

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**Programa de Pós-graduação em Odontologia**

**Weverteon Soares de Oliveira**

**AVALIAÇÃO DA DIMINUIÇÃO DA DUREZA DO ESMALTE DENTAL EM  
RESTAURAÇÕES COM COMPÓSITOS E SISTEMAS ADESIVOS  
INCORPORADOS DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE  
CLOREXIDINA APÓS CRESCIMENTO DE BIOFILME**

**São Paulo**

**2022**

**Weverteon Soares de Oliveira**

**AVALIAÇÃO DA DIMINUIÇÃO DA DUREZA DO ESMALTE DENTAL EM  
RESTAURAÇÕES COM COMPÓSITOS E SISTEMAS ADESIVOS  
INCORPORADOS DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS DE  
CLOREXIDINA APÓS CRESCIMENTO DE BIOFILME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro — UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: William Cunha Brandt

**São Paulo**

**2022**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Francisco Gonçalves de Oliveira e Josilane Ap. da Silva Oliveira que sempre acreditaram que eu poderia chegar mais longe.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha esposa, por me apoiar, pelo companheirismo e amizade e compreensão, acreditando nos meus sonhos para serem realizados.

Ao meu irmão Felipe da Silva Oliveira por ser sempre meu parceiro nos momentos precisos.

Aos meus sogros Beatriz Oliveira e Orlando Luiz por me fazer sentir melhor a cada dia.

Ao meu cunhado Vinicius Botelho por ser mais que um amigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. William Cunha Brandt, por toda paciência, apoio e suporte durante todas as fases do projeto, sempre muito presente, caminhando conosco, e tornando tudo muito mais fácil e possível.

Ao Prof. Dr. Caio V. Roman Torres, pela aquela conversa há anos atrás ainda na graduação, acreditando que eu poderia ser um profissional diferente dos demais.

A Prof. Dra. Letícia C. Cidreira Boaro pelos ensinamentos, paciência em sala de aula e fora dela.

A todos os mestres do programa de mestrado e doutorado em odontologia desta universidade, Profs. Doutores: Wilson como coordenador, Debora, Heloisa, Marcia, Yeon, Angélica, Flávia, Fabiana, Luana, Gustavo meu muito obrigado.

A aluna de iniciação científica desta universidade, Greca Buarque, por toda ajuda e parceria em todas as fases desta pesquisa.

Aos amigos que fiz nestes anos no mestrado.

Obrigado pelos dias de lutas e glórias que fizeram dessa jornada mais leve, e por dividirem suas vitórias e conquistas comigo.

Ao meu professor de graduação Antônio Gordilho pela ajuda e troca de informações, pois caminhamos no mesmo projeto.

Ao programa de mestrado e doutorado em odontologia desta universidade, obrigado por me proporcionar essa experiência.

Aos funcionários deste programa.

Muito obrigado!

*“Toda ação humana, quer se torne positiva ou negativa, precisa depender de motivação.”*

*Dalai Lama*

## RESUMO

Com o propósito de compreender os processos químicos-patológicos das lesões de cárie secundárias em elementos restaurados com compósitos adesivos, bem como, estabelecer práticas clínicas que previnam ditas lesões através de procedimentos com um controle do *smear layer* local, diversas pesquisas e metodologias têm sido ofertadas para a comunidade científica como forma de promover funcionalidade, estética e saúde oral com materiais inovadores que permitam domínio sobre o menor risco de desenvolvimento de micro infiltrações adjacentes à restauração/dente. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a diferença da microdureza Knoop em esmalte dental humano antes e depois do crescimento de biofilme, quando realizadas restaurações com compósitos e adesivos carregados de nanopartículas de MMT/CHX, e avaliar o crescimento bacteriano através das unidades formadoras de colônias. A amostra foi separada em 3 grupos, sendo o primeiro grupo controle (GC) restaurados com a resina comercial e o adesivo de acordo com as orientações do fabricante. Segundo grupo (MMT Bulk) foi utilizado a resina comercial carregada de MMT/CHX, e o sistema adesivo feito com o Single Bond 2 na sua fórmula tradicional. Para o terceiro grupo (MMT SB+Bulk) foi utilizado a resina e adesivos carregados de MMT/CHX. A análise dos resultados demonstrou que quando os materiais restauradores foram avaliados, não existiu diferença dos valores de DK<sub>i</sub> e após 7 dias de crescimento do biofilme. Entretanto, quando avaliado o tempo, DK<sub>i</sub> mostrou valores superiores a DK<sub>7</sub> ( $p < 0,001$ ). Com relação aos valores de %Diferença, não existiu diferença estatística entre os materiais restauradores ( $p = 0,133$ ). Quanto aos valores médios e o desvio padrão de Unidades Formadoras de Colônia após 8 diluições, não existiu diferença estatística ( $p = 0,101$ ). Concluiu-se com essa pesquisa que não existiu diferença de dureza Knoop entre os grupos avaliados, entretanto todos obtiveram diferença entre inicial e final, sugerindo que independente da adição ou não de MMT carregados com CHX o resultado preventivo será o mesmo e que, independentemente de carregar os compósitos ou adesivos com MMT/CHX, a presença de UFC será a mesma.

**Palavras-chave:** Biofilme. Clorexidina. Adesão.

## ABSTRACT

In order to understand the chemical-pathological processes of secondary caries lesions in elements restored with adhesive composites, as well as to establish clinical practices that prevent such lesions through procedures with a local smear layer control, several researches and methodologies have been offered. to the scientific community as a way of promoting functionality, aesthetics and oral health with innovative materials that allow for a lower risk of microleakage development adjacent to the restoration/tooth. The objective of this research was to evaluate the difference in Knoop microhardness in human dental enamel before and after biofilm growth, when restorations were performed with composites and adhesives loaded with MMT/CHX nanoparticles, and to evaluate bacterial growth through colony forming units. The sample was divided into 3 groups, the first control group (CG) being restored with commercial resin and adhesive according to the manufacturer's guidelines. The second group (MMT Bulk) used commercial resin loaded with MMT/CHX, and the adhesive system made with Single Bond 2 in its traditional formula. For the third group (MMT SB+Bulk) resin and MMT/CHX loaded adhesives were used. The analysis of the results showed that when the restorative materials were evaluated, there was no difference in the DKi values and after 7 days of biofilm growth. However, when the time was evaluated, DKi showed values higher than DK7 ( $p < 0.001$ ). Regarding the %Difference values, there was no statistical difference between the restorative materials ( $p = 0.133$ ). As for the mean values and standard deviation of Colony Forming Units after 8 dilutions, there was no statistical difference ( $p = 0.101$ ). It was concluded from this research that there was no difference in Knoop hardness between the evaluated groups, however all of them had a difference between initial and final, suggesting that regardless of the addition or not of MMT loaded with CHX, the preventive result will be the same and that, regardless of loading the composites or adhesives with MMT/CHX, the presence of CFU will be the same.

**Keywords:** Biofilm. Chlorhexidine. Adhesion.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\alpha$	Alfa
BHI	Brain Heart Infusion
BisGMA	Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato
$\text{Ca}^{2+}$	Cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHX	Clorexidina
DK	Dureza Knoop
DK7	Dureza Knoop 7 dias
DKi	Dureza Knoop Inicial
GC	Grupo Controle
G	Gramas
$\text{K}^{+}$	Potássio
$\text{Mg}^{2+}$	Magnésio
ML	Mililitro
Mm	Milímetro
MMT	Montmorilonita
PBS	Solução Salina
PVC	Policloreto de Vinila
SB	Single Bond
TEGMA	Dimetacrilato de trietilenoglicol
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - estrutura química da MMT.....	20
Figura 2 - Propriedades físico-químicas das MMTs.....	21
Figura 3 - Taxa de inibição de crescimento bacteriano sobre ação da MMT....	22
Figura 4 - Difração do raio da associação entre Clorexidina e MMT. ....	23
Figura 5 - Curvas de dinâmica antibacteriana de compostos em controle, CHX/MMT e CHX–Cu/MMT contra E. coli (esquerda) e S. aureus (direita). ....	23
Figura 6 - Fórmula química da clorexidina. ....	24
Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura de um biofilme polimicrobiano e após tratamento com CHX (0,2%; 10 minutos). Estruturas semelhantes a vesículas nas superfícies das células bacterianas indicam danos na membrana (setas vermelhas).....	25
Figura 8 - Representação diagramática da interação da clorexidina com a membrana citoplasmática bacteriana. (a-d) O diagrama mostra diminuições progressivas na fluidez da membrana externa com o aumento da exposição à clorexidina. ....	26
Figura 9 - Confecção do corpo de prova. (a, Terceiro molar hígido; b, Secção ; c, Dentes seccionados; d, preenchendo o corpo de prova com resina acrílica)...	28
Figura 10 - Preparação e restauração das cavidades. (A-B broca FG2131; C, cavidade a ser restaurada; D, Restauração finalizada). ....	28
Figura 11 - Corpo de prova em posição para leitura no microdurômetro. (A; Leitura do microdurômetro, B; Edentação). ....	29
Figura 12 - Edentações vista no microdurômetro. ....	29
Figura 13 - Esquema da leitura no microdurômetro.....	30
Figura 14 - Exemplificação do processo de incubação, onde é reativada a bactéria.....	30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio-padrão dos valores de dureza Knoop (KHN) e %Diferença (%). Letras maiúsculas comparação na linha e letras minúsculas comparação na coluna. ....	33
Tabela 2 - Média e desvio-padrão de UFC (UFC/ $\mu$ L). ....	33

