UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Mirko Dennys Ayala Pérez

Influência de diferentes compósitos restauradores experimentais contendo nanopartículas com capacidade de liberação de clorexidina sobre a desmineralização de esmalte dentário humano – estudo *in vitro*

São Paulo

2022

Mirko Dennys Ayala Pérez

Influência de diferentes compósitos restauradores experimentais contendo nanopartículas com capacidade de liberação de clorexidina sobre a desmineralização de esmalte dentário humano – estudo *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Letícia Cristina Cidreira Boaro

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

P514i Perez, Mirko Dennys Ayala.

Influência de diferentes compósitos restauradores experimentais contendo nanopartículas com capacidade de liberação de clorexidina sobre a desmineralização de esmalte dentário humano: estudo in vitro / Mirko Dennys Ayala Perez. — São Paulo, 2022.

50 p.: il., color.

Tese (Doutorado em Odontologia) — Universidade Santo Amaro, 2022.

Orientadora: Prof.ª Me. Dr.ª Leticia Cristina Cidreira Boaro.

1. Desmineralização. 2. Dureza. 3. Clorexidina. I. Boaro, Leticia Cristina Cidreira, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Fernando Carvalho — CRB8/10122

UNiSA
Universidade Santo Amaro

Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*

Odontologia – Curso de Doutorado

Ata de Defesa

Ao **decimo quinto dia do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e dois**, conforme Regimento Geral e Regulamento de Pós-graduação da UNISA teve início às 09h00min, o exame de Doutoramento intitulada ***"Influência de diferentes compósitos restauradores experimentais contendo nanopartículas com capacidade de liberação de clorexidina sobre a desmineralização de esmalte dentário humano – estudo in vitro"***. do (a) doutorando (a) **Mirko Dennys Ayala Perez,** regularmente matriculado (a) no curso de Doutorado Acadêmico em Odontologia – Área de Concentração em Implantodontia. Os requisitos exigidos foram cumpridos conforme registros constantes nos arquivos da Secretaria da Pós-graduação, segundo encaminhamento do Prof. Doutor Livre Docente Wilson Roberto Sendyk, Coordenador do Programa. Os trabalhos foram instalados pelo (a) orientador (a) e Presidente da Banca Examinadora Profa.Dra. Letícia Cristina Cidreira Boaro, Doutora pela USP, Prof. Dr. William Cunha Brandt, Doutor pela UNICAMP,Profa. Dra. Flávia Gonçalves, Doutora pela USP, Prof. Dr Milton Satoiuqui Masuda, Doutor Pela USP e Prof. Dr. José Fábio Guastelli Gastaldo, Doutor pela USP. A Banca Examinadora, tendo decidido aceitar a dissertação, passou à arguição do aluno (a). Encerrados os trabalhos deram, o parecer final conforme consta a seguir:

Profa. Dra. Letícia Cristina Cidreira Boaro
Assinatura: Aprovado Parecer: Letícia Boaro

Prof. Dr. William Cunha Brandt
Assinatura: Aprovado Parecer:

Profa. Dra. Flávia Gonçalves
Assinatura: Aprovado Parecer: Flavia Gonçalves

Profa. Dra. Milton Satoiuqui Masuda
Assinatura: Aprovado Parecer:

Prof.Dr. José Fábio Guastelli Gastaldo
Assinatura: Aprovado Parecer:

Dedico este trabalho a os meus pais Nancy Perez e Victor Ayala por me incentivar em todo momento, aos meus filhos Gabriel, Wendy, Hyago para inspira-los a estudar e ser pessoas de bem, aos meus irmãos pelo carinho apoio e confiança que me brindam, este titulo não e só meu é da nossa família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar minha vida e ter sua presença em todos os momentos me fortalecendo.

Ao Professor Dr. Wilson Roberto Sendyk coordenador do programa de Doutorado em Odontologia por me acolher e dar a chance de participar do curso.

A Professora Dra. Leticia Cristina Cidreira Boaro pelo apoio, confiança, impulso, incentivo, paciência e inspiração para realizar o doutorado, sem você querida amiga jamais teria conseguido, você é e sempre será mia “Chefa”.

