

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Odontologia

Mauricio Polla

**ESTUDO *IN VITRO* DE UM COMPÓSITO ODONTOLÓGICO
CONTENDO MONTMORILONITA E CLOREXIDINA:
AVALIAÇÃO DE UM ANO**

São Paulo

2021

Mauricio Polla

**ESTUDO *IN VITRO* DE UM COMPÓSITO ODONTOLÓGICO
CONTENDO MONTMORILONITA E CLOREXIDINA:
AVALIAÇÃO DE UM ANO**

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. Marcia Hiromi Tanaka

Co-orientadora: Profa. Dra. Letícia C. C. Boaro

São Paulo

2021

P833 Polla, Mauricio

Estudo in vitro de um compósito odontológico contendo montmorilonita e clorexidina: avaliação de um ano / Mauricio Polla.
– São Paulo, 2021.

37 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Santo Amaro – 2021.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Hiromi Tanaka

Co-Orientador: Profa. Dra. Leticia Cristina Cidreira Boaro

1. Clorexidina. 2. Resina composta. 3. Materiais dentários. I. Tanaka, Marcia Hiromi, orient. II. Boaro, Leticia Cristina Cidreira, co-orient. III. Universidade Santo Amaro IV. Título

AGRADECIMENTOS

Ao programa de **Mestrado em Odontologia da Universidade Santo Amaro**, sob a coordenação do **Prof. Dr. Wilson R. Sendyk**, em nome do qual extendo meu reconhecimento e agradecimento a **todos os demais professores** da equipe, pela dedicação na nobre missão de ensinar. Todos nos proporcionaram condições para nosso crescimento profissional.

Em especial, à **Profª Drª Marcia Hiromi Tanaka**, minha orientadora, e à **Profª Drª Letícia C. C. Boaro**, minha co-orientadora. Meus sinceros agradecimentos pela generosidade, disponibilidade e educação em todos os momentos da condução deste projeto. O apoio das senhoras foi fundamental para a conclusão deste Mestrado.

À **Larissa Tavares Sampaio Silva** pelo suporte e colaboração durante a fase laboratorial desta pesquisa. Sincero agradecimento.

Aos **amigos** do programa de Mestrado em Odontologia da UNISA, pelas experiências compartilhadas e momentos felizes divididos.

À minha família, **Carolina Porto** minha esposa e nossa **filha Catarina**, por todo o apoio incondicional e compreensão durante a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar compósitos contendo o complexo montmorilonita (MMT)/clorexidina (CHX) e cargas convencionais de vidro de bário (VB) e sílica coloidal (Si) em diferentes concentrações. As análises *in vitro* avaliadas foram atividade antimicrobiana, liberação de CHX e a sorção e solubilidade deste compósito. Os corpos de prova dos compósitos experimentais foram confeccionados com matriz orgânica de BisGMA/TEGDMA em proporções iguais em peso. Os compósitos tiveram como carga a MMT organofilizada incorporada com CHX. A concentração da CHX utilizada, observando apenas o fármaco, foi de 0,5% de CHX em peso. Na nanopartícula de MMT, houve incorporação de 10% de CHX em peso. No compósito, a concentração do complexo MMT/CHX foi de 5% em peso. As concentrações totais de carga inorgânica utilizadas foram de 0, 30 e 60% em peso, com a proporção de VB/Si de 80/20 ou 70/30 em peso, respectivamente, totalizando cinco grupos experimentais. Para cada grupo experimental foram confeccionados 60 espécimes (N = 300). A cepa padrão de *S. mutans* UA159 foi utilizada nos testes. A atividade antibacteriana foi avaliada durante 12 meses através do teste de halo de inibição dos compósitos, e também através do teste de formação de biofilme pela inserção de disco polimerizado dos espécimes (n = 30). A liberação de CHX dos espécimes (n = 5) foi medida por espectrofotometria ultravioleta (255 nm) por 50 dias. A sorção e a solubilidade foram avaliadas em espécimes cilíndricos ($\phi=15$ mm e $h=1$ mm) de acordo com as normas ISO 4049 (n = 5). Os dados não foram normais e nem homocedásticos, e os testes estatísticos de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Dunn foram utilizados. Em relação à formação de biofilme, compósitos dos grupos contendo maior carga inorgânica (60%) mostraram melhor atividade antibacteriana. O grupo 80/20 apresentou menor formação de biofilme que o grupo 70/30. Já para o teste de halo de inibição, o grupo com VB/Si 70/30 com 60% de carga teve a melhor atividade antimicrobiana, seguido pelo grupo VB/Si 80/20 com 60% de carga. Os dados da espectrofotometria da liberação de CHX indicaram melhores resultados em ambos os grupos com 60% de carga inorgânica, pois tiveram liberação mais controlada do fármaco, com o grupo VB/Si 70/30 com 60% de carga exibindo o melhor desempenho. Nos testes de sorção e solubilidade entre os grupos não houve diferença estatística e os dados foram aceitáveis de acordo com a normativa ISO 4049. Conclui-se que estes compósitos apresentam atividade antimicrobiana com

menor número de UFC, pela presença do halo de inibição a longo prazo, têm a capacidade de liberação de CHX por 50 dias e que este complexo MMT/CHX não interferiu nas propriedades mecânicas deste compósito.

Palavras-chave: Clorexidina, Resina composta, Materiais dentários.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate composites containing the montmorillonite (MMT) / chlorhexidine (CHX) complex and conventional fillers of barium glass (VB) and colloidal silica (Si) in different concentrations. The *in vitro* analyzes evaluated were antimicrobial activity, CHX release and the sorption and solubility of this composite. The specimens of the experimental composites were made with organic matrix of BisGMA / TEGDMA in equal proportions in weight. The composites were charged with the organophilized MMT incorporated with CHX. The concentration of CHX used, observing only the drug, was 0.5% CHX by weight. In the MMT nanoparticle, 10% of CHX by weight was incorporated. In the composite, the concentration of the MMT / CHX complex was 5% by weight. The total concentrations of inorganic fillers used were 0, 30 and 60% by weight, with a VB/Si ratio of 80/20 or 70/30 by weight, respectively, totaling five experimental groups. For each experimental group, 60 specimens were made (N = 300). The standard strain of *S. mutans* UA159 was used in the tests. The antibacterial activity was evaluated during 12 months through the halo test of inhibition of the composites, and also through the biofilm formation test by inserting the polymerized disk of the specimens (n = 30). The release of CHX from the specimens (n = 5) was measured by ultraviolet spectrophotometry (255 nm) for 50 days. Sorption and solubility were evaluated in cylindrical specimens ($\phi = 15$ mm and h = 1 mm) according to ISO 4049 (n = 5). The data were neither normal nor homoscedastic, and Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and Dunn statistical tests were used. Regarding the formation of biofilm, composites from the groups containing inorganic load (60%) showed better antibacterial activity. The 80/20 group showed less biofilm formation than the 70/30 group. In the results of the inhibition halo test, the group with VB/Si 70/30 with 60% load had the best antimicrobial activity, followed by the group VB/Si 80/20 with 60% load. The CHX release spectrophotometry data indicated better results in both groups with 60% inorganic load, as they had more controlled drug release, with the VB/Si 70/30 group with 60% load showing the best performance. There was no statistical difference in the sorption and solubility tests between the groups and the data were acceptable according to the ISO 4049 standard. It is concluded that these composites have antimicrobial activity because the lower number of CFU, the presence of inhibition

halo test for long-term, have a capacity to release CHX for 50 days, and the MMT/CHX complex did not interfere in the mechanical properties of this composite.