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1 A CÁRIE SECUNDÁRIA</b> .....	<b>15</b>
3.1.1 Patogenicidade associada à cárie secundária .....	15
3.1.2 Materiais restauradores e cárie secundária .....	17
<b>3.4 A MONTMORILONITA – MMT</b> .....	<b>19</b>
3.4.1 Propriedades físico-químicas da Montmorilonita .....	19
<b>3.5 A CLOREXIDINA – CHX</b> .....	<b>23</b>
3.5.1 Mecanismo de ação da Clorexidina .....	24
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Comitê de ética em pesquisa</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2 Materiais</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3 Métodos</b> .....	<b>27</b>
4.3.1 Grupos e randomização da amostra .....	28
4.3.2 Crescimento do biofilme .....	30
4.3.3 Preparo do inóculo .....	31
4.3.4 Preparo do meio de cultura .....	31
4.3.5 Distribuição do meio de cultura e montagem da placa de 12 poços.....	31
4.3.6 Análise do biofilme .....	31
<b>4.4 Análise estatística</b> .....	<b>32</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com o propósito de compreender os processos químicos-patológicos das lesões de cárie secundárias em elementos dentários anteriormente restaurados com compósitos adesivos, bem como, estabelecer práticas clínicas que previnam ditas lesões através de procedimentos com um controle do *smear layer* local, diversas pesquisas e metodologias têm sido ofertadas para a comunidade científica como forma de promover funcionalidade, estética e saúde oral com materiais tecnológicos e que permitam domínio sobre o menor risco de desenvolvimento de micro infiltrações adjacentes à restauração/dente (Mjor & Toffenetti, 2000).

Ainda assim, apesar dos avanços associados aos materiais restauradores usados na odontologia, a recidiva da doença cárie ainda tem sido uma adversidade a ser superada, sendo essa uma das principais fontes da falha de restaurações adesivas, já que ditos materiais apresentam desvantagem como fator de contração de polimerização capaz de induzir ao aparecimento de fendas na interface dental, aumentando, assim, a probabilidade de infiltração de biofilme bacteriano (Spliet et al., 2001) e colônias de microrganismos iniciadores do processo patológico da lesão cariada.

A reinfecção provocada por ditas colônias bacterianas ao redor das margens podem ser recorrentes, dado que a abordagem clínica comumente utilizada no tratamento da cárie baseia-se na remoção da dentina infectada, enquanto a dentina afetada se mantém conservada, mas que também quando não executado a técnica corretamente tem como fator contributivo de reinfecção pela doença. Dessa forma, considerando as diversas implicações acerca do processo saúde/doença da cárie secundária, e, julgando que o processo restaurador é capaz de acarretar a persistência bacteriana, torna-se crítica a utilização de compósitos modernamente empregados, já que estes não possuem propriedades antibacterianas (Brunthaler et al., 2003).

Observamos na literatura dois métodos apresentados que são mais utilizados para melhorar as propriedades antibacterianas de adesivos e compósitos. O primeiro não contém a liberação de agentes antimicrobianos e consiste em combinar quimicamente um monômero antibacteriano, como monômeros modificados por amônio quaternário com o sistema adesivo e resina

composta. O segundo método consiste em adicionar alguns agentes antibacterianos, como glutaraldeído, clorexidina (CHX), íons de prata, entre outros na matriz resinosa (Yoshida et al.,). As alternativas citadas apresentam alta eficácia em matar bactérias tanto na forma planctônica quanto na forma biofilme, mas alguns estudos não exploram as propriedades mecânicas ou relatam uma diminuição dessas propriedades.

A clorexidina é um agente antibacteriano orgânico amplamente utilizado para tratamento odontológico e prevenção de infecções bacterianas com baixa toxicidade para tecidos moles, na odontologia para controle de placa bacteriana através de enxaguantes bucais em baixa concentração a clorexidina vem sendo usada há décadas (Brooke et al., 2020). Um estudo mais recente, (Boaro et al.) desenvolveram um compósito com matriz orgânica a base de Bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato/dimetacrilato de trietilenoglicol (BisGMA/TEGDMA) utilizando nanopartículas de montmorilonita (MMT) carregadas com CHX e encontraram atividade antibacteriana no complexo MMT/CHX, liberação controlada de CHX e não observaram comprometimento das propriedades mecânicas destes compósitos. De fato, o estudo sugere que a CHX deve ser associada a algum tipo de carregador, sabendo que seu uso por si só pode afetar negativamente as propriedades mecânicas dos compósitos.

Portanto, e considerando as condições anteriormente explicitadas, novos compósitos que obtenham um equilíbrio microbiano, como os compostos de agentes antimicrobianos liberadores clorexidina, que levam a diminuição de ditas patologias na interface restauração/dente, aumentando a vida útil das restaurações e promovendo o bem-estar ao paciente, devem ser pesquisados e ofertados como potencial agente preventivo de lesões secundárias.

## **2 OBJETIVOS**

Avaliar a diferença da microdureza Knoop em esmalte dental humano, antes e depois do crescimento bacteriano, quando realizadas restaurações com compósitos e adesivos carregados de nanopartículas de MMT/CHX, e avaliar o crescimento bacteriano através dos UFCs.

A hipótese desta pesquisa é que os grupos sem as nanopartículas de MMT/CHX terão maior desmineralização do esmalte e conseqüentemente menores valores de DK.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 A CÁRIE SECUNDÁRIA**

Lesões de cárie secundárias (ou recorrentes) são atualmente definidas como “lesões existentes nas margens de restaurações” ou “lesões associadas a restaurações ou selantes”. Tal condição é considerada um processo complexo, multifatorial, entrelaçando várias causas de cárie “primária” com características da presença da restauração e do material restaurador. Assim sendo, a patogênese da cárie secundária segue primordialmente o mesmo conceito para qualquer outra lesão, envolvendo desmineralização e, no caso de cárie secundária dentinária, dissolução enzimática do componente orgânico, mas que pode ser modificado pela presença de uma restauração ou selante (Askar et al., 2020).

A cárie secundária pode ser rotineiramente associada a uma restauração defeituosa (principalmente através de lacunas entre a restauração e o dente permitindo que fluidos ácidos ou biofilme entrem na interface), associado a uma restauração intacta, ou até mesmo não associada causalmente com a restauração, mas com lesões primárias adjacentes às restaurações existentes (Mjor & Toffenetti, 2000. Kidd, 2001).

Especialmente a se tratar das principais falhas das restaurações, uma revisão sistemática publicada em 2018 buscou investigar a longevidade das restaurações e as razões de falha nos dentes decíduos. Os autores concluíram que as restaurações em resina compostas mostraram os piores resultados quando relacionados à longevidade, e sistematicamente a maior causa de falha deu-se pela presença de cárie secundária. Para tanto, observou-se elevado número de insucessos por cárie recorrente, evidenciando a necessidade de os profissionais trabalharem com uma abordagem promotora da saúde (Chisini et al., 2018).

##### **3.1.1 Patogenicidade associada à cárie secundária**

O resultado de diferentes vias patogênicas pode ser desmineralização na superfície do dente, como normalmente ocorre em lesões cariosas primárias,

bem como ao longo da interface entre o dente e a restauração, com uma alteração de superfície chamada lesão de parede. Há algum debate em torno da natureza e tamanho de um defeito de restauração necessário para permitir a formação de tais lesões de parede. Um número de estudos *in vitro*, usando vários modelos de cárie secundária, foi realizado, produzindo tamanhos de intervalo de limite do defeito entre 60 e 1000  $\mu\text{m}$  (Ferracane, 2017. Maske et al., 2017). Embora não conclusivos, alguns modelos mostraram que certos materiais que possuem características antimicrobianas podem reduzir a gravidade da formação de lesões, sugerindo possíveis caminhos para o desenvolvimento de novos materiais compósitos e adesivos para restaurações com longevidade potencialmente aumentada.

Enquanto o risco ou suscetibilidade de cárie de um paciente parece ser o fator mais relevante para o desenvolvimento de cárie secundária, a relevância do material restaurador tem sido avaliada mais frequentemente por diversas pesquisas publicadas na literatura. Muitos estudos têm comparado diferentes materiais tem avaliado cárie secundária e sua relação com a patogenicidade da doença (Askar et al., 2020). Os autores concluíram que existem dados escassos sobre a natureza da cárie secundária e como controlá-la, detectá-la e tratá-la.

O efeito de uma lacuna interfacial entre a restauração e estrutura dentária foi avaliada por muitos estudos, com o tamanho do gap e os materiais de preenchimento utilizados sendo os fatores mais testados. Dos estudos disponíveis, nenhuma diferença significativa entre vários materiais de resina em a perda mineral das lesões de superfície e de parede foram encontradas. No entanto, materiais contendo amálgama e flúor foram capazes de reduzir a progressão da cárie secundária (Askar et al., 2017). Os autores concluíram que cargas acima de um certo limiar aumentaram significativamente a perda mineral da lesão interfacial (parede). Esta associação foi moderada pela elasticidade dos materiais de restauração colocados.