Aos professores do programa do doutorado pelos ensinamentos ao longo destes três anos de curso, especialmente ao Prof.Dr. William Brant Cunha e Prof. Dra. Flavia Gonçalves pelas orientações e correções do trabalho pois sua visão e experiência ajudou muito na conclusão dele.

A Larissa Tavares pela ajuda, orientações e ensinamentos para realizar esta tese.

A universitária Greca Buarque por todo o apoio e trabalho realizado no laboratório nesta fase final do doutorado.

Ao professor Antônio Gordilho parceiro de pesquisa e amigo em todo momento, desejo sempre muito sucesso na sua vida.

"A felicidade pode ser encontrada inclusive nos momentos mais escuros; só é preciso se lembrar de acender a luz” (ROWLING, 2000).

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes compósitos restauradores experimentais contendo nanopartículas com capacidade de liberação de clorexidina sobre a desmineralização de esmalte dentário humano. Para isso, a etapa inicial deste estudo baseou-se na manipulação dos compósitos com matrizes resinosas à base de Bis-GMA e TEGDMA, cargas inorgânicas à base de vidro de bário e sílica coloidal e variando em duas concentrações (30% e 60% em peso) e em duas proporções (80/20 e 70/30), além da adição de 5% do complexo montmorilonita/clorexidina (MMT/CHX). Outros três grupos foram utilizados como controle, sendo um constituído apenas por matriz resinosa, outro por matriz e as partículas de MMT/CHX e o último por um compósito comercial, totalizando 7 grupos experimentais. A etapa subsequente foi o preparo dos espécimes, mediante aprovação do CEP (CAAE: 58611322.8.0000.0081, ANEXO A), onde 49 espécimes (n=7) oriundos de 25 terceiros molares humanos extraídos foram seccionados, planificados e fixados com resina acrílica em dispositivos circulares de PVC, finalmente as cavidades foram cuidadosamente preparadas em formato circular com cerca de 2,1 milímetros de diâmetro e 2,4 milímetros de profundidade e restauradas com os compósitos experimentais. Com os espécimes supracitados já restaurados, procedeu-se a realização de dois ensaios: (1) Microdureza Knoop, que mensurou em pontos padronizados ao redor da restauração a dureza de superfície do espécime antes e após o crescimento do biofilme, e desta forma foi possível prever o perfil de desmineralização após a perda da dureza, (2) Biofilme, experimento que desencadeou a desmineralização do esmalte e avaliou a resposta dos compósitos experimentais diante do desafio microbiano a que foram expostos com a formação do biofilme a partir de culturas com *Streptococcus Mutans.* A análise estatística foi realizada de acordo com a normalidade e a homocedasticidade dos dados. A partir dos resultados obtidos com estes ensaios foi possível observar que houve desmineralização em todos os grupos após 7 dias de crescimento do biofilme, notada a redução da dureza em todos os grupos. Além disso, no grupo com maior redução na dureza também foi visto um alto valor na contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), o que pode ser explicado pela ausência de cargas inorgânicas no referido compósito experimental e com isso uma possível liberação rápida e excessiva da clorexidina. Apenas numericamente há uma tendência de melhor desempenho bioativo nos grupos com alta concentração de carga inorgânica embora estatisticamente não os grupos não tenham apresentado diferença. Portanto, dentro das limitações do estudo pode-se concluir que somente os compósitos experimentais com MMT/CHX não são suficientes para liberar clorexidina ao longo de 7 dias e impedir desmineralização..

