 0,2%, 1% e 2% nas formulações de gel e líquido *in vitro*. Tais autores encontraram ação efetiva da CHX 2% (gel e líquido) para o *E. faecalis* e todas as formulações e concentrações testadas apresentaram efetividade contra a *P. gingivalis*.

No presente estudo, a CHX na concentração de 0,5%, incorporada ao complexo polímero/MMT mostrou-se eficaz no controle da *E. faecalis* e não foi capaz de formar halo de inibição de crescimento bacteriano nas placas cultivadas com *P. gingivalis*. Tal concentração de MMT/Fármaco foi instituída de acordo com os achados prévios de Boaro e colaboradores¹⁸ que utilizaram a concentração de 0,5% de CHX e descrevem em seus achados que a presença de 0,5% do fármaco no complexo MMT/CHX não resulta na diminuição das propriedades mecânicas de compósitos, ao mesmo tempo que apresenta atividade antibacteriana para *P. gingivalis*.

Os autores¹⁸ relatam que numa concentração de 10% há aumento das propriedades mecânicas iniciais, porém, após o envelhecimento durante 2 meses, as amostras apresentam uma diminuição acentuada nas propriedades. Ainda não existem dados na literatura que avaliem as propriedades mecânicas do metacrilato de metila quando incorporados ao MMT enriquecido com CHX ou MET. Tal investigação encontra-se em andamento num projeto piloto pelo atual grupo de pesquisa.

A seleção de antimicrobianos para o tratamento da periodontite é geralmente realizada de forma empírica, devido à etiologia microbiana complexa das infecções periodontais e à falta de evidência para sugerir que pacientes que apresentam testes negativos a determinados patógenos periodontais não se beneficiam com o tratamento antibiótico.⁵¹

O metronidazol provoca danos nas fitas de DNA dentro das células bacterianas.^{29,30} Segundo Ye e colaboradores⁵², as células de mamíferos carecem das enzimas para reduzir o grupo nitro desses agentes, portanto, o metronidazol sozinho não penetra em células de mamíferos para inibir bactérias intracelulares,

mesmo que o metronidazol se difunda bem na maioria dos tecidos e em vários fluidos corporais. Em contrapartida, a *P. gingivalis* exibe características específicas, que permitem sua infiltração no epitélio oral e localização intracelular. Esta invasão celular é um importante mecanismo de sobrevivência pelo qual as bactérias são capazes de evadir as defesas imunológicas do hospedeiro.

A associação da amoxicilina com o metronidazol sistêmico predomina na literatura. van Winkelhoff e colaboradores⁵³ e Pavicić e colaboradores⁵⁴ sugerem que esses dois agentes em combinação podem fornecer um aumento sinérgico da atividade contra anaeróbios gram negativos. Segundo a revisão sistemática de McGowan, McGowan e Ivanovsk em 2017⁵¹, estudos apontam que a combinação destes fármacos de forma adjunta à terapia não-cirúrgica periodontal para o tratamento da periodontite agressiva e crônica, resulta na melhora dos níveis de inserção clínica e na redução da profundidade de bolsas periodontais, sem diferença de risco significativo na ocorrência de efeitos adversos.

A incorporação do metronidazol na estrutura polímero/MMT, não se mostrou eficaz no controle da colonização bacteriana da *P. gingivalis* no presente estudo, contudo, não se pode inferir que não houve liberação local *in vitro*, deste medicamento. Em um outro estudo, do mesmo grupo de pesquisa, observou-se liberação de metronidazol usando uma matriz polimérica diferente (epoxídica), neste, constatou-se liberação de metronidazol a qual foi mais intensa após as primeiras 72 horas do experimento. Desta forma, o presente resultado apenas incita futuros estudos com o metronidazol associado a outros fármacos, como a amoxicilina e a investigação de outros tempos de ação deste fármaco para elucidar se o fármaco pode ser efetivo contra as cepas de *P. gingivalis* quando incorporadas ao complexo polímero/MMT.

Apesar de estudos^{55,56} mostrarem baixa eficácia do metronidazol com aeróbios facultativos como o *E. faecalis*, Shaik e colaboradores⁵⁷ em um estudo *in vitro* demonstraram que a combinação da pasta antibiótica tripla (PAT) composta pela mistura de metronidazol, ciprofloxacina e minociclina utilizando a quitosana como transportador, teve um bom efeito antimicrobiano contra *C. albicans* e *E. faecalis*. No presente estudo, o MET incorporado ao complexo MMA/MMT também apresentou

eficácia contra as cepas deste tipo bacteriano.