Uma revisão sistemática publicada em 2017 (Askar et al., 2017) não conseguiu identificar diferenças significativas no desenvolvimento de cárie secundária sobre as diferentes restaurações, mas apontaram diversas dificuldades, como a grande heterogeneidade dos estudos, da amostra e das combinações dos materiais utilizados. Por outro lado, a progressão da cárie secundária em estudos *in situ* é notavelmente maior do que em uma situação

clínica, principalmente acelerando intencionalmente a progressão criada por um ambiente altamente cariogênico (Hollanders et al., 2018).

### **3.1.2 Materiais restauradores e cárie secundária**

A cárie secundária é uma importante complicação a longo prazo das restaurações dentárias, já que diferentes estratégias adesivas e materiais restauradores podem afetar o risco de desenvolvimento de dita lesão (Askar et al., 2021). Uma revisão sistemática buscou sintetizar dito risco através de diferentes estratégias adesivas e materiais restauradores. Os autores concluíram que a cárie secundária foi um evento raro dentro dos estudos, e os adesivos de 3 etapas mostraram o menor risco de cárie secundária, e o de condicionamento de 2 etapas o maior. Para materiais restauradores, o ionômero de vidro modificado por resina apresentou o menor risco de cárie secundária. A maioria das resinas compostas apresentou riscos semelhantes (Askar et al., 2021).

Da mesma forma, Arbildo-Veja e colaboradores, 2020, publicaram uma revisão sistemática em que o objetivo foi determinar a eficácia clínica da resina bulk-fill e convencional em restaurações de resina composta. Os resultados indicaram que não há diferença entre restaurações com resinas convencionais e bulk para o tipo de restauração, tipo de dente restaurado e técnica de restauração utilizada para o desenvolvimento e risco de cárie secundária. No entanto, mais estudos clínicos adequadamente desenhados são necessários para chegar a uma melhor conclusão, visto o risco de viés e heterogeneidade das pesquisas incluídas no estudo.

Por outro lado, e diferindo dos autores anteriormente citados, uma revisão sistemática publicada em 2021, buscou examinar a eficácia e segurança de restaurações diretas de resina compostas versus restaurações de amálgama, e concluíram que as primeiras apresentam um risco muito maior de cárie secundária (RR 2,14, IC 95% 1,67 a 2,74;  $P < 0,001$ ) quando comparada às restaurações de amálgama. Contudo, deve-se esclarecer que essa pesquisa não diferenciou o material e técnica utilizada, permitindo certo viés, mas que indica fortemente a seleção de um material sobre outro (Worthington et al., 2021).

Especialmente a se tratar do sistema adesivo utilizado, diversas pesquisas têm indicado a utilização de materiais que liberem substâncias biocompatíveis capazes de remineralizar o elemento dentário, prevenindo, portanto, de lesões de cárie secundária. Dessa forma, uma pesquisa demonstrou que diversos estudos *in vitro* comprovam a redução de cárie secundária por materiais adesivos que contém em sua composição flúor, porém a metanálise não apresentou diferença estatística entre os sistemas adesivos sem flúor e com flúor (Martins, Vasques & Fonseca, 2019).

Ainda a se tratar do efeito da adição de biomateriais nos sistemas adesivos como forma de diminuir o risco de lesões recorrentes, Boutsiouki e colaboradores, 2019, buscou investigar a inibição de cárie secundária após pré-tratamento de dentina com CHX a 2%, adição experimental de CHX em primer e adesivo de um sistema adesivo de 3 etapas e adição industrial de CHX em um sistema adesivo de 2 etapas. A pesquisa concluiu que CHX 2% como pré-tratamento de dentina, CHX 0,1% ou 0,2% adicionado em adesivos não forneceu nenhum efeito antibacteriano em relação à cárie secundária em dentina. Por outro lado, o pré-tratamento de dentina com CHX a 2% conseguiu limitar a formação de fendas marginais no esmalte em comparação com os outros protocolos adesivos.

Da mesma maneira, uma pesquisa publicada em 2019 buscou investigar o papel da CHX 2% no desenvolvimento de lesões de cárie secundária em diferentes condições de interface com gaps pequenos (grupo 1) e largos (grupo 2). Os discos de dentina foram restaurados e pré-tratados com ou sem CHX 2%. No grupo 1, as interfaces foram feitas com folgas de 30, 60 ou 90  $\mu\text{m}$ . Interfaces com compósitos colocados diretamente sobre a dentina foram adesivada ou não. No grupo 2, foram feitas interfaces com folgas de 100  $\mu\text{m}$ , com ou sem adesivo no lado do compósito. Biofilmes foram cultivados em amostras de dentina composta por 14 dias. Análises mostraram que o pré-tratamento com CHX não influenciou a progressão da lesão em nenhum local ( $p \geq 0,218$ ). Interfaces com gaps intencionais mostraram efeito positivo e significativo na progressão da lesão a 200  $\mu\text{m}$  da entrada do gap ( $p \leq 0,005$ ). Em conclusão, o pré-tratamento de dentina com CHX 2% não foi capaz de retardar o desenvolvimento de lesões de cárie secundárias em pequenos e largos gaps neste modelo de biofilme (Maske et al., 2019).

Perpassando sobre os biomateriais possivelmente disponíveis para a reduzir o risco de cárie secundária, uma revisão sistemática buscou sumarizar a literatura atual e avaliar os efeitos antibacterianos e remineralizantes sinérgicos que podem contribuir para a prevenção da lesão. Os autores concluíram que a fusão de 2-metacrilóiloxietilfosforilcolina e nanopartículas de prata com dimetilaminohexadecil metacrilato resultou em aumento da potência antibacteriana. A adição de nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo e dendrímeros de poliamidoamina resultou em maior potencial de remineralização, mas que mais estudos clínicos precisam ser planejados para explorar as propriedades antibacterianas e remineralizantes desses novos compósitos para o sucesso clínico (Clarín et al., 2021).

### 3.4 A MONTMORILONITA – MMT

As argilas organofílicas são substâncias que contêm em sua composição moléculas orgânicas intercaladas entre as camadas estruturais. A pesquisa relacionada a tecnologia de intercalação de ditas moléculas orgânicas nas estruturas das argilas tiveram início na década de 20, após a introdução da técnica de difração de raios X em 1913, segundo relatam Merinska e colaboradores, 2002.

A intercalação de espécies orgânicas em esmectitas é um modo de se construir junções inorgânicas e orgânicas com microestruturas únicas que são controladas por interações hospedeiro-hóspede e hóspede-hóspede. A inserção de moléculas orgânicas faz com que ocorra expansão entre os planos d(001) da argila, e mude sua natureza hidrofílica para hidrofóbica, propiciando diversas possibilidades de aplicações para as argilas (Paiva et al., 2008).

#### 3.4.1 Propriedades físico-químicas da Montmorilonita

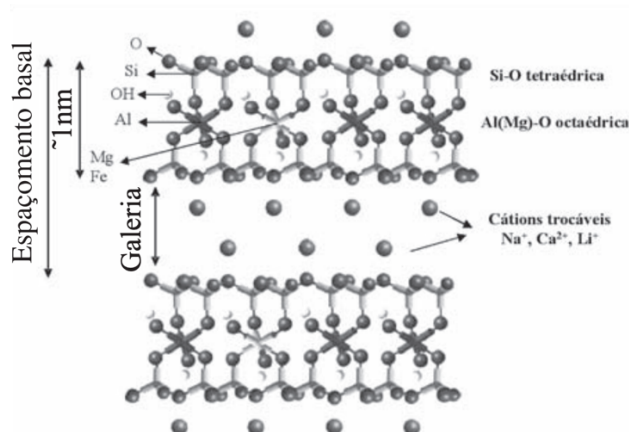
Montmorilonita, ou também conhecida como esmectita, é o nome dado à argila que foi inicialmente descrita por Knight em 1896, numa região da França que leva o mesmo nome da molécula. Tal argila possuem um alto teor do argilomineral montmorilonita encontrado especificamente nessa região. A

montmorilonita é o argilomineral mais abundante entre as esmectitas, cuja fórmula química que se descreve é  $M_x(A1_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$  (Paiva et al., 2008).

A molécula possui partículas de tamanhos que podem variar de 2  $\mu m$  a 0,1  $\mu m$ , com tamanho médio de aproximadamente 0,5  $\mu m$  em formato de placas. Pertence ao grupo dos filossilicatos 2:1, cujas placas são caracterizadas por estruturas constituídas por duas folhas de sílica com uma folha octaédrica de alumina, que são unidas entre si por átomos de oxigênio comuns. As folhas apresentam continuidade nos eixos a e b e geralmente possuem orientação aproximadamente paralela nos planos (001) dos cristais, que lhes confere a estrutura laminada.

O empilhamento dessas placas é regido por forças polares relativamente fracas e por forças de van der Waals, onde existem lacunas denominadas galerias ou camadas intermediárias nas quais residem cátions trocáveis como  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Li^+$ , fixos eletrostaticamente e com a função de compensar cargas negativas geradas por substituições isomórficas que ocorrem na região reticulada. A figura abaixo demonstra a estrutura da montmorilonita (Paiva et al., 2008).

Figura 1 - estrutura química da MMT.



Fonte: Paiva e colaboradores, 2008.

Em suma, e conforme exemplificado, as argilas do grupo esmectita, principalmente a montmorilonita (MMT) são muito utilizadas na preparação das argilas organofílicas devido às pequenas dimensões dos cristais, a elevada capacidade de troca de cátions, e a capacidade de absorção em água que fazem

com que a intercalação de compostos orgânicos utilizados na síntese seja rápida e totalmente completa (Paiva et al., 2008). Especialmente em se tratar de suas propriedades físico-químicas, Uddin, exploram a figura abaixo.