Key words: Chlorhexidine, Composite resin, Dental materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da montmorilonita	13
Figura 2 - Confeção das matrizes para corpos de prova.....	18
Figura 3 - Corpos de prova polimerizados e armazenados em estufa.....	19
Figura 4 - Placas com colônias de bactérias	21
Figura 5 - Placa sem crescimento bacteriano	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
3. REVISÃO DA LITERATURA	13
4. METODOLOGIA	16
4.1 Manipulação dos compósitos	16
4.2 Preparo dos espécimes	17
4.3 Preparo da cepa padrão	19
4.4 Formação do biofilme sobre os espécimes	20
4.5 Contagem das colônias de <i>S. mutans</i>	20
4.6 Halo de inibição	21
4.7 Liberação da clorexidina	22
4.8 Sorção e solubilidade	23
4.9 Análises estatísticas... ..	23
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

O microbioma oral é extremamente diversificado, pois residem centenas de espécies de microrganismos na cavidade oral, com populações bacterianas variadas que formam um complexo sistema. Doenças bucais como a doença cárie não são causadas por uma única espécie, mas por uma associação delas, em conjunto com outros fatores além dos microrganismos, caracterizando afecções multifatoriais (Krishnan et al. 2017). Entretanto, é possível associar o desenvolvimento da doença cárie com a presença de certas espécies, como o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) e *Lactobacillus spp.* (Sanz et al. 2017).

Os materiais odontológicos mais utilizados na restauração destas lesões cariosas são as resinas compostas, pois apresentam excelentes propriedades estéticas e mecânicas, além de possuírem diversas possibilidades de uso, como material restaurador, selantes de fissuras, onlay e inlay, coroas, restaurações provisórias, confecção de núcleos e cimentação de aparatos ortodônticos (Ferracane et al, 2011).

Um ponto negativo destes materiais restauradores é a biodegradação do material causada pela disbiose de bactérias bucais. Inicialmente, ocorre a formação de biofilme bacteriano nos compósitos, com subsequente produção de ácidos pelos microrganismos pode resultar na desmineralização dentária e aumento na incidência de cárie secundária nas margens da interface dente-compósito. Por se tratar de uma lesão que com frequência acomete os dentes restaurados, a cárie secundária é uma das principais causas de falha das restaurações em resina composta (Nedeljkovic et al. 2015; Sanz et al. 2017; Wang et al. 2019).

Assim, algumas estratégias para combater essa biodegradação estão sendo utilizadas nos novos materiais odontológicos restauradores. Alguns estudos buscam prevenir a formação do biofilme cariogênico através da liberação de agentes antibacterianos incorporados nos materiais como por exemplo, compostos orgânicos à base de metacrilato de metila que contém amônio quaternário catiônico, compostos orgânicos como a clorexidina e partículas metálicas como prata e zinco. A liberação destes agentes antimicrobianos pode aumentar a longevidade das restaurações pois sua ação é inibir ou inativar os microrganismos cariogênicos e

prevenir o aparecimento das cáries secundárias (Zhang et al. 2014; Zhang et al. 2017; Pratap et al. 2019; Liang et al. 2020; Ibrahim et al. 2020).

Um composto químico muito conhecido na indústria odontológica é a clorexidina (CHX), que pertence à classe das bisguanidas e apresenta amplo espectro de ação, agindo sobre diversos microrganismos, incluindo o *S. mutans* (Varoni et al. 2012).

Outros compostos estão sendo pesquisados, como o composto inorgânico montmorilonita (MMT). Este composto é interessante na produção de nanocompósitos poliméricos pois tem a capacidade de absorver moléculas orgânicas e possui liberação farmacológica controlada (He et al. 2006; Wang et al. 2008; Meirelles et al, 2017, Boaro et al. 2019).

O desenvolvimento de materiais odontológicos bioativos, entre eles compósitos a base de dimetacrilato de glicidila bisfenol A (Bis-GMA) e de dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) com MMT carregada com CHX, tem mostrado resultados positivos. A associação de MMT e CHX incorporadas aos compósitos a base de Bis-GMA/TEGDMA mostrou resultados promissores, sem prejuízo das propriedades mecânicas do compósito, liberação de CHX e atividade antimicrobiana (Boaro et al. 2016). O complexo MMT/CHX foi analisado nas concentrações de 2,5; 5 e 10%. No entanto, apenas a concentração de 5% apresentou atividade antimicrobiana para *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus aureus*, sem prejuízo das propriedades mecânicas e grau de conversão (Boaro et al. 2016).

No entanto, ainda é necessário avaliar no longo prazo se a adição desse complexo MMT/CHX em uma resina contendo cargas inorgânicas convencionais de vidro de bário e sílica coloidal, em diferentes concentrações, resulta em atividade antibacteriana e se há liberação CHX incorporada no compósito para o meio.

2. OBJETIVO

Avaliar o compósito híbrido contendo o complexo MMT/CHX e cargas convencionais (vidro de bário e sílica) em diferentes concentrações. Serão avaliados quanto a atividade antimicrobiana pelos testes de halo de inibição e formação do biofilme por um período de 12 meses, e também serão avaliados quanto à liberação de clorexidina, e a sorção e solubilidade deste compósito.

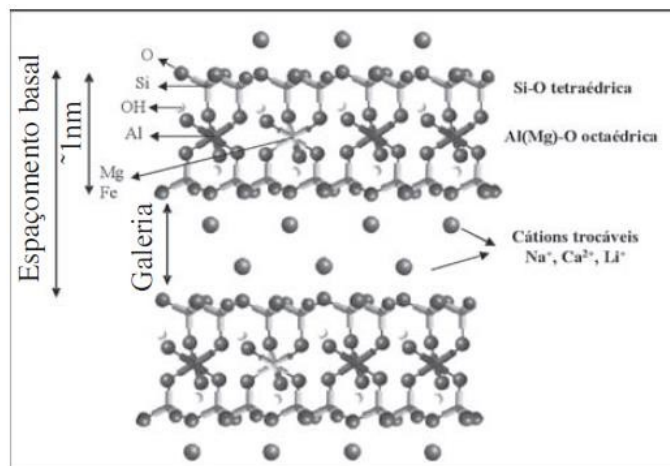
3. REVISÃO DA LITERATURA

Algumas possibilidades terapêuticas surgem quando se associam a nanotecnologia e farmacologia, pois novos materiais podem ser fabricados incorporando complexos de nanopartículas em argilas, polímeros, metais, açúcares, lipídeos entre outros, formando estruturas únicas e sistemas de liberação de fármacos (Yih, Alfandi. 2006; Bhattacharya. 2016; Liang et al. 2020).