Onnainty et al. (2016)⁵⁸ e Meirelles et al. (2017)⁶, observaram que o tempo de liberação do fármaco incorporado às nanopartículas é dependente de variáveis como a temperatura e o pH. O valor do pH da saliva varia entre 6,0 e 7,5, no entanto, durante a infecção, o ambiente tende a tornar-se ácido devido a ações combinadas de metabolismo bacteriano e resposta imune do hospedeiro.⁵⁹ As condições de temperatura e pH do presente estudo foram de 37 °C e 7,4 ± 0,2 (ágar sangue e TSB) respectivamente.

A temperatura sublingual é rotineiramente utilizada como um indicador de temperatura oral e quando medida em condições específicas, ela se aproxima de 37 °C para a maioria dos indivíduos. A fim de simular a temperatura intraoral, todas as placas foram mantidas a 37 °C, por 18 horas. No entanto, alguns autores afirmam que a cavidade bucal sofre flutuações frequentes e drásticas de temperatura, logo não se pode assumir que 37 °C representa a verdadeira temperatura de repouso para todos os locais dentro da cavidade oral.^{58,60} Campos e colaboradores²⁶ avaliaram espécimes de compósitos experimentais sintetizados com clorexidina incorporados ao MMT. Os autores avaliaram a liberação de clorexidina a 37 °C *in vitro* em solução fisiológica com pH neutro durante 366 horas e observaram liberação significativa do fármaco iniciada após 96 horas e mantida durante todo o experimento. Logo, as condições de temperatura e pH durante todo o experimento foram favoráveis para liberação dos fármacos.

7 CONCLUSÃO

Apesar da clorexidina e o metronidazol não terem apresentado eficácia como agentes antibacterianos, quando incluídos em uma matriz polimérica com MMT, para cultura da *Porphyromonas gingivalis*, tais fármacos mostraram efetividade no controle antimicrobiano para cepas do *Enterococcus faecalis*.

Mesmo quando incorporados ao complexo de metacrilato de metila enriquecido com montmorilonita, a CHX e o MET foram capazes de inibir o crescimento bacteriano do *E. faecalis* sem apresentar superioridade de um fármaco sobre o outro.

REFERÊNCIAS

1. Alvim HCN, Santos SSF, Leão MVP. Hipersensibilidade à resina acrílica em reabilitação bucal. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*. 2013; 25(3): 233-240.
2. Camacho DP, Svidzinski TIE, Furlaneto MC, Lopes MB, Corrêa GO. Resinas Acrílicas de Uso Odontológico à Base de Polimetilmetacrilato. *Braz J Surg Clin Res*. 2014 Mar-Mai; 6(3): 63-72.
3. Bacchi A, Schneider LF, Malafaia F, Garbossa M. Resistência à flexão de resinas de metacrilato de metila e bisacrilato de metila submetidas à termociclagem. *Rev Odontol UNESP*. 2012 Sept-Oct;41(5):330-334.
4. Zhou YX, Rangari V, Mahfuz H, Jeelani S, Mallick PK. Experimental study on thermal and mechanical behavior of polypropylene, talc/polypropylene and polypropylene/clay nanocomposites. *Mat Sci Eng Struct Mat Proper Micro Proc*. 2005;402(1-2):109-117.
5. Solhi L, Atai M, Nodehi A, Imani M. A novel dentin bonding system containing poly (methacrylic acid) grafted nanoclay: synthesis, characterization and properties. *Dent Mater*. 2012;28:1041-1050.
6. Meirelles LMA, Raffin FN. Clay and Polymer-Based Composites Applied to Drug Release: A Scientific and Technological Prospection. *Pharm Pharm Sci*. 2017;20:115-134.
7. Dingsdag S, Nelson S, Coleman N. Bacterial Communities Associated With Apical Periodontitis and Dental Implant Failure. *Microb Ecol Health Dis* 2016;27:31307.
8. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2003;82:338-344.
9. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975;54 Spec No B:B57-62.
10. Shrivastava R, Jain SR, Frank SG. Dissolution dialysis studies of metronidazole-montmorillonite adsorbates. *J Pharm Sci*. 1985 Feb;74(2):214- 6.
11. Calabrese I, Cavallaro G, Scialabbab C, Licciardi M, Merli M, Sciascia L, Liveri Mlt. Montmorillonite nano devices for the colon metronidazole delivery. *Int J Pharm*. 2013;457:224-236.