Figura 2 - Propriedades físico-químicas das MMTs.

Solution	Property Name	Observation	Remarks
1	color	white, gray white, yellow, brownish yellow, greenish yellow	pink with yellow or green tints also exists
2	cleavage	perfect	perfect in one direction.
3	fracture	uneven to lamellar	claylike fracture
4	hardness	1.5 to 2.0	Talc-Gypsum
5	density	2.0 to 2.7	average 2.35
6	crystal system	monoclinic	tiny scaly crystals, lamellar microcrystalline aggregates, compact <sup>[47]</sup> crystals expand to several times the original volume on water absorption <sup>[49]</sup>
7	luster	dull	—
8	streak	white	—
9	luminescence	none	—
10	transparency	translucent	crystals are translucent and masses are opaque <sup>[49]</sup>

Fonte: Uddin, 2008.

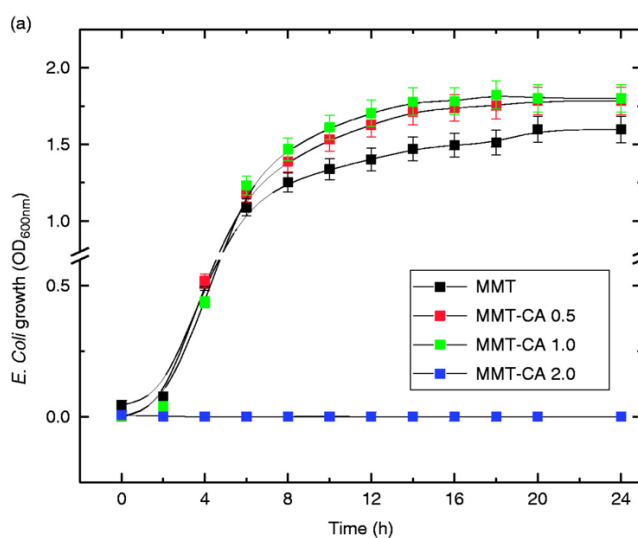
A MMT é um dos minerais argilosos mais comuns do tipo 2:1, rico em conteúdo natural e caracteristicamente não tóxico. Devido à sua estrutura única e propriedades de superfície, a substância mostra forte absorção de água, inchaço, dispersibilidade, bom desempenho de troca de cátions e capacidade de adsorção, indicando que tem grande potencial na remoção de metais pesados íons e cátions orgânicos. Ademais, a molécula também apresenta excelente seletividade e atividade catalítica, o que poderia contribuir para sua ampla utilização em reações orgânicas e liberação controlada de drogas (Wang et al., 2021), como exemplificação da clorexidina.

Em suma, a montmorilonita (MMT) talvez possa ser considerada a argila mais utilizada como carreador de liberação de fármacos e tem sido utilizada para a preparação de materiais antibacterianos. Entre os agentes antibacterianos intercalados ao MMT estão o acetato de clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, ciprofloxacina e tetraciclina (Lobato-Alguilar, 2020). Como exemplificação, a figura abaixo demonstra o efeito de inibição da MMT, em diferentes proporções sobre a bactéria E. Coli.

Além das propriedades anteriormente citadas, a molécula também apresenta vantagens promissoras, incluindo alta estabilidade térmica, alta resistência e baixo coeficiente de expansão. No entanto, por ser hidrofílico e com propriedades oleofóbicas, bem como a baixa compatibilidade com polímeros,

não é amplamente aplicado. Portanto, muitos estudiosos modificaram o MMT e aprimoraram suas propriedades de adsorção e troca iônica através da preparação com outros materiais bidimensionais, ampliando as aplicações como antibacteriano médico, por exemplo (Chen et al., 2014).

Figura 3 - Taxa de inibição de crescimento bacteriano sobre ação da MMT.

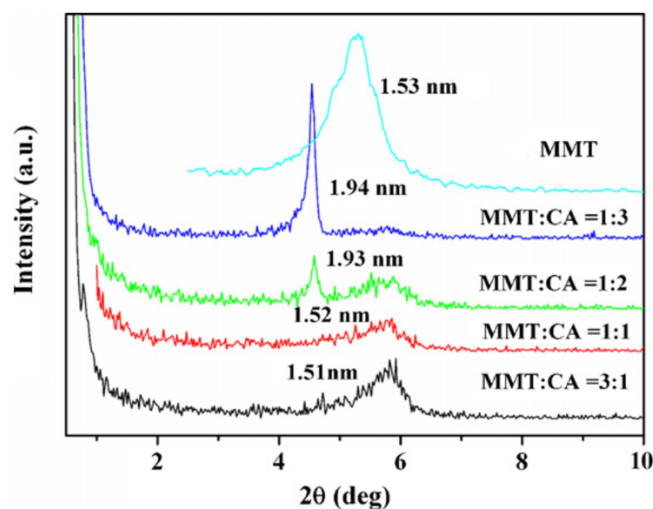


Fonte: Lobato-Alguilar, 2020.

Da mesma maneira que os autores anteriormente citados, Meng e colaboradores, 2009, propuseram em sua pesquisa preparar compósitos de intercalação de acetato de clorexidina com montmorilonita e seu potencial antibacteriano foi avaliado com bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados indicaram que a combinação das substâncias inibiu fortemente o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas (Meng et al., 2009). A figura abaixo demonstra os resultados encontrados.

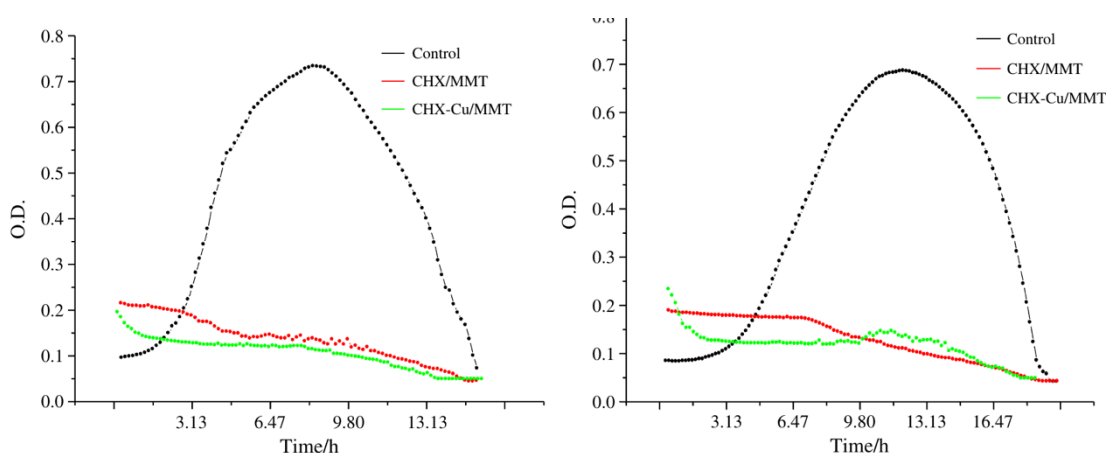
Ainda assim, Wu e colaboradores, 2013, buscaram em seu estudo, através de uma pesquisa de longo prazo a ação antimicrobiana da clorexidina associada a MMT para diversos microrganismos. Os resultados indicam um excelente efeito antimicrobiano para *E. Coli* e *S. Aureus* na curva de tempo, conforme demonstra a figura abaixo.

Figura 4 - Difração do raio da associação entre Clorexidina e MMT.



Fonte: Meng e colaboradores, 2009.

Figura 5 - Curvas de dinâmica antibacteriana de compostos em controle, CHX/MMT e CHX-Cu/MMT contra *E. coli* (esquerda) e *S. aureus* (direita).



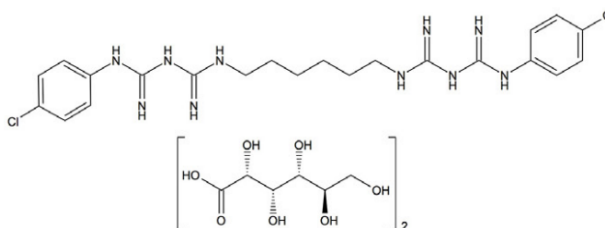
Fonte: Wu et al., 2013.

### 3.5 A CLOREXIDINA – CHX

Gluconato de clorexidina (1,1'-hexametileno bi [5-(p-clorofenil) biguanida] di-D-gluconato) (CHX) é um sal de gluconato, sendo um composto biguanida, que existe desde a década de 1950 para uso clínico como um agente antimicrobiano de amplo espectro, causando ruptura das membranas celulares das bactérias gram positivas e negativas. Atualmente, é usado como agente desinfetante em diversas condições de saúde, especialmente na

especialidade odontológica. Sua característica de biocompatibilidade, sendo usado por via oral como antisséptico bucal por dentistas e pelo público em geral para prevenir biofilme bacteriano e acúmulo de placa são uma de suas aplicações (Brooke et al., 2020). A figura abaixo demonstra a fórmula química do componente.

Figura 6 - Fórmula química da clorexidina.