Na indústria farmacêutica, a argila é um material conceituado para diversas aplicações devido suas propriedades físico-químicas, por possuir inércia química, área de superfície grande, pouca toxicidade, realizar troca catiônica e ter capacidade absorviva (Choy et al. 2007).

A argila mineral MMT é uma nanopartícula constituída de duas lâminas tetraédricas de sílica e uma lâmina central de alumina (Figura 1). Átomos de oxigênio ligam essas lâminas entre si, formando única estrutura, chamada de lamela, com os planos cristalinos orientados paralelamente (Alexandre, Dubois. 2000; Meirelles, Raffin. 2017).

Figura 1 – Estrutura da montmorilonita



Fonte: Paiva et al. 2008.

Forças polares de van der Waals mantêm a configuração empilhada das lamelas. Durante a análise em nanoescala, as forças intermoleculares consideradas como fracas possuem uma grande área de superfície por unidade de massa. Assim, as forças intermoleculares se tornam relevantes nas propriedades mecânicas (Merinska et al. 2002).

Estudos já identificaram que a incorporação de argila mineral MMT na matriz polimérica em nanocompósitos leva à melhoria nas propriedades mecânicas, físicas e químicas do composto, quando avaliado comparativamente com outros materiais convencionais (Zhou et al. 2005; Solhi et al. 2012).

A adição do MMT na matriz Bis-GMA e TEGDMA não alterou a cinética de polimerização dos dimetacrilatos, conforme um estudo comparativo de materiais poliméricos com MMT e diferentes concentrações de vidro de bário. Conclui-se que o grau de conversão foi estatisticamente semelhante para os tipos de carga analisadas (Campos et al. 2016).

Outro composto muito utilizado na odontologia é a CHX, que é um agente antimicrobiano de amplo espectro. A molécula catiônica da CHX é atraída pela carga negativa de superfície da bactéria, sendo adsorvida à membrana celular. Em altas concentrações, causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana. Em doses baixas, a membrana celular tem sua integridade alterada, determinando extravasamento do conteúdo bacteriano (Zanatta, Rösing. 2007).

Vários estudos são realizados com a CHX na prevenção e tratamento de infecções bucais, seja na forma de enxaguantes bucais ou materiais restauradores odontológicos (Varoni et al. 2012). Estas pesquisas mostram que mesmo em baixas concentrações de CHX nos nanocompósitos, elas são capazes de inibir ou matar bactérias (He et al. 2006; Cheng et al. 2012; Zhang et al. 2014).

No entanto, a CHX misturada diretamente com compósitos resulta em um material com superfície áspera, liberação de grandes quantidades de CHX em curto prazo e diminuiu a propriedades mecânicas. Porém, a CHX incorporada à sílica porosa trouxe resultados promissores pois não alterou as propriedades mecânicas e observou-se a liberação da CHX por mais tempo. Tanto o grupo CHX misturada com compósito quanto CHX incorporada com a sílica porosa, inibiram as espécies bacterianas como *S. mutans* e *Lactobacillus casei* (Zhang et al. 2014).

A associação de MMT e CHX (complexo MMT/CHX) obteve resultados positivos na atividade antibacteriana, sem comprometer as propriedades mecânicas do material. No entanto, a atividade antibacteriana foi dependente da concentração

do complexo MMT/CHX adicionado e foram mais efetivas nas espécies *S. mutans* e *P. gingivalis* do que no *S. aureus* (Boaro et al. 2019).

Assim, observa-se que as nanopartículas apresentam um potencial significativo para melhorar os materiais odontológicos restauradores (Cheng et al. 2015). No entanto, ainda são necessárias pesquisas no aprimoramento e desenvolvimento destes materiais a longo prazo (Ibrahim et al. 2020).

4. METODOLOGIA

4.1 Manipulação dos compósitos

Foram confeccionados compósitos experimentais com matrizes resinosas à base de Bis-GMA e TEGDMA (ESSTECH Technology Essington, Pennsylvania, EUA), em proporções iguais em peso. Os compósitos tiveram como carga a MMT organofilizada (Cloisite 30B, Southern ClayProducts, Texas, USA) incorporada com CHX (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, GER) além de partículas de vidro de bário e de sílica coloidal (FGM, Joinville, SC, Brasil).

A concentração da CHX utilizada, observando apenas o fármaco, foi de 0,5% de CHX em peso. Na nanopartícula de MMT houve incorporação de 10% de CHX em peso. No compósito, a concentração do complexo MMT/CHX foi de 5% em peso.

O sistema fotoiniciador utilizado foi composto pela amina terciária dimetilamonoetil metacrilato (DMAEMA) 98% (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Alemanha) na concentração de 1% em peso, e canforoquinona 97% (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Alemanha) na proporção de 0,8% em peso. Os compósitos foram manipulados em sala com iluminação amarela para evitar a polimerização durante o processo de confecção. Primeiramente foi manipulada a matriz orgânica com o auxílio de uma balança analítica (Ohaus-Adventure, Xangai, China). Para a incorporação da carga foi utilizado um misturador automático à vácuo (SpeedMixer DAC 150 FVZ, Hauschild) por um período de 3 minutos, a uma velocidade de 3500 rpm.

A carga inorgânica foi colocada em duas concentrações diferentes: 30% ou 60% em peso. Sendo que dessas duas concentrações diferentes, a proporção vidro de bário/sílica foram duas, 80/20 e 70/30. Como grupo controle foi considerado o que não houve adição de nenhuma carga inorgânica, mas havia o complexo MMT/CHX. A amostra total foi dividida em 5 grupos experimentais, de acordo com a tabela 1. Após serem manipulados, os compósitos foram armazenados em frascos escuros hermeticamente fechados, e mantidos refrigerados até o momento do uso.

Para definir qual seria a fração de CHX adicionada à MMT, foi utilizado como referência o trabalho de Boaro et al (2019). Neste estudo mencionado, os pesquisadores utilizaram a análise por termogravimetria para obterem os perfis de

decomposição térmica da MMT, da CHX e do complexo MMT/CHX. Este tipo de teste corresponde a uma técnica destrutiva no ramo de análises térmicas, na qual se monitora a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas.

Tabela 1: Grupos experimentais.