Palavras Chave: Desmineralização. Biofilme. Microdureza. Clorexidina. Materiais Dentários.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the influence of different experimental restorative composites containing nanoparticles capable of releasing chlorhexidine on the demineralization of human dental enamel. For this, the initial stage of this study was based on the manipulation of composites with resin matrices based on Bis-GMA and TEGDMA, inorganic fillers based on colloidal silica and barium glass, varying in two concentrations (30% and 60% by weight) and in two proportions (80/20 and 70/30), in addition to the addition of 5% of the montmorillonite/chlorhexidine complex (MMT/CHX). Another three groups were used as controls, one consisting only of resin matrix, another for matrix and MMT/CHX particles and the last for a commercial composite, totaling 7 experimental groups. The subsequent step was the preparation of specimens, after approval by the CEP (CAAE: 58611322.8.0000.0081, ANNEX A), where 49 specimens (n=7) from 25 extracted human third molars were sectioned, flattened and fixed with acrylic resin in devices PVC rings, finally the cavities were carefully prepared in a circular shape about 2 mm in diameter and 1.5 mm in depth and restored with the experimental composites. With the aforementioned specimens already restored, two tests were carried out: (1) Knoop Microhardness, which measured the surface hardness of the specimen at standardized points around the restoration before and after the growth of the biofilm, and in this way it was possible predict the demineralization profile after loss of hardness, (2) Biofilm, experiment that triggered enamel demineralization and evaluated the response of experimental composites to the microbial challenge to which they were exposed with the formation of biofilm from cultures with Streptococcus Mutans. Statistical analysis was performed according to data normality and homoscedasticity. From the results obtained with these tests, it was possible to observe that there was demineralization in all groups after 7 days of biofilm growth, with a reduction in hardness in all groups. In addition, in the group with the greatest reduction in hardness, a high value in the count of colony forming units (CFUs) was also seen, which can be explained by the absence of inorganic fillers in the aforementioned experimental composite and with this a possible rapid and excessive release. of chlorhexidine. Only numerically there is a tendency of better bioactive performance in the groups with high concentration of inorganic filler, although statistically the groups did not show any difference. Therefore, within the limitations of the study, it can be concluded that experimental composites with MMT/CHX alone are not sufficient to release chlorhexidine over 7 days and prevent demineralization. Statistical analysis was performed according to data normality and homoscedasticity.

Keywords: Demineralization. Biofilm. Microhardness. Chlorhexidine. Dental Materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da indentação em pontos padronizados ao redor da restauração.....26

Figura 2 - Placa recém removida da estufa para troca do meio de cultura.....27

Figura 3 - Espécime sendo removido com pinça estéril para imersão em salina 29

Figura 4 - Apreensão do espécime com pinça estéril sendo levado ao tubo de Falcon com 5mL de soro estéril.....30

Figura 5 – Plaqueamento, etapa em que a última diluição é semeada no meio de cultura BHI Ágar 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos experimentais distribuídos de acordo com as concentrações proporções determinadas 24

Tabela 2- Médias (desvios-padrão) para os dados de microdureza Knoop, e redução de microdureza (em %) entre inicial e após 7 dias de crescimento de biofilme. Na mesma coluna (ou seja, comparação entre os grupos em um mesmo período), valores seguidos pela mesma letra maiúscula são estatisticamente semelhantes (P>0,05). Na mesma linha (ou seja, comparação entre inicial e 7 dias para um mesmo grupo), valores seguidos pela mesma letra minúscula são estatisticamente semelhantes (P>0,05).....33