Fonte: Cieplik et al., 2019

O enxaguatório bucal CHX é uma solução neutra (faixa de pH 5-7), apenas aconselhado para uso tópico, e nunca para administração sistêmica. Por se tratar de uma substância catiônica, liga-se à pele, mucosas e tecidos, que por sua vez o tornam mal absorvido através dessas membranas. Após um único enxágue, a substância pode permanecer na saliva por até 5 horas e na mucosa oral por até 12 horas. É geralmente considerado seguro para uso oral, mas alguns efeitos colaterais e complicações foram relatados (Hoffman et al., 2001).

### 3.5.1 Mecanismo de ação da Clorexidina

Como antisséptico bucal, a CHX tem efeito em microrganismos, como nas bactérias, fungos e vírus causadores de uma série de diferentes doenças. Estudos *in vitro*, demonstram que todos os efeitos antibacterianos da CHX se relacionam com alteração na permeabilidade da membrana celular (Gilbert e Moore, 2005). Em baixas concentrações (0,02%-0,06%) CHX causa deslocamento de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e perda de  $\text{K}^+$  da parede celular, resultando em um efeito bacteriostático (Cieplik et al., 2019). A figura abaixo demonstra a ação da CHX em bactérias.

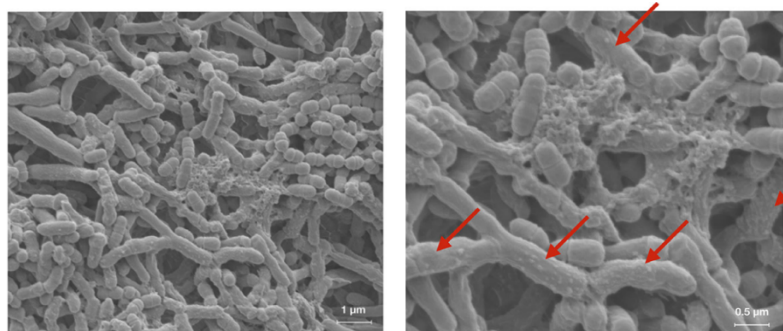
Por outro lado, em altas concentrações (>0,1%), a CHX causa vazamento de todos os principais componentes intracelulares para fora da célula, resultando

em um efeito bactericida (lise e morte celular). Os efeitos antivirais da CHX também são devidos à alteração da membrana celular e, finalmente, a CHX pode inativar vírus envelopados, como vírus herpes simplex (Wood e Payne, 1998).

Os efeitos antifúngicos da CHX, no entanto, relacionam-se para a prevenção da formação de biofilme em ambos os aspectos biológicos e superfícies não biológicas, por espécies como *Candida albicans*, em vez de romper a estrutura ou membrana celular do micróbio (Dehghnani Nazhvani et al., 2016).

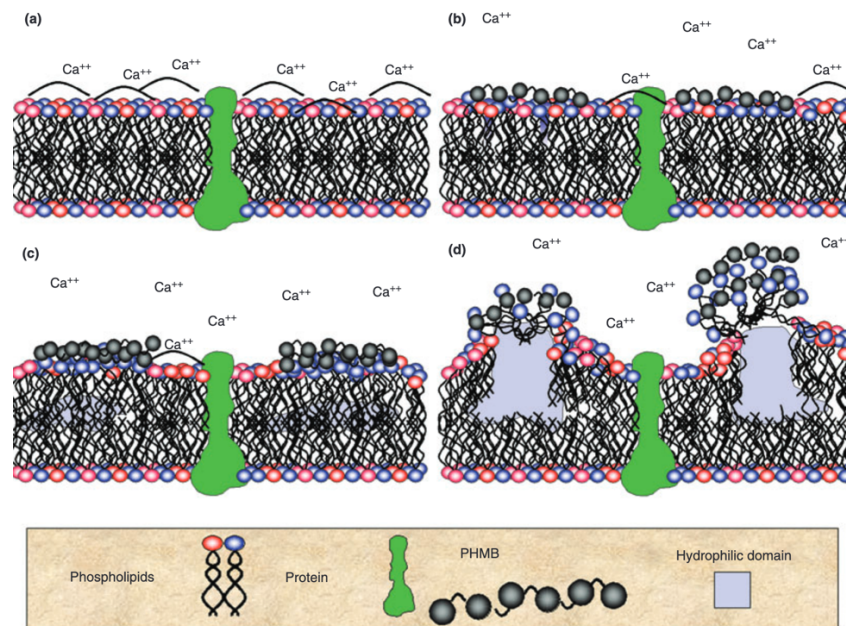
Esquemáticamente, o modo de ação da CHX em relação às membranas citoplasmáticas bacterianas ocorre da seguinte maneira. A membrana citoplasmática bacteriana carrega uma rede de carga negativa e é composta por uma bicamada fosfolipídica com proteínas incorporadas. A bicamada fosfolipídica é estabilizada por cátions bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  e forma um ambiente hidrofóbico, que é essencial para moderar a funcionalidade das proteínas incorporadas. A substância de CHX, como um agente catiônico, se liga à superfície da célula bacteriana e inicialmente interage com a membrana citoplasmática. Assim, CHX faz pontes entre pares de grupos de cabeça de fosfolipídios e desloca os cátions bivalentes associados. Há diminuição progressiva da fluidez da camada fosfolipídica externa com criação de domínios hidrofílicos dentro da bicamada afetando a osmorregulação e atividade metabólica da membrana citoplasmática e suas enzimas associadas (Cieplik et al., 2019). A figura abaixo demonstra esquematicamente o explicitado.

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura de um biofilme polimicrobiano e após tratamento com CHX (0,2%; 10 minutos). Estruturas semelhantes a vesículas nas superfícies das células bacterianas indicam danos na membrana (setas vermelhas).



Fonte: Cieplik et al., 2019

Figura 8 - Representação diagramática da interação da clorexidina com a membrana citoplasmática bacteriana. (a-d) O diagrama mostra diminuições progressivas na fluidez da membrana externa com o aumento da exposição à clorexidina.



Fonte: Gilbet e Moore, 2005.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Comitê de ética em pesquisa

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o parecer 5.413.792, da Universidade Santo Amaro - UNISA, uma vez que foram utilizados dentes humanos como substrato para a realização das restaurações com os compósitos resinosos.

Após a aprovação do comitê, amostras oriundas de terceiros molares higidos extraídos foram preparadas utilizando ponta diamantada FG 4138 cônica (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) acopladas a uma turbina de alta rotação (Kavo Ker®) sob refrigeração constante.

### 4.2 Materiais

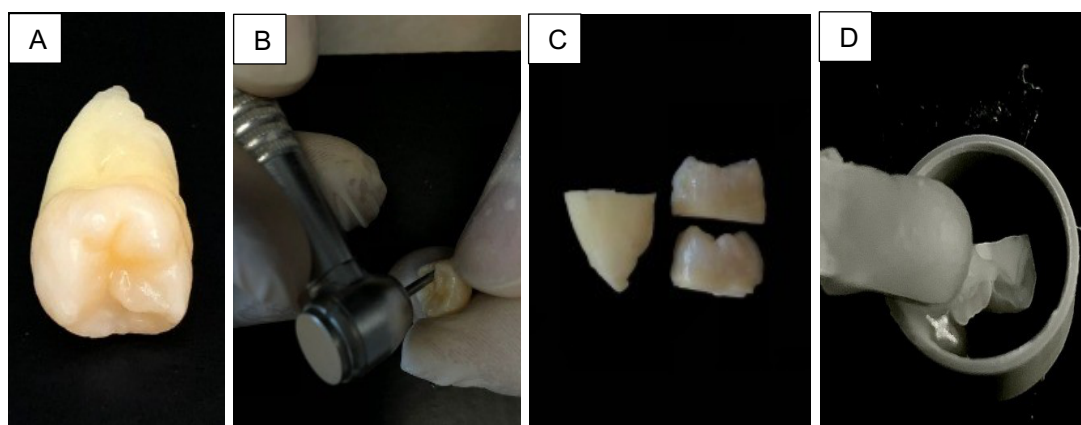
Utilizamos resina comercial (3M® filtek Bulk Fill Flow, 3M) e adesivo comercial (3M® Adper Single Bond 2, Minnesota, EUA), sendo ambos carregados com 5% de MMT/CHX.