Grupo	Carga inorgânica		MMT+CHX (% em peso)
	Concentração (% em peso)	Proporção VB/Si	
1	30	80/20	5
2		70/30	
3	60	80/20	
4		70/30	
5	Nenhuma		

VB=vidro de bário; Si=sílica coloidal

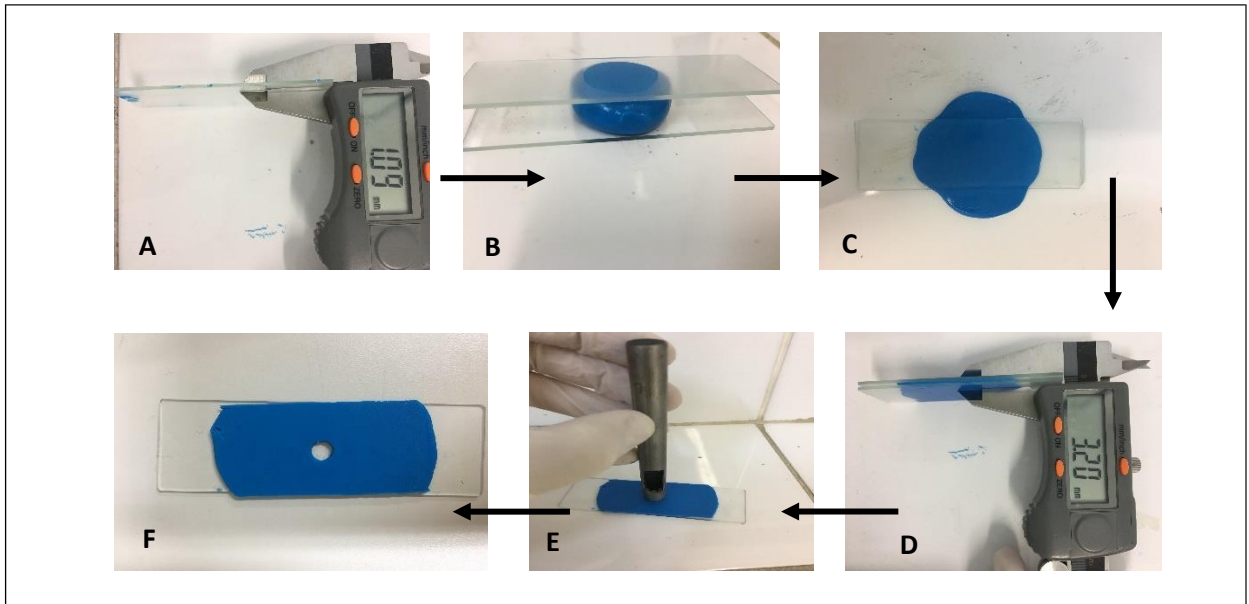
4.2 Preparo dos espécimes

Para confecção dos corpos de prova, foi utilizado uma matriz de silicone com 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Esta matriz foi obtida da seguinte maneira: o silicone foi manipulado e interposto entre duas lâminas de vidro previamente vaselinadas e que já tiveram mensuradas suas espessuras (para obter a matriz de silicone com a espessura desejada, as medidas das placas de vidro devem ser descontadas da aferição final). Em seguida, as placas de vidro foram prensadas, até a espessura de 1 mm do silicone, sendo aferido com paquímetro. O excesso do material foi então removido. Utilizando-se de um perfurador, o centro do silicone foi perfurado, para obter corpos de prova padronizados. Para as mensurações foi utilizado um paquímetro digital. A sequência está ilustrada na figura 2.

A fotopolimerização dos corpos de prova ocorreu por 25 segundos, com uma potência de 720 mW/cm², com dose de 18J/cm². O equipamento utilizado foi Radical (LED lightcuring, SDI Dental Limited, Austrália).

Para cada grupo experimental descrito anteriormente, foram confeccionados 60 espécimes. Estes ficaram armazenados em água destilada a 37 °C (figura 3), com a água sendo trocada semanalmente. Para a avaliação do biofilme, de 2 em 2 meses foram selecionados 5 espécimes da placa de poços e assim sucessivamente até o final do período avaliativo previsto.

Figura 2 – Confeção das matrizes para corpos de prova.



Fonte: O autor.

Figura 3 - Corpos de prova polimerizados e armazenados em estufa.



Fonte: O autor.

4.3 Preparo da cepa padrão

A cepa padrão *S. mutans* UA159 foi reativada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo, sacarose a 20% e 50 microlitros (μ l) da bactéria. A cepa foi acondicionada em tubos tipo falcon e levados a jarra de anaerobiose. A jarra foi mantida em estufa a 37 °C, por aproximadamente 18 horas.

Decorridas 18 horas, o inóculo contendo 0,5 mL da cepa padrão, adicionado ao novo meio, foi utilizado nas etapas seguintes. O inóculo foi colocado em ambiente de anaerobiose por aproximadamente 6 horas. Decorrido este período, foi obtido um inóculo com leitura correspondente a 0,7 nm em espectrofotômetro.

A próxima etapa consistiu no preparo de outro meio de cultura, que foi colocado na placa de poços. Este meio continha BHI caldo, sacarose a 20% e cerca de 120 microlitros do inóculo. Sendo distribuídos na placa de 24 poços, os espécimes foram posicionados um a um em cada poço, e a placa foi fechada e acondicionada em jarras de anaerobiose, seguindo para a estufa, onde permaneceu durante 24 horas.

4.4 Formação do biofilme sobre os espécimes

No dia seguinte após 24 horas, o meio que estava nas placas foi removido e descartado e outro meio semelhante ao anterior, diferindo apenas pela ausência do inóculo em sua composição, foi colocado, e mais uma vez a placa retornou para a estufa no ambiente de anaerobiose por mais 24 horas.

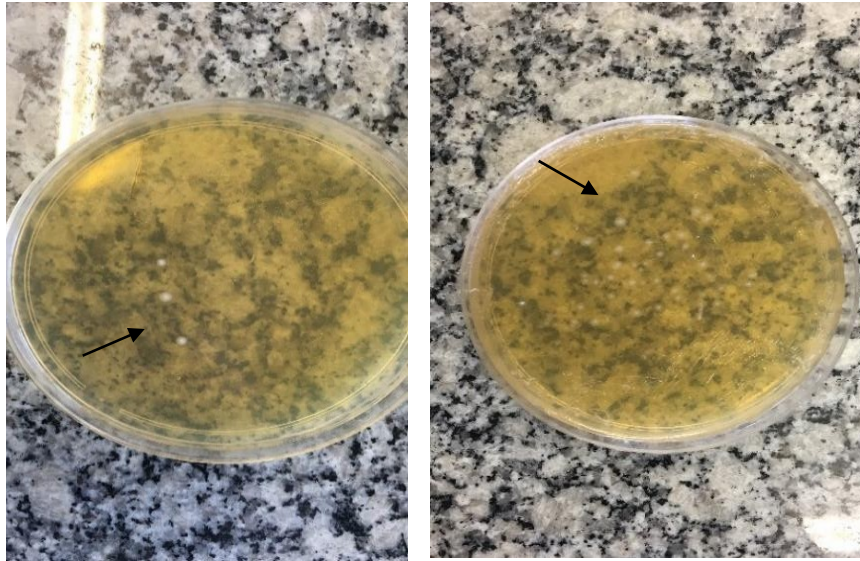
No quarto dia do experimento foi realizado o mesmo procedimento que o do dia anterior, isto é, os meios foram trocados e a placa se manteve na estufa por mais 24 horas.

4.5 Contagem das colônias de *S. mutans*

No quinto dia, ou seja, após 3 dias de cultura, utilizando o auxílio de uma pinça estéril, cada espécime foi removido de seu respectivo poço e foi imediatamente imerso em solução salina. Assim, foram removidas as bactérias fracamente aderidas no biofilme e em seguida, foi colocado em um tubo tipo falcon contendo 5 mL de soro estéril e preparada para diluição.