12. Topazian RG, Goldberg MH, Hupp JR Infecções orais e maxilofaciais. 4ª ed. São Paulo: Editora Santos; 2006.
13. Yamashita J, McCauley LK. Antiresortives and osteonecrosis of the jaw. *J Evid Base Dent Pract.* 2012;SI:233-247.
14. Herrera D, Matesanz P, Bascones-Martinez A, Sanz M. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J Evid Base Dent Pract.* 2012;SI:50-60.
15. Kim DS, Park HJ, Yeom JH, Seo JS, Ryu GJ, Park KH, Shin SI, Kim SY. Long-term follow-ups of revascularized immature necrotic teeth: three case reports. *Int J Oral Sci.* 2012; 4:109–113.
16. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Dlener-West M, Johnson JD. The Effect of Passive Ultrasonic Activation of 2% Chlorhexidine or 5.25% Sodium Hypochlorite Irrigant on Residual Antimicrobial Activity in Root Canals. *J Endodontics.* 2003;29(9):562-564.
17. Rosenthal S1, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Oct;98(4):488-92.
18. Boaro LCC, Campos LM, Varca GHC, Santos TMR, Marques PA, Sugii MM et al. Antibacterial resin-based material containing chlorhexidine loaded nanoparticles. Submetido em 2017.
19. Bhattacharya M. Polymer Nanocomposites—A Comparison between Carbon Nanotubes, Graphene, and Clay as Nanofillers. *Materials.* 2016;262(9):1-35.
20. Merinska D, Malac Z, Pospisil M, Weiss Z, Chmielova M, Capkova P, Simonik J. Polymer/clay nanocomposites based on MMT/ODA intercalates. *Composite Interfaces.* 2002;9(6):529-540.
21. Santos PS. *Ciência e Tecnologia de Argilas.* 2ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher; 1989. 66-68p.
22. Paiva LB, Morales AR, Diaz FRV. Organophilic clays: characteristics, preparation methods, intercalation compounds and characterization techniques. *Ceramic.* 2008;54:213-226.
23. Yang J-H, Lee J-H, Ryu H-J, Elzatahry AA, Alothman ZA, Choy J-H. Drug–clay nanohybrids as sustained delivery systems. *Appl Clay Sci.* 2016;130:20–32.
24. Morales LBP, Guimarães TR. Propriedades mecânicas de Nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. *Polim Cien Tec.* 2006;16(2):136-140.

25. Alexandre M, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Mater Sci Eng*, 2000;28:61-63.
26. Campos LM, Boaro LC, Santos TR, Snatos VJ, Varca GC, Parra DF. Chlorhexidine Loaded MMT as Dental Composite Filler: Release Evaluation. In: 3rd BRAZILIAN CONFERENCE ON COMPOSITE MATERIALS, 2016 August 28-31; Gramado, RS. 2016.
27. Fareed MA, Stamboulis A. Effect of nanoclay dispersion on the properties of a commercial glass ionomer cement. *Int J Biomater*. 2014;2014:10.
28. Uddin F. Clays, Nanoclays, and Montmorillonite Minerals. *Metali Mater Trans*. 2008;3:2804-2812.
29. Edwards DI. Mechanism of antimicrobial action of metronidazole. *J Antimicrob Chemother*. 1979 Sep;5(5):499-502.
30. Dingsday SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms *J Antimicrob Chemother*. 2017;25:1- 15.
31. Faveri M, Figueiredo LC, Feres M. Treatment of chronic periodontitis may be improved by the adjunctive use of systemic metronidazole. *J Evid Base Dent Pract*. 2014;14:70-72.
32. Gordon JM, Walker CB. Current status of systemic antibiotic usage in destructive periodontal disease. *J Periodontol*. 1993;64(8):760-771.
33. Chronic Periodontitis – Prevention, Diagnosis and Treatment Type: Systematic Review. Swedish Council on Health Technology Assessment (SBU). 169. 2004. 1-32p.
34. MACHADO, MEL. **Endodontia**: da biologia à Técnica. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2009.
35. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J*. 1996;29(2):125–130.
36. TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
37. Zanatta FB, Rosing CK. Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A*. 2007;1(2): 35-43.