### 4.3 Métodos

Inicialmente 15 dentes foram seccionados na junção esmalte-cimento, e em seguida as coroas seccionadas ao meio no sentido vestibulo-lingual. Cada dente resultou em duas amostras (mesial e distal) totalizando 30 amostras, e em seguida foram levemente planificadas (Figuras 9 - 10). Os espécimes foram fixados com fita dupla face em uma placa de vidro, com a face do esmalte livre, e incluídas em tubos de PVC (Tigre®, Bolívia) com 16mm de diâmetro e 6mm de altura, e o tubo foi completamente preenchido com resina acrílica auto-polimerizável. Após a polimerização da resina acrílica e a fixação das faces livres do esmalte, foram novamente planificadas com lixas d'água de granulação 600 e posteriormente de 1200 (Norton®, Guarulhos, São Paulo, Brasil) sob refrigeração utilizando uma politriz (PVV®, TECLAGO, Itapevi, São Paulo, Brasil), obtendo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de PVC. Cavidades circulares com diâmetro aproximado de 2mm e profundidade de 2,4mm foram

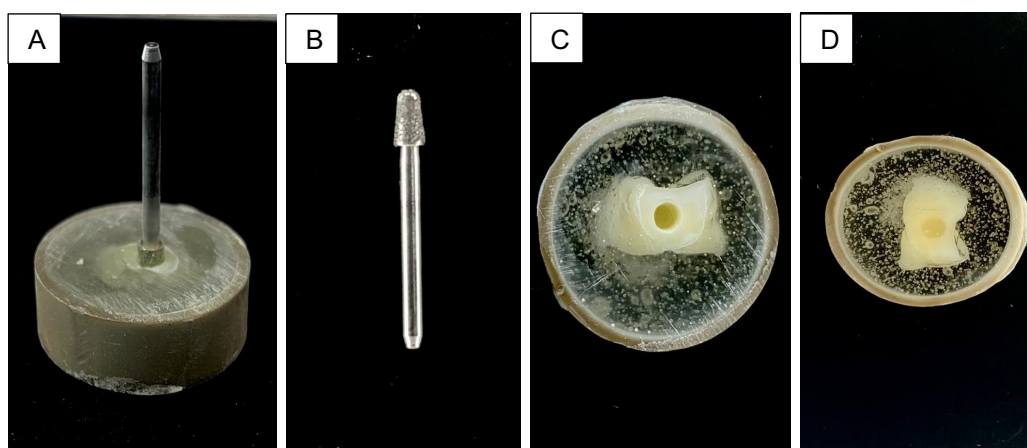
preparadas na porção central das faces planificadas com a ponta diamantada FG 2131 (Microdont®, São Paulo, SP, Brasil) sob constante refrigeração onde as quais foram restauradas, todos corpos de prova foram armazenados em um pote com água, conforme demonstrado na (Figura 9-10).

Figura 9 - Confeção do corpo de prova. (a, Terceiro molar hígido; b, Secção ; c, Dentes seccionados; d, preenchendo o corpo de prova com resina acrílica)



Fonte: O autor, 2022

Figura 10 - Preparação e restauração das cavidades. (A-B broca FG2131; C, cavidade a ser restaurada; D, Restauração finalizada).



Fonte: O autor, 2022

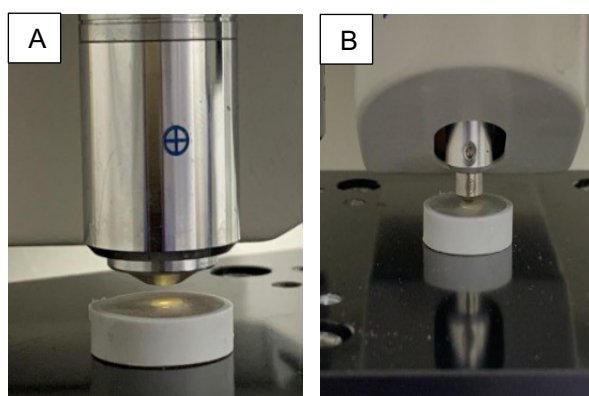
#### 4.3.1 Grupos e randomização da amostra

Foram separados em 3 grupos cada grupo com 10 corpos de prova, sendo o primeiro grupo controle (GC) restaurados com a resina comercial e o adesivo de acordo com as orientações do fabricante. Segundo grupo (MMT Bulk) foi

utilizado a resina comercial carregada de MMT/CHX, e o sistema adesivo feito com o Single Bond 2 na sua fórmula tradicional. Para o terceiro grupo (MMT SB+Bulk) foi utilizado a resina e adesivos carregados de MMT/CHX. Em todas as restaurações foram utilizadas um matriz de poliéster e fotopolimerizadas com o mesmo aparelho fotopolimerizador (Grand Valo<sup>®</sup>, Ultradente) por 40s em cada amostra e em seguida foram polidas.

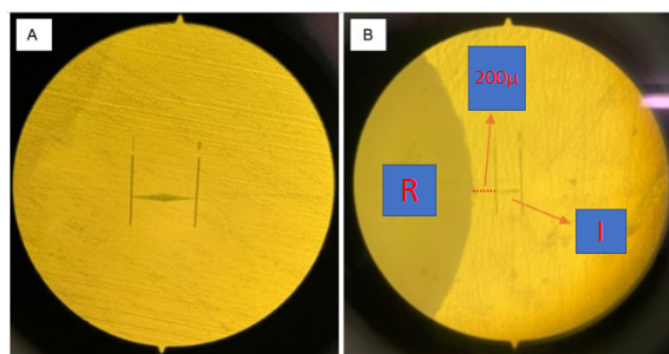
Após a restauração das cavidades com o compósito determinado, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente para a leitura da microdureza. A dureza de superfície foi avaliada em todos os espécimes através do microdurômetro (Shimadzu HMV-2T<sup>®</sup>, Barueri, São Paulo, Brasil) composto por um penetrador diamantado piramidal tipo Knoop, com carga de 25g aplicada por 10s. A microdureza inicial e após 7 dias foi mensurada em 4 pontos padronizados ao redor da restauração a 200 $\mu$  da sua borda, e a diferença entre estas foi calculada (figura 11-13).

Figura 11 - Corpo de prova em posição para leitura no microdurômetro. (A; Leitura do microdurômetro, B; Edentação).



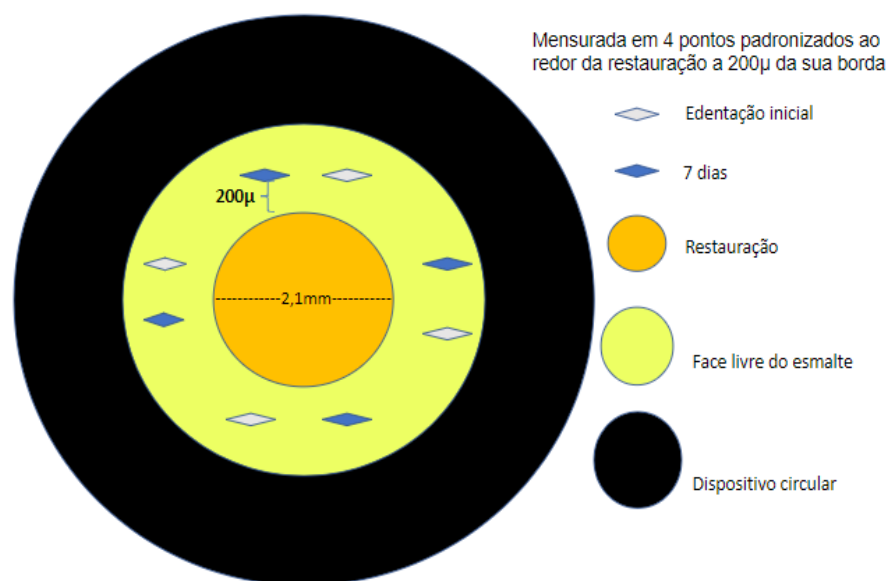
Fonte: O autor, 2022

Figura 12 - Edentações vista no microdurômetro.



Fonte: Gordilho.A , 2022

Figura 13 - Esquema da leitura no microdurômetro.



Fonte: o autor, 2022

#### 4.3.2 Crescimento do biofilme

Foram transferidos inicialmente 9,5 ml de meio Brain Heart Infusion (BHI) para um tubo tipo Falcon e acrescido 0,5ml de glicose a 20% e 50µl da bactéria *Streptococcus mutans*, uma vez que esta bactéria é de estoque e mantida no congelador. Esta solução foi ao vórtex (Phoenix<sup>®</sup>, AP-56, Araraquara, São Paulo, Brasil) e incubada á 37°C em anaerobiose por 18 horas (Figura 14).

Figura 14 - Exemplificação do processo de incubação, onde é reativada a bactéria.



Fonte: O autor, 2022

#### **4.3.3 Preparo do inóculo**

Passado 18 horas, foram transferidos 9,5ml de meio BHI para um tubo tipo Falcon e acrescidos 0,5ml de glicose a 20%. Tal solução foi ao vórtex (Phoenix<sup>®</sup>, AP-56, Araraquara, São Paulo, Brasil) e removido 0,5ml. Em seguida, fora substituída essa alíquota pela solução inicialmente preparada e submetida ao vórtex (Phoenix<sup>®</sup>, AP-56, Araraquara, São Paulo, Brasil) e levada a estufa á 37°c em jarra de anaerobiose para obter a correta absorbância, após 3 horas é retirado e levado ao espectrofotometro para fazer a leitura do inóculo, essa leitura deve estar em aproximadamente em 0,700.

#### **4.3.4 Preparo do meio de cultura**

Foi preparado 159,6 ml de meio de cultura BHI e acrescentado 8,4 ml de sacarose a 20% e 672 µl do inóculo (esses volumes foram previamente calculados levando em consideração a capacidade de cada poço e o número de corpos de prova).

#### **4.3.5 Distribuição do meio de cultura e montagem da placa de 12 poços**

Os corpos de prova foram posicionados nos respectivos poços e 2ml do meio de cultura preparado anteriormente foi adicionado e incubados em condições de anaerobiose por 24 horas. Este meio de cultura foi trocado a cada 24 horas por 7 dias e os espécimes incubados nas mesmas condições.

#### **4.3.6 Análise do biofilme**

Após 7 dias completos em meio de cultura e crescimento do biofilme, cada espécime foi lavado com solução salina e transferido para um tubo tipo Falcon estéril contendo 5 ml de solução salina (PBS), e em seguida, levado ao vórtex (Phoenix<sup>®</sup>, AP-56, Araraquara, São Paulo, Brasil) para remoção do biofilme. Desta solução tomou-se uma alíquota de 10µl e transferiu-se para um eppendorf com 990µl de solução salina. Após, foram realizadas mais 4 e 8 diluições em 900µl de solução salina cada. Cerca de 50µl da solução proveniente

deste processo fora utilizada para fazer uma cultura em placa de Petri com BHI ágar, e as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contabilizadas após 24 horas de crescimento em anaerobiose.