Para a diluição, dez microlitros foram transferidos para um microtubo contendo 990 microlitros de soro estéril. Desta diluição tomou-se uma alíquota de 100 microlitros que foi transferida para outro microtubo contendo 900 microlitros. No plaqueamento foi utilizada a diluição de $1:1000 = 10^2$. As placas foram acondicionadas nas jarras de anaerobiose por 48 horas. No último dia do experimento, após as 48 horas em estufa, as placas foram retiradas e as colônias foram contadas e multiplicadas pelo fator de diluição, conforme figuras 4 e 5.

Figura 4 – Placas com colônias de bactérias.



Fonte: O autor.

Figura 5 – Placa sem crescimento bacteriano.



Fonte: O autor.

4.6 Halo de inibição

O método para diluição em ágar foi conduzido de acordo com o protocolo M2-A8 do *Clinical Standard Laboratory Institute* (CLSI), com algumas modificações (Wayne, 2003).

Este método foi escolhido para testar o efeito antimicrobiano no crescimento planctônico. Cepas de *S. mutans* UA159 foram cultivadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA - Difco), a 5% de CO₂. Um período de 48 h de incubação em condições anaeróbias foi usado para o crescimento de bactérias. As culturas foram coletadas e suspensas em tubos TSB para preparação do inóculo bacteriano. O inóculo foi ajustado para densidade óptica em 660 nm (aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC / mL) em um espectrofotômetro. A suspensão bacteriana foi inoculada em toda a superfície da placa de ágar com um swab estéril. TSA foi usado para crescimento do *S. mutans*. Os espécimes de discos foram desinfetados com álcool (n=30) foram posicionados sobre o ágar e as placas foram incubadas em condições apropriadas por 48 h. Após esse período, as zonas de inibição foram mesuradas (Boaro et al. 2019).

Para a mensuração do halo de inibição formado utilizou-se de paquímetro digital. Duas medições foram realizadas em cada halo, sendo consideradas como –alturall e –largurall. Uma média destas medidas foi realizada e considerada como o diâmetro do halo formado em milímetros. Para não haver interferências nos resultados devido possíveis variações na confecção dos espécimes, os seus diâmetros também foram aferidos com paquímetro digital.

4.7 Liberação da clorexidina

A liberação da CHX foi avaliada por espectrofotometria ultravioleta (255 nm) durante 50 dias. Foram confeccionados espécimes utilizando uma matriz de silicone com 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, entre duas lâminas de vidro. A fotopolimerização foi feita utilizando uma dose de aproximadamente 18J/cm². Os espécimes (n=5) foram previamente pesados, introduzidos em frascos contendo 5 ml de solução tampão salina (pH 7, 50 mM) e então submetidos a incubação em *shaker* sob temperatura de 37 °C e agitação mecânica de 80 rpm. Alíquotas de 200 µl foram coletados nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas e, a cada 24 horas durante 5 dias (de 0 a 96 horas), e posteriormente semanalmente até atingir 50 dias. A quantificação da CHX foi realizada por análises de UV no comprimento de onda de 255 nm em leitora de microplaca i3x Spectramax (Molecular Devices, USA). O gráfico 1 mostra a concentração de CHX (mg/mL) e % de liberação em função do tempo para os compósitos híbridos.

4.8 Sorção e Solubilidade

A sorção e solubilidade foram feitas de acordo com a normativa ISO 4049. Espécimes cilíndricos com 15 mm de diâmetro e 1 mm de altura foram confeccionados utilizando-se uma matriz (n=5). A fotoativação foi realizada com uma dose de 18J/cm² (Radii-cal (LED lightcuring, SDI Dental Limited, Austrália). Após a remoção do espécime da matriz, a superfície oposta também recebeu a mesma dose para garantir a máxima polimerização. Em ambos os casos o espécime foi posicionado de forma que uma única exposição fosse suficiente para cobrir o diâmetro todo. Em seguida, os espécimes foram submetidos a uma dessecação em um dessecador a vácuo a 37 °C, por 14 dias. Os espécimes foram então pesados em uma balança analítica Ohaus-Adventure, Xangai, China) para a obtenção de m_1 . O diâmetro e a altura de cada espécime foram mensurados para o cálculo do volume.

Em seguida, os espécimes foram imersos em água destilada a 37 °C por 7 dias. Os espécimes foram levemente secos com papel absorvente, e novamente pesados para obtenção de m_2 . Foram então dessecados como descrito anteriormente por 14 dias, e pesados para obtenção de m_3 . A sorção e a solubilidade foram calculadas para cada espécime de acordo com as seguintes fórmulas:

$$SR = \frac{m_2 - m_1}{V} \qquad SL = \frac{m_1 - m_3}{V} \quad |$$

Onde: SR é a sorção, SL é a solubilidade, m_1 é a massa obtida após a secagem inicial do espécime (μg), m_2 a massa após o período de imersão em água (μg), m_3 a massa final após a dessecação do espécime (μg), e V é o volume de cada espécime (mm^3).

4.9 Análises estatísticas

Os dados não foram normais e nem homocedásticos. Para os grupos serem considerados diferentes entre si, o p deveria ser menor que 0,05 (nível global de significância de 5%). As análises de formação de biofilme, sorção e solubilidade foram realizadas com os testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Dunn.

5. RESULTADOS

O teste de formação de biofilme e as médias das unidades formadoras de colônias são apresentados na tabela 2. No 2º mês, tanto na proporção 80/20 quanto na proporção 70/30, observa-se uma diferença estatística entre os grupos 30% e 60%. No entanto, quando comparamos os grupos 80/20 com 30% e 70/30 com 60% não existe diferença estatística. Não foi observado também diferença estatística entre os grupos 80/20 com 60% e o controle. O grupo 70/30 com 30% foi o único com diferença estatística para todos os grupos avaliados.

No 4º mês e no 8º mês não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados.

Já no 6º mês, tanto na proporção 80/20 quanto na proporção 70/30, observa-se uma diferença estatística entre os grupos 30% e 60%. No entanto, quando comparamos os grupos com 30% tanto 80/20 quanto 70/30 não existe diferença estatística. Não foi observado também diferença estatística entre os grupos 80/20 com 60% e o controle. Outra comparação que não houve diferença estatística foram os grupos com 30%, tanto para 80/20 quanto 70/30 quando comparadas ao controle.

No 10º mês, na proporção 80/20, não houve diferença estatística entre os grupos 30% e 60%. No entanto, na proporção 70/30, observa-se uma diferença estatística entre os grupos 30% e 60%. Entretanto, esta diferença não é observada quando comparada com o grupo controle.

Os dados do 12º mês infelizmente não puderam ser coletados, pois houve a interrupção das atividades na universidade devido à pandemia da COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2.

A atividade antimicrobiana foi avaliada também através do teste de halo de inibição. Os resultados são apresentados na tabela 3, sendo expressos como presença ou ausência do halo de inibição. De acordo com os dados obtidos, todos os grupos experimentais apresentaram formação de halo de inibição nos dois primeiros meses avaliados. Observamos que para o grupo 80/20, nos espécimes com 60% de carga, houve a formação do halo de inibição em todos os meses avaliados, exceto os três últimos (meses 10, 11, 12). Para os espécimes com 30%, houve formação de halo em todos os meses, exceto nos meses 11 e 12. Para o

grupo 70/30, os espécimes com 60% de carga exibiram halo de inibição em todo período de avaliação, exceto no 4º mês. Naqueles espécimes com 30%, não houve formação de halo nos meses 4, 6, 11 e 12. Para o grupo controle, houve formação de halo apenas nos meses 1, 2, 4, 7 e 12.