Tabela 3- Médias (desvios-padrão) para os dados de unidades formadoras de colônias (UFC/µl), numa diluição de 10^9 Valores seguidos pela mesma letra são estatisticamente semelhantes (p>0,05). 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	microlitros
$Al_2 (OH)_6$	hidróxido de alumínio
AMPs	peptídeos antimicrobianos
Bis-EMA	bisfenol A- diglicidil metacrilato etoxilado
Bis-GMA	bisfenol A- glicidil metacrilato
BHI	brain heart infusion
CHX	clorexidina
DCPA	fosfato de cálcio dibásico
L. Casei	*Lactobacillus Casei*
$Mg_3(OH)_6$	hidróxido de magnésio
mL	mililitro
mm	milímetro
MMT	montmorilonita
P. Gingivalis	*Porphyromonas Gingivalis*
RPM	rotações por minuto
S.Aureus	*Staphylococcus Aureus*
Si	sílica
SiO_4	ortosilicato
S. Mutans	*Streptococcos Mutans*
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TEGDMA	dimetacrilato de trietilenoglicol
UDMA	uretano dimetacrilato
UFC	unidade formadora de colônia
VB	vidro de bário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1 ESTRATÉGIAS PARA EVITAR FORMAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ADJACENTES A RESTAURAÇÃO 16
2.2 MONTMORILONITA (MMT) 18
2.3 CLOREXIDINA (CHX) 19
2.4 USO DE MONTMORILONITA E CLOREXIDINA EM COMPÓSITOS ODONTOLÓGICOS RESTAURADORES 21
3 OBJETIVOS 22
4 MATERIAL E MÉTODOS 23
4.1 MANIPULAÇÃO DOS COMPÓSITOS 23
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS 24
4.3 PREPARO DAS CAVIDADES E RESTAURAÇÃO 25
4.4 AVALIAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL 26
4.5 BIOFILME 27
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 30
5 RESULTADOS 31
6 DISCUSSÃO 34
7 CONCLUSÃO 37
REFERÊNCIAS 38
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa 44
ANEXO B – Declaração para co- participantes 48
ANEXO C –Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) 49

1 INTRODUÇÃO

A cárie secundária é um processo complexo, multifatorial, que entrelaça as causas da cárie primária com características da restauração e do material restaurador (1). Embora a propensão de insucesso na restauração seja significativamente mais alta em pacientes que possuem alto risco para cárie (2), com dieta cariogênica e má higiene oral, a ausência de atividade antimicrobiana e/ou remineralizante dos materiais indicados para restaurar dentes também possui grande contribuição para que esse processo perdure (3), além disso, defeito nas margens da restauração, localização, condição socioeconômicas e carga mastigatória cíclica também estão associados como possíveis fatores de risco (1).

Como todas as doenças, o diagnóstico correto é imprescindível para a escolha da conduta adequada no tratamento, sendo por vezes indicado o reparo da restauração e não a sua substituição completa, no intuito de preservar a estrutura dental (1). Os estudos mostram que a presença da restauração torna o diagnóstico difícil, pois sabe-se que lacunas maiores que 60 micrometros podem levar à desmineralização interfacial, porém somente com a inspeção visual e tátil é muito difícil distinguir uma descoloração marginal de uma lacuna micrométrica com microinfiltração (3).

Recente estudo especula que dentre os materiais restauradores comumente utilizados, o ionômero de vidro modificado por resina é o que apresenta menor risco de cárie, mas se tratando de resinas compostas o mesmo não acontece (4) o que reafirma a necessidade de contribuir com o avanço da ciência no desenvolvimento de materiais bioativos. A literatura sugere que os compósitos são materiais com maior incidência de cárie devido algumas questões técnicas e propriedades do material, tais como: Dificuldade de promover um bom selamento, sensibilidade técnica nas etapas responsáveis por promover a adesão, falhas na polimerização e biodegradação da interface (3).

Muitas são as estratégias encontradas na literatura que objetivam evitar a formação de lesões de cárie adjacente à restauração, dentre as quais se destacam os materiais que buscam promover remineralização (5-7) e os materiais antimicrobianos (8-11).

Diante dessa perspectiva, a clorexidina (CHX) pode ser uma alternativa viável. Amplamente utilizada como colutório, é o antimicrobiano “padrão ouro” em odontologia, mas que desperta interesse pelos resultados promissores quando junto de uma “partícula carreadora” é incorporada em compósitos (12-14), isso porque quando a CHX foi associada a uma sílica porosa foi observado uma manutenção das propriedades, liberação mais gradual e prolongada, além da inibição do crescimento de bactérias de importância odontológica como *S. Mutans e L. Casei*, entretanto quando está na matriz resinosa sem qualquer tipo de partícula (carreadora ou carga inorgânica), há uma queda nas propriedades, aumento na rugosidade e liberação rápida e excessiva (12), esses dados justificam a necessidade de associar a CHX a um carreador e a montmorilonita (MMT) é uma alternativa já estudada pelas indústrias farmacêuticas para liberação controlada de fármacos (15-17), isso se deve a capacidade de absorção de moléculas orgânicas que a nanoargila (MMT) possui (18).