#### 4.4 Análise estatística

Previamente as análises, os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, foram submetidos à análise de variância a dois critérios para a comparação dos valores de DK (fatores do estudo: Tempo (inicial e 7 dias) e Composição (MMT)) e análise de variância a um critério para a comparação da diferença de DK e para UFC (fator do estudo: Composição (MMT)). As comparações múltiplas foram efetuadas pelo teste de Tukey. Os cálculos estatísticos foram conduzidos adotando-se o nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ), no programa SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, EUA).

## 5 RESULTADOS

A tabela 1 mostra os valores médios e o desvio padrão da dureza Knoop inicial (DKi), da dureza Knoop após 7 dias (DK7) e da diferença entre DKi e DK7 (%Diferença).

Tabela 1 - Média e desvio-padrão dos valores de dureza Knoop (KHN) e %Diferença (%). Letras maiúsculas comparação na linha e letras minúsculas comparação na coluna.

	<b>DKi</b>	<b>DK7</b>	<b>%Diferença</b>
<b>Controle</b>	185,8 (24,5) A,a	133,2 (26,4) B,a	27,3 (17,3)
<b>MMT Bulk</b>	155,1 (34,2) A,a	127,8 (28,6) B,a	16,7 (11,8)
<b>MMT SB+Bulk</b>	179,8 (36,1) A,a	144,2 (22,0) B,a	18,5 (10,1)

Fonte: O autor.

A análise dos resultados demonstrou que quando os materiais restauradores foram avaliados, não existiu diferença dos valores de DKi e após 7 dias. Entretanto, quando avaliado o tempo, DKi mostrou valores superiores a DK7 ( $p < 0,001$ ).

Com relação aos valores de %Diferença, não existiu diferença estatística entre os materiais restauradores ( $p = 0,133$ ).

A tabela 2 mostra os valores médios e o desvio padrão de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após 4 e 8 diluições. Não existiu diferença estatística entre os valores de UFC ( $p = 0,101$ ).

Tabela 2 - Média e desvio-padrão de UFC (UFC/ $\mu$ L).

	<b>UFC</b>
<b>Controle</b>	19,6 (15,5)
<b>MMT Bulk</b>	20,8 (11,6)
<b>MMT SB+Bulk</b>	11,3 (6,9)

Fonte: O autor.

## 6 DISCUSSÃO

A hipótese desta pesquisa foi rejeitada, já que independente do grupo apresentar ou não materiais carregados com MMT/CHX, não houve diferença estatística inicial, 7 dias e em %Diferença para a dureza Knoop. Portanto, todos os grupos tiveram estatisticamente o mesmo grau de desmineralização e valores de DK. Da mesma maneira, os resultados apontam para uma semelhança estatística entre todos os grupos para avaliação das unidades formadoras de colônia (UFC), demonstrando que não há diferença para prevenir o biofilme se o material está carregado ou não com MMT/CHX.

Especialmente a se tratar dos dados obtidos sobre a dureza Knoop, apesar de os grupos não apresentarem diferença estatística significativa entre si, os valores iniciais são superiores aos de 7 dias, e a menor %Diferença se deu no grupo em que apenas a resina foi carregada com MMT/CHX. Por outro lado, a maior %Diferença se deu no grupo controle, no qual nenhum dos materiais, resina ou adesivo, foram carregados com os produtos.

Na tabela 2 em que se apresentam as UFCs após 8 diluições, observa-se a não diferença estatística entre os grupos, demonstrando que, independentemente de haver ou não partículas carregadas com MMT/CHX, o controle microbiológico é o mesmo. Mas, cabe salientar, que quando avaliados numericamente os resultados, o grupo MMT SB+Bulk, em que ambos, adesivo e compósito, são carregados com as partículas, há uma menor concentração de unidades formadores de colônia, demonstrando sua maior efetividade numericamente. Por outro lado, e de forma heterotópica, o grupo controle apresentou resultados melhores no controle do biofilme quando comparado ao grupo em que apenas a resina foi carregada com MMT/CHX. Tendo em vista que a metodologia usada no nosso trabalho foi de 7 dias em meio microbiano é aceitável que outras alternativas de metodologia sejam usadas para obter resultados melhores, sendo assim uma delas seria diminuir o tempo das amostras em meio microbiano e conciliando o uso de saliva artificial.

Da mesma maneira, e corroborando os resultados encontrados, Boutsouki e colaboradores, 2019, a se tratar do efeito da adição de biomateriais nos sistemas adesivos como forma de diminuir o risco de lesões recorrentes, os autores buscaram investigar a inibição de cárie secundária após pré-tratamento

de dentina com CHX a 2%, adição experimental de CHX em primer e adesivo de um sistema adesivo de 3 etapas e adição industrial de CHX em um sistema adesivo de 2 etapas. A pesquisa concluiu que CHX 2% como pré-tratamento de dentina, CHX 0,1% ou 0,2% adicionado em adesivos não forneceu nenhum efeito antibacteriano em relação à cárie secundária em dentina.

Deve-se compreender, todavia, que os resultados dessa pesquisa diferem de outras, como a publicada por Meng e colaboradores, 2009, na qual propuseram preparar compósitos de intercalação de acetato de clorexidina com montmorilonita e seu potencial antibacteriano foi avaliado. Os resultados indicaram que a combinação das substâncias inibiu fortemente o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.

Por outro lado, uma metanálise realizada por Martins, Vasques & Fonseca, 2019, demonstrou que diversos estudos *in vitro* comprovam a redução de cárie secundária por materiais adesivos que contêm em sua composição flúor, porém o estudo matemático não apresentou diferença estatística entre os sistemas adesivos sem flúor e com flúor. Esclarece-se, no entanto, que por se tratar de uma substância diferente do proposto nessa pesquisa, não se deve ponderar como fato essencial e definitivo também para a CHX, havendo a necessidade de maiores pesquisas *in vitro* e clínicas para explicar o comportamento.

Particularmente em se tratar das limitações dessa pesquisa, deve-se considerar a composição das amostras com compósitos carregados com clorexidina e MMT, já que elas apresentam monômeros do tipo residuais lixiviáveis, sal quaternário de amônia, que também está presente na nanopartícula de MMT como produto residual, e a clorexidina que juntos contribuem para as propriedades antimicrobianas dos compósitos, não podendo ignorar a possível ação contra microrganismos antes mesmo da adição das moléculas de MMT/CHX. Ainda assim, sugere-se que outras pesquisas experimentais sejam feitas considerando outras concentrações de clorexidina para entender o real papel dessa na prevenção de cárie secundária.

## **7 CONCLUSÃO**

A avaliação de DK antes e depois do crescimento bacteriano mostrou que a adição de MMT carregado com CHX não foi capaz de impedir a diminuição dos valores de DK em esmalte dental. Também não mostrou valores de DK diferente do grupo sem MMT/CHX

Visto que após a avaliação do crescimento bacteriano, também não preveniu a formação de UFC.

## REFERÊNCIAS

Arbildo-Vega HI, Lapinska B, Panda S, Lamas-Lara C, Khan AS, Lukomska-Szymanska M. Clinical Effectiveness of Bulk-Fill and Conventional Resin Composite Restorations: Systematic Review and Meta-Analysis. *Polymers (Basel)*. 2020;12(8):1786. 2020.

Askar H, Brouwer F, Lehmensiek M, Paris S, Schwendicke F. The association between loading of restorations and secondary caries lesions is moderated by the restoration material elasticity. *J Dent*. 2017;58:74-79. doi:10.1016/j.jdent.2017.01.002. 2017.

Askar H, Krois J, Göstemeyer G, et al. Secondary caries: what is it, and how it can be controlled, detected, and managed?. *Clin Oral Investig*. 2020;24(5):1869-1876. 2020.

Askar H, Krois J, Göstemeyer G, Schwendicke F. Secondary caries risk of different adhesive strategies and restorative materials in permanent teeth: Systematic review and network meta-analysis. *J Dent*. 2021;104:103541. 2021.

Askar H, Tu YK, Paris S, Yeh YC, Schwendicke F. Risk of caries adjacent to different restoration materials: Systematic review of in situ studies. *J Dent*. 2017;56:1-10. doi:10.1016/j.jdent.2016.09.011. 2017.

Boutsiouki C, Frankenberger R, Lücker S, Krämer N. Inhibition of secondary caries in vitro by addition of chlorhexidine to adhesive components. *Dent Mater*. 2019;35(3):422-433. doi:10.1016/j.dental.2018.12.002. 2019.

Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent*. 2020 Dec;103:103497. 2020.

Brunthaler A, König F, Lucas T, Sperr W, Schedle A. Longevity of direct resin composite restorations in posterior teeth. *Clin Oral Investig*. 2003 Jun;7(2):63-70. doi: 10.1007/s00784-003-0206-7. Epub 2003 May 27. Citado em PubMed; PMID: 12768463. 2003.

Chen Q, Zhu R, Deng W, Xu Y, Zhu J, Tao Q, He H. From used montmorillonite to carbon monolayer–montmorillonite nanocomposites. *Appl. Clay Sci*. 2014, 100, 112–117. 2014.