Em relação à liberação de CHX medida através de espectrofotometria, de acordo com o gráfico 1. Os dados obtidos indicaram que ambos os grupos com 30% de carga inorgânica e o grupo controle apresentaram rápida liberação de CHX logo nos primeiros dias de avaliação, mantendo maiores porcentagens de liberação ao longo de todo o período de avaliação. O grupo 30% - 80/20 apresentou a maior liberação de clorexidina, sendo esta acima de 30% do total de CHX incorporado nos espécimes. O oposto foi observado nos grupos contendo 60% de carga inorgânica, pois apresentaram inicialmente liberação mais lenta e em menor quantidade, mantendo níveis baixos ao longo do período avaliado. Além disso, houve menor variação ao longo do tempo, ou seja, a liberação foi lenta e constante. Dessa forma, o grupo com 60% - 70/30 apresentou o melhor resultado porque manteve incorporada no espécime maior quantidade de CHX, e apresentou taxas mais uniformes ao longo do tempo.

Nos testes de sorção e solubilidade, os resultados obtidos ficaram dentro do aceitável segundo a normativa ISSO 4049, e, além disso, os dados indicaram que não houve diferença estatística entre os grupos, tanto para os dados de sorção quanto solubilidade. As médias e desvios-padrão são apresentados na tabela 4.

Tabela 2- Médias das unidades formadoras de colônias contadas numa diluição de 10²

VB/Si		0	2º mês	4º mês	6º mês	8º mês	10º mês	12º mês
Proporção	Quantidade							
80/20	60%	0	0,0 (0,0) C	5,8 (6,7) A	0,3 (0,5) C	0,5 (0,6) A	6,0 (7,3) B	**
	30%	0	2,3 (1,7) A	23,3(15,4) A	1,5 (1,3) B	1,8 (2,4) A	12,8 (23,5) B	**
70/30	60%	0	2,8 (2,5) A	9,0 (9,3) A	4,5 (5,2) A	0,8 (1,0) A	4,3 (5,3) B	**
	30%	0	0,5 (0,6) B	27,0 (33,6) A	1,5 (1,7) B	0,8 (1,0) A	51,8 (40,9) A	**
Controle*		0	0,0 (0,0) C	14,8 (13,7) A	0,0 (0,0) BC	0,0 (0,0) A	24,5 (43,8) AB	**

Teste Mann-Whitney – comparação 2 a 2 dentro do mesmo mês. Mesma letra – sem diferença estatística ($p>0,05$). Letras diferentes – diferença estatística ($p<0,05$).

* Controle: grupo com 5% de MMT/CHX sem nenhuma carga inorgânica

** estes dados não puderam ser coletados.

Tabela 3: Halo de inibição. Resultados ao longo de doze meses.

VB/silica (em peso)		Mês											
Proporção	Quantidade	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
80/20	60%	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A
	30%	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A
70/30	60%	P	P	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P
	30%	P	P	P	A	P	A	P	P	P	P	A	A
Controle*		P	P	A	P	A	A	P	A	A	A	A	P

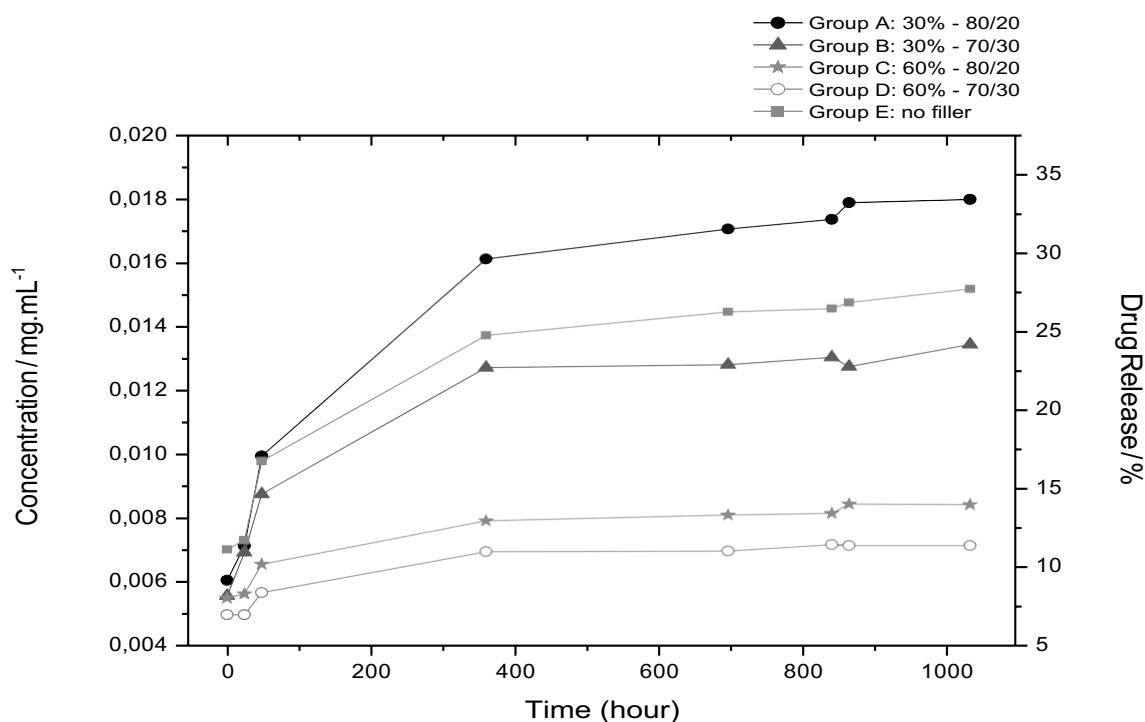
* Controle: grupo com 5% de MMT/CHX, sem nenhuma carga inorgânica. P= Presente e A=Ausente

Tabela 4 - Médias (desvio padrão) em $\mu\text{g/mL}$ dos dados de sorção e solubilidade.

VB/Sílica		Sorção	Solubilidade
Proporção	Quantidade		
80/20	60%	0,002 (0,004)	0,037 (0,003)
	30%	0,003 (0,002)	0,046 (0,021)
70/30	60%	0,001 (0,001)	0,064 (0,033)
	30%	0,001 (0,001)	0,039 (0,014)
Controle*		0,001 (0,001)	0,044 (0,018)

* Controle: grupo com 5% de MMT/CHX, sem nenhuma carga inorgânica.

Gráfico 1 – Liberação de CHX. Avaliação por espectrofotometria ultravioleta (255 nm).