38. Kluk E, Reinhold FCBC, Pereira N, Mello AMD, Mello FAZ. Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. *Rev Gest Saud.* 2016;14(1):7-13.
39. Hortense SR, Carvalho ES, Carvalho FS, Silva RPR, Bastos JRM, Bastos RS. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo.* 2010;22(2):178-184.
40. Costa EMMB, Barbosa AS, Arruda TA, Oliveira PT, Dametto FR, Carvalho RA, Melo MD. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *J Bras Patol Med Lab.* 2010;46(3):175-180.
41. Macedo RAP, Moraes EF, Dantas NA, Moraes MLS. Uso da clorexidina no tratamento da mucosite oral em pacientes com leucemia aguda: revisão sistemática. *Rev Dor.* 2015 jul-set;16(3):221-226.
42. Bonan RF, Batista AUD, Hussne RP. Comparação do uso do hipoclorito de sódio e da clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico: revisão de literature. *Rev Bras Cienc Saúde.* 2011;15(2):237-244.
43. Yih TC, Al-Fandi M. Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems. *J Cell Biochem.* 2006;97:1184-1190.
44. Choy J, Choi S, Oh J, Park T. Clay Minerals and Layered Double Hydroxides for Novel Biological Applications. *Appl Clay Sci.* 2007; 36:122-132.
45. Viseras C, Cerezo P, Sanchez R, Salcedo I, Aguzzi C. Current challenges in clay minerals for drug deliver. *Appl Clay Sci.* 2010;48:291-295.
46. Zhang JF, Wu R, Fan Y, Liao S, Wang Y, Wen ZT et al. Antibacterial dentalcomposites with chlorhexidine and mesoporous silica. *J Dent Res.* 2014; 93(12):1283-1289.
47. Anusavice KJ. Phillips science of dental materials. 10 ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 1996;237-71.
48. Safavi KE, Spangberg LSW, Lngeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *Journal of Endodontics* 1990;16:207-10.
49. Moreira ACA, Pereira MHQ, Porto MR, Rocha LAP, Nascimento BC, Andrade PM. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. *Rev Cien Med Bio.* 2009;8(2):153-161.
50. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium

- hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan; 97(1):79-84.
51. McGowan K, McGowan T, Ivanovski S. Optimal dose and duration of amoxicillin-plus-metronidazole as an adjunct to non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis of randomized, placebo- controlled trials. *J Clin Periodontol* 2017 oct;13:1-21.
 52. Ye P, Chang J, Foo LF, Yap BC. An early report: a modified porphyrin-linked metronidazole targeting intracellular *Porphyromonas gingivalis* in cultured oral epithelial cells. *Int J Oral Sci.* 2017 Sep;9(3):167-173.
 53. van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Periodontal Research.* 1992; 63:52–57.
 54. Pavicic MJ, van Winkelhoff AJ, Graaff J. Synergistic effects between amoxicillin, metronidazole, and the hydroxymetabolite of metronidazole against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimic Ag Chem.* 1991; 35:961–966.
 55. Dubey S, Saha SG, Rajkumar B, Dhole TK. Comparative antimicrobial efficacy of selected root canal irrigants on commonly isolated microorganisms in endodontic infection. *Eur J Dent.* 2017;11(1):12-16.
 56. Krishna JN, Raghu R, Bolla N, Muddanna K. An *in vitro* comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of 10% metronidazole gel, 2% chlorhexidine gel, and a combination of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis*. *J Orofac Sci.* 2012;4:26–31.
 57. Shaik J, Garlapati R, Nagesh B, Sujana V, Jayaprakash T, Naidu S. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste and calcium hydroxide using chitosan as carrier against *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. *J Conserv Dent.* 2014; 17(4): 335–339.
 58. Onnainty R, Onida B, P´aez P, Longhi M, Barresi A, Granero G. Targeted chitosan-based bionanocomposites for controlled oral mucosal delivery of chlorhexidine. *Int J Pharma.* 2016;509(1):408-418.
 59. Radovic-Moreno AF, Lu TK, Puscasu VA, Yoon CJ, Langer R, Farokhzad OC. Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall- targeted delivery of antibiotics. *ACSNANO.* 2012;6(5):4279-4287.

60. Choi JE, Loke C, Waddell JN, Lyons KM, Kieser JA, Farella M. Continuous measurement of intra-oral pH and temperature: development, validation of an appliance and a pilot study. *J Oral Rehabil.* 2015;42:563-570.