Chisini LA, Collares K, Cademartori MG, et al. Restorations in primary teeth: a systematic review on survival and reasons for failures. *Int J Paediatr Dent*. 2018;28(2):123-139. doi:10.1111/ipd.12346. 2018.

Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern? *Front Microbiol*. 2019 Mar 22;10:587. 2019.

Clarín A, Ho D, Soong J, Looi C, Ipe DS, Tadakamadla SK. The Antibacterial and Remineralizing Effects of Biomaterials Combined with DMAHDM Nanocomposite: A Systematic Review. *Materials (Basel)*. 2021;14(7):1688. Published 2021 Mar 30. doi:10.3390/ma14071688. 2021.

Dehghani Nazhvani A, Haddadi P, Badiie P, Malekhoseini SA, Jafarian H. Antifungal Effects of Common Mouthwashes on Candida Strains Colonized in the Oral Cavities of Liver Transplant Recipients in South Iran in 2014. *Hepat Mon*. 2016 Jan 30;16(1):e31245. 2016.

Ferracane JL. Models of Caries Formation around Dental Composite Restorations. *J Dent Res*. 2017;96(4):364-371. doi:10.1177/0022034516683395

Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*. 2005;99(4):703-15. 2005.

Hoffmann T, Bruhn G, Richter S, Netuschil L, Brex M. Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. *Clin Oral Investig*. 2001 Jun;5(2):89-95. 2001.

Hollanders ACC, Kuper NK, Maske TT, Huysmans MDNJM. Secondary Caries in situ Models: A Systematic Review. *Caries Res*. 2018;52(6):454-462. doi:10.1159/000487200. 2018.

Kidd EA. Diagnosis of secondary caries. *J Dent Educ*. 2001;65(10):997-1000.  
Lobato-Aguilar HA, Lizama-Uc G, Uribe-Calderon JA, Cauich-Rodriguez J, Rodriguez-Fuentes N, Cervantes-Uc JM. Antibacterial properties and release kinetics of chlorhexidine diacetate from montmorillonite and palygorskite clays. *J Biomater Appl*. 2020 Mar;34(8):1052-1058. 2020.

Martins FV, Vasques WF, Fonseca EM. Evaluation of the efficiency of fluoride-releasing adhesives for preventing secondary caries in-vitro: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2019;20(1):1-8. doi:10.1007/s40368-018-0388-y. 2019.

Maske TT, Kuper NK, Cenci MS, Huysmans MDNJM. Chlorhexidine, a Matrix Metalloproteinase Inhibitor and the Development of Secondary Caries Wall Lesions in a Microcosm Biofilm Model. *Caries Res*. 2019;53(1):107-117. doi:10.1159/000490195. 2019.

Maske TT, Kuper NK, Cenci MS, Huysmans MDNJM. Minimal Gap Size and Dentin Wall Lesion Development Next to Resin Composite in a Microcosm Biofilm Model. *Caries Res*. 2017;51(5):475-481. doi:10.1159/000478536. 2017.

Meng N, Zhou NL, Zhang SQ, Shen J. Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite. *Int J Pharm*. 2009 Dec 1;382(1-2):45-9. 2009.

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

Mjör IA, Toffenetti F. Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence Int.* 2000;31(3):165-179. 2000.

Paiva LB, Morales AR, Díaz FRV. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. *Cerâmica [online]*. v. 54, n. 330. 2008.

Splieth C, Rosin M, Gellissen B. Determination of residual dentine caries after conventional mechanical and chemomechanical caries removal with Carisolv. *Clin Oral Investig.* 2001 Dec;5(4):250-3. doi: 10.1007/s00784-001-0130-7. Citado em PubMed; PMID: 11800438. 2001.

Uddin F. Clays, Nanoclays, and Montmorillonite Minerals. *Metall Mater Trans A* 39, 2804–2814. 2008.

Wang R, Li H, Ge G, Dai N, Rao J, Ran H, Zhang Y. Montmorillonite-Based Two-Dimensional Nanocomposites: Preparation and Applications. *Molecules*. 2021 Apr 26;26(9):2521. 2021.

Wood A, Payne D. The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. *J Hosp Infect.* 1998 Apr;38(4):283-95. 1998.

Worthington HV, Khangura S, Seal K, et al. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent posterior teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;8(8):CD005620. 2021.

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.* 2013 Mar 1;33(2):752-7. 2013.

Zhang N, et al. Insights atuais sobre a modulação da degradação bacteriana oral de materiais restauradores poliméricos dentários. *Materiais (Basileia)* 2017;10(5). 2017.

Zhang Y, et al. Compostos quaternários de amônio em materiais restauradores dentários. *Dent Mater J* 2018;37(2):183–91. 2018.

## Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Santo Amaro

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da desmineralização de esmalte dental em restauração com compósito com liberação de clorexidina- estudo in vitro

**Pesquisador:** Leticia Cristina Cidreira Boaro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 58611322.8.0000.0081

**Instituição Proponente:** OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.413.792

#### Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente estudo será avaliar a desmineralização do esmalte dentário utilizando compósitos híbridos contendo o complexo MMT/CHX e carga convencionais de vidro de bário e sílica, em diferentes concentrações. Assim, foram confeccionados seis compósitos experimentais a base de BisGMA/TEGDMA, contendo 5% de MMT carregada com clorexidina, as concentrações totais serão de 30 ou 60% em peso. Sendo que a proporção de vidro de bário e sílica coloidal será de 80/20 ou 70/30 em peso. Além disso teremos dois grupos controle um apenas com a matriz polimérica, e outro apenas com MMT/CHX, totalizando assim seis grupos experimentais. Cavidades confeccionadas em dentes humanos serão restauradas com estes compósitos. A desmineralização será analisada através da microdureza Knoop na superfície do esmalte antes, 7 dias e 14 dias após o crescimento do biofilme de *S. Mutans*. Além disso, será feita a contagem das unidades formadoras de colônia tanto após 7 dias quanto após 14 dias. A análise estatística será realizada de acordo com a normalidade e a homocedasticidade dos dados.

**Endereço:** Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 02450-000

**Telefone:** (11)2141-8687

**E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 5.413.792

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo do presente estudo será avaliar a desmineralização do esmalte dentário utilizando compósitos híbridos contendo o complexo MMT/CHX e carga convencionais de vidro de bário e sílica, em diferentes concentrações. Assim, foram confeccionados seis compósitos experimentais a base de BisGMA/TEGDMA, contendo 5% de MMT carregada com clorexidina, as concentrações totais serão de 30 ou 60% em peso. Sendo que a proporção de vidro de bário e sílica coloidal será de 80/20 ou 70/30 em peso. Além disso teremos dois drupos controle um apenas com a matriz polimérica, e outro apenas com MMT/CHX, totalizando assim seis grupos experimentais. Cavidades confeccionadas em dentes humanos serão restauradas com estes compósitos. A desmineralização será analisada através da microdureza Knoop na superfície do esmalte antes, 7 dias e 14 dias após o crescimento do biofilme de *S. Mutans*. Além disso, será feita a contagem das unidades formadoras de colônia tanto após 7 dias quanto após 14 dias. A análise estatística será realizada de acordo com a normalidade e a homocedasticidade dos dados.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

Os possíveis riscos são aqueles inerentes ao procedimento cirúrgico de extração dos terceiros molares que são: possibilidade de dor, edema, sangramento e parestesia (perda de sensibilidade após o efeito da anestesia local). Todos esses riscos serão administrados pelo pesquisador, e controlados com medicação caso ocorram.

##### **Benefícios:**

Este trabalho não trará benefício direto ao paciente participante. Este é um estudo laboratorial que testará um novo material que visa diminuir a incidência de cárie. Os benefícios, portanto são aqueles relacionados ao desenvolvimento de um material restaurador com atividade antibacteriana e remineralizadora; menor incidência de cárie secundária; menor índice de substituição das restaurações; maior durabilidade do material na cavidade bucal.

**Endereço:** Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340  
**Bairro:** Jardim das Imbuías **CEP:** 02.450-000  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11) 2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

Continuação do Parecer: 5.413.792

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os dados serão analisados de acordo com a normalidade e homocedasticidade dos dados.

Desfecho Primário:

Desenvolvimento de um material restaurador que inibe cárie.

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

- Informações Básicas - ok
- Folha de Rosto - ok
- Projeto de Pesquisa -ok
- Carta de co-participação ("Declaração"): assinada, carimbada, datada de 2019, com CPF e sem CNPJ (dado retrospectivo)
- TCLE - ok
- Riscos e Benefícios - ok
- Cronograma - ok
- Orçamento . ok

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

- Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações BÁSICAS DO PROJETO 1936879.pdf	10/05/2022 18:14:22		Aceito
Folha de Rosto	FR_Boaro.pdf	10/05/2022 18:13:52	Leticia Cristina Cidreira Boaro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	02/05/2022 12:48:27	Leticia Cristina Cidreira Boaro	Aceito
Outros	declaracao.pdf	02/05/2022 12:43:35	Leticia Cristina Cidreira Boaro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	02/05/2022 12:42:34	Leticia Cristina Cidreira Boaro	Aceito

**Endereço:** Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías **CEP:** 02.450-000

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8887 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 5.413.792

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SÃO PAULO, 17 de Maio de 2022

---

**Assinado por:**  
**Ana Paula Ribeiro**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 342

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**CEP:** 02.450-000

**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8687

**E-mail:** [pesquisaunisa@unisa.br](mailto:pesquisaunisa@unisa.br)