Concentração de CHX (mg/mL) e % de liberação em função do tempo para os compósitos híbridos. Onde A – 30% de carga proporção 80VB/20Si; B – 30% de carga proporção 70VB/20Si; C – 60% de carga proporção 80VB/20Si; D – 60% de carga proporção 70VB/20Si; E – nenhuma carga inorgânica

6. DISCUSSÃO

Há um vasto campo para pesquisas e desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas com objetivo de prevenção e tratamento da doença cárie, principalmente da cárie secundária. Nesses sistemas, vários agentes antibacterianos têm sido pesquisados, podendo dividi-los em três categorias principais: (1) compostos orgânicos à base de metacrilato de metila que contêm um grupo funcional baseado em amônio quaternário catiônico; (2) compostos orgânicos que possuem propriedades que promovem a eliminação ou inibição de microrganismos diretamente, por exemplo, CHX; e (3) compostos inorgânicos, por exemplo, partículas metálicas, como prata, zinco e outras. (Pratap et al. 2019; Liang et al. 2020; Ibrahim et al. 2020).

As nanopartículas de MMT utilizadas neste estudo (Cloisite 30B) possuem amônio quaternário em sua composição. A presença de sal de amônio quaternário na camada de sílica da nanopartícula pode ter influência na parede celular bacteriana, sendo responsável pela quebra desta estrutura na parede celular do microrganismo. Assim, uma hipótese é que o complexo MMT/CHX tenha esse efeito antibacteriano pela combinação de monômeros residuais, amônio quaternário e CHX que também foram observados num estudo de Boaro et al. (Boaro et al. 2019).

Os resultados dos testes de sorção e solubilidade dos compostos experimentais apresentaram resultados dentro do aceitável, de acordo com a normativa ISO 4049. Foi possível observar que além de não perder propriedade mecânica, portanto não ocorria uma liberação de monômeros residuais, os compósitos testados liberavam gradualmente a CHX mantendo a atividade antimicrobiana por mais tempo.

Outro teste antimicrobiano utilizado foi o teste de halo de inibição. No entanto, a difusibilidade da CHX analisada no ágar variou com as diferentes concentrações de carga inorgânica (VB/Si), interferindo no resultado principal da análise que é o complexo MMT/CHX. Assim, o teste de halo de inibição foi utilizado apenas informando se o halo de inibição foi presente ou ausente

durante a análise no longo prazo. Dentro desta análise, no grupo 80/20 VB/Si a formação do halo de inibição foi mais constante ao longo dos meses avaliados, mas apesar de ter variado mais no grupo 70/30 VB/Si, o que continha 60% de carga formou halo em todos os meses, exceto no quarto. Mesmo no grupo controle podemos observar certa atividade antimicrobiana devido a formação do halo em alguns meses.

O teste de formação de biofilme destes compósitos foi analisado estatisticamente dentro de cada mês avaliado. No segundo mês, os grupos 80/20 VB/Si com 60% de carga inorgânica e o controle tiveram a melhor atividade antimicrobiana (exibiram menores médias de UFC). Já no quarto mês, não houve diferença estatística significativa entre todos os grupos, mas se considerarmos o valor absoluto, o 80/20 VB/Si com 60% de carga apresentou a menor média de UFC. No sexto mês avaliado, o grupo controle foi considerado melhor. No oitavo mês, também não houve diferença estatística significativa entre grupos, mas o grupo controle apresentou a menor média. No décimo mês, menor média foi exibida no grupo 70/30 VB/Si com 60% de carga inorgânica.

Nos materiais resinosos, uma maior concentração de carga inorgânica no compósito torna este material mais rugoso, conseqüentemente favorece a colonização microbiana e formação de biofilme. Notamos neste estudo que, apesar das análises estatísticas serem de cada mês, observamos que os compósitos dos grupos contendo maior carga inorgânica (60%) mostraram menor número de crescimento de microrganismos, conseqüentemente maior atividade antimicrobiana, quando consideramos os dados de todos os meses avaliados.

Outro resultado observado neste estudo foi um maior número de microrganismos nos grupos contendo carga inorgânica (VB/Si) em comparação ao grupo controle, que ocorreu em alguns meses (Tabela 2). Pode-se sugerir que este maior número de microrganismos se deva à quantidade de carga inorgânica que torna o compósito mais rugoso.

Por não encontrarmos na literatura artigos que utilizem exatamente as partículas deste projeto de pesquisa, fizemos um comparativo com outros estudos, como o que foi realizado por Zhang et al (2014). Esses autores ressaltam que a CHX em um compósito pode aumentar os efeitos inibitórios contra a adesão bacteriana e a formação do biofilme. Esta hipótese pode ser aplicada neste trabalho, pois até o grupo que não foi incorporado nenhuma carga orgânica, mas somente 5% do complexo MMT/CHX, também apresentou atividade antibacteriana.

Num outro estudo, Cheng e colaboradores desenvolveram um compósito com as nanopartículas de fosfato de cálcio e fluoreto de cálcio com CHX. Estes nanocompósitos apresentaram maior atividade antibacteriana com a redução da produção de ácidos no biofilme bacteriano quando comparando com os produtos comercialmente disponíveis no mercado (Cheng et al. 2012).

Um compósito a base de BisGMA/TEGDMA contendo o complexo MMT/CHX foi testado em concentrações diferentes por Boaro et al. (2019). Todas as concentrações testadas apresentaram liberação de clorexidina e menor formação do biofilme, corroborando com os resultados dos dados encontrados no nosso estudo, que mostrou liberação de clorexidina a longo prazo.

Uma das limitações do teste de formação do biofilme pode ser observada nos dados do quarto e décimo mês que mostra um maior número de microrganismos comparado aos demais meses, em todos os grupos. A hipótese seria que talvez os corpos de prova aleatoriamente escolhidos para a avaliação poderiam não estar homoganeamente manipulados ou continham menor quantidade do complexo MMT/CHX.

Outra limitação foi na análise da liberação de CHX que seria quantificada por 12 meses. Entretanto após 50 dias ocorreu a interferência na leitura do comprimento de onda do material pelo espectrofotômetro, provavelmente devido à degradação dos compósitos. Assim, as leituras foram realizadas nos primeiros 50 dias (Gráfico 1). De acordo com os dados obtidos, foi possível correlacionar uma maior quantidade de CHX incorporada no espécime, de

acordo com os dados do gráfico 1, e que possivelmente foi liberada ao longo do tempo, com base nos resultados do teste de halo de inibição.

Durante a análise de liberação de CHX, os grupos com mais carga inorgânica (60%) demonstraram os melhores resultados uma vez que a liberação do fármaco ocorreu gradualmente, de maneira mais lenta e constante durante todo o período de avaliação. A hipótese é que mesmo com a perda de parte da CHX incorporada nos compósitos experimentais, ainda haverá quantidade suficiente de CHX incorporada nos espécimes. Isto poderá permitir por mais tempo a manutenção da atividade antibacteriana desses compósitos em comparação àqueles com 30% de carga e o grupo controle. Dessa forma, o melhor desempenho foi o do grupo com proporção VB/SI de 70/30 e 60% de carga.

O trabalho de Wu et al (2013) obteve resultados semelhantes. Este estudo avaliou se a presença de carga permite uma liberação mais controlada da CHX foi realizado por Wu et al (2013). Estes autores avaliaram compósitos contendo MMT/CHX e MMT/CHX-cobre. Os resultados obtidos demonstraram que os compósitos contendo o complexo MMT/CHX-cobre apresentaram atividade antimicrobiana melhorada. E que os compósitos CHX-Cu/MMT tiveram comportamento de liberação controlada da CHX e de longa duração.

No estudo de Zhang et al (2014), a partícula de carga era diferente, chamada de *mesoporous sílica nanoparticles* (MSN), e esta foi associada com CHX. Os resultados mostraram que houve liberação mais controlada do fármaco em comparação ao grupo que não continha MSN. Isso se assemelha a um dos resultados que obtivemos, pois quando comparados os grupos, a liberação de clorexidina foi mais controlada em ambos os grupos com carga inorgânica 60% em peso.

Notamos no nosso estudo que a presença de cargas inorgânicas como vidro de bário e sílica contribuiu tanto nas propriedades mecânicas quanto na atividade antibacteriana dos compósitos experimentais analisados. Outro fator observado foi que no grupo controle por não haver carga inorgânica,

proporcionalmente havia maior quantidade total da fração orgânica (monômeros), pois a concentração do complexo MMT/CHX foi o mesmo para todos os espécimes do estudo. Assim, sugere-se que a atividade antimicrobiana observada através do halo de inibição no longo prazo do grupo controle, e também pela ausência de UFC em alguns meses possivelmente se justifique devido a uma maior quantidade de monômeros residuais no espécime do grupo controle. Especula-se isso porque como é esperado que o composto se deteriore mais facilmente devido a ausência de carga inorgânica, mais monômeros residuais seriam liberados no longo prazo.

Portanto, considerando os dados dos testes de formação de biofilme e do halo de inibição, sugere-se que o grupo contendo a proporção 80/20 de VB/Si e 60% de carga apresentou o melhor resultado. Estes compósitos analisados têm bioatividade expressa pelo menor número de UFC e pela presença do halo de inibição a longo prazo que pode ser sugerida pela ação antimicrobiana do complexo MMT/CHX.

CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana foi observada em todos os compósitos contendo MMT/CHX. O grupo que continha a proporção 80/20 de VB/Si apresentou melhor desempenho, seguido do grupo 70/30.

A presença de uma maior quantidade de carga inorgânica, 60%, contribuiu positivamente para uma liberação de CHX de forma mais controlada. O grupo com proporção VB/Si de 70/30 com 60% de carga apresentou os melhores resultados.

Nas análises de sorção e solubilidade, os dados ficaram dentro do aceitável de acordo com a normativa ISO 4049.

REFERÊNCIAS

- Alexandre M, Dubois P. Polymer-layered silicate nanocomposites: Preparation, properties and uses of a new class of materials. *Materials Science & Engineering R-Reports*. 28(1-2):1-63. 2000.
- Bhattacharya M. Polymer Nanocomposites—A Comparison between Carbon Nanotubes, Graphene, and Clay as Nanofillers. *Materials*. 262(9):1-35. 2016.
- Boaro L, Campos LM, Varca GHC, Marques PA, Pimentel AC, Roman-Torres CV, Brandt WC, Cogo-Muller K, Braga RR, Parra DF. Bisgma/tegdma based material with antibacterial activity. *Dental Materials*. 32:e8-e9. 2016.
- Boaro LCC, Campos LM, Varca GHC, Dos Santos TMR, Marques PA, Sugii MM, Saldanha NR, Cogo-Müller K, Brandt WC, Braga RR, Parra DF. Antibacterial resin-based composite containing chlorhexidine for dental applications. *Dent Mater*. 35(6):909-918. 2019.
- Campos LMP, Boaro LC, Santos TMR, Marques PA, Almeida SRY, Braga RR, Parra DF. Evaluation of flexural modulus, flexural strength and degree of conversion in bisgma/tegdma resin filled with montmorillonite nanoparticles. *Journal of Composite Materials*. 51(7):927-937. 2016.
- Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*. 28(5):573-583. 2012.
- Cheng L, Zhang K, Weir MD, Melo MA, Zhou X, Xu HH. Nanotechnology strategies for antibacterial and remineralizing composites and adhesives to tackle dental caries. *Nanomedicine*. 10(4):627-41.2015.
- Choy J, Choi S, Oh J, Park T. Clay Minerals and Layered Double Hydroxides for Novel Biological Applications. *Appl. Clay Sci*. 36:122-132. 2007.
- Ferracane JL. Resin composite - state of the art. *Dent Mater*. 27(1):29-38. 2011.
- He HP, Yang D, Yuan P, Shen W, Frost RL. A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and chlorhexidini acetate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 297(1):235-243. 2006.
- Ibrahim MS, Garcia IM, Kensara A, Balhaddad AA, Collares FM, Williams MA, Ibrahim AS, Lin NJ, Weir MD, Xu HHK, Melo MAS. How we are assessing the developing antibacterial resin-based dental materials? A scoping review. *J Dent*. Aug; 99:103369. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103369. Epub 2020
- Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis*. 23(3):276-286. 2017.

Liang J, Peng X, Zhou X, Zou J, Cheng L. Emerging Applications of Drug Delivery Systems in Oral Infectious Diseases Prevention and Treatment. *Molecules*. 24;25(3):516. 2020.

Meirelles LMA, Raffin FN. Clay and Polymer-Based Composites Applied to Drug Release: A Scientific and Technological Prospection. *Pharm Pharm Sci*. 20:115-134. 2017.

Merinska D, Malac Z, Pospisil M, Weiss Z, Chmielova M, Capkova P, Simonik J. Polymer/clay nanocomposites based on MMT/ODA intercalates. *Composite Interfaces*. 9(6):529-540. 2002.

Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater*. 31(11):e247-77. 2015.

Paiva LB, Morales AR, Diaz FRV. Organophilic clays: characteristics, preparation methods, intercalation compounds and characterization techniques. *Ceramic*. 54:213-226. 2008.

Pratap B, Gupta RK, Bhardwaj B, Nag M. Resin based restorative dental materials: characteristics and future perspectives. *Jpn Dent Sci Rev*. 55(1):126-138. 2019.

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*. ;28:1041-1050. 2012.

Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (chx) in dentistry: State of the art. *Minerva Stomatologica*. 61(9):399-419. 2012.

Wang XY, Du YM, Luo JW. Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: Preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. *Nanotechnology*. 19(6). 2008.

Wayne P. Performance standards for antimicrobial disksusceptibility tests. Approved standard. 8th ed. CLSI. CLSI document M2-A8. 2003.

Wu Y, Zhou N, Li W, Gu H, Fan Y, Yuan J. Long-term and controlled release of chlorhexidine-copper(II) from organically modified montmorillonite (OMMT) nanocomposites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 1;33(2):752-7. 2013.

Yih TC, Al-Fandi M. Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems. *J. Cell. Biochem*. 97:1184-1190. 2006.

Zanatta FB, Rosing CK. Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A*. 1(2): 35-43. 2007.

Zhang JF, Wu R, Fan Y, Liao S, Wang Y, Wen ZT, Xu X. Antibacterial dental composites with chlorhexidine and mesoporous silica. *Journal of dental research*. 93(12):1283-1289. 2014.

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.* 402(1-2):109-117. 2005.