A incorporação das partículas em diferentes concentrações do complexo MMT/CHX em uma matriz resinosa foi alvo de um estudo, onde foi observado que 5% do complexo é a concentração ideal para expressar atividade antimicrobiana contra *S. Mutans, P. Gingivalis e S. Aureus* sem redução das propriedades mecânicas e grau de conversão (14), além disso, dados ainda não publicados demonstram que a atividade antimicrobiana continua existindo em compósitos com outros tipos de cargas inorgânicas associadas, ou seja, compósitos híbridos que possuem além de partículas bioativas, partículas de sílica e vidro de bário e que existe atividade bacteriana em períodos prolongados.

Considerando que a cárie secundária é uma das maiores causas de substituições de restaurações, que mesmo diante do inconveniente da contração de polimerização gerada pelos compósitos esses materiais são amplamente utilizados e que os dados obtidos nas pesquisas que se dedicam estudar a incorporação do complexo MMT/CHX tem sido promissores, justifica-se dar continuidade a esta linha de pesquisa e avaliar o efeito de dentes restaurados com estes compósitos experimentais sobre a desmineralização através do ensaio de Microdureza Knoop.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIAS PARA EVITAR A FORMAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ADJACENTES A RESTAURAÇÃO

Uma das principais razões para falha e substituição de restaurações são representadas pelas lesões de cárie secundária (19-21). Esta doença pode ser considerada mais complexa que lesões de cárie iniciais, uma vez que o ataque cariogênico ocorre não só na superfície do dente, como também na interface dente-restauração e além disso há uma preocupação com o desafio bacteriano, pois já foi observado na comparação entre espécimes hígidos e espécimes restaurados com compósitos que existe um aumento na proporção de *S. Mutans e Lactobacilos* no grupo com compósitos (3).

A desmineralização promovida por microrganismos na interface pode ser contribuída pela ausência de atividade antimicrobiana e/ou remineralizante dos materiais indicados para restaurar dentes (1), diante deste cenário, muitos são os métodos pesquisados para evitar este problema clínico, tais como as estratégias de materiais com ação antibacteriana (8-11). São exemplos dessa estratégia:

Quitosana, polissacarídeo proveniente da quitina, encontrada na natureza como componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos. Macromolécula não tóxica, biocompatível e com propriedades anti-inflamatória e cicatrizante (22). Seu efeito antibacteriano é aumentado em função de um menor pH (23). No contexto odontológico já demonstrou melhorar a integridade da dentina desmineralizada (10), e exibir atividade antibacteriana contra *S. Mutans,* quando adicionada em adesivo e compósito odontológico a quitosana metacrilada não alterou a resistência de união dos adesivos, porém quando adicionada em compósitos, houve uma influência negativa na dureza e resistência a flexão (23). Especula-se que a reticulação é importante para manter as propriedades mecânicas, entretanto isso poderia afetar a atividade antimicrobiana, e este assunto foi o objetivo de um recente estudo, que avaliou a reticulação de partículas de quitosana carregadas com fosfato de cálcio dibásico (DCPA) em 0, 8 ou 16 horas, tais partículas foram incorporadas em compósitos experimentais e os resultados apresentados para o grau de conversão, resistência a flexão e módulo de elasticidade não diferem muito entre os grupos com

e sem a adição das partículas, mas se tratando da atividade antibacteriana o material com maior reticulação promoveu a maior morte de células bacterianas (24).

Sais de amônio quaternário também são exemplos, uma vez que podem ser adicionados a um grupo metacrilato e exibir resultados positivos, como redução do crescimento do biofilme, ausência de citotoxidade e manutenção da resistência a flexão e módulo de elasticidade (9), mas a desvantagem é que inibem apenas por contato, e se proteínas que precedem a colonização estivem presentes, o mesmo não terá sua eficácia garantida (25,26). Por este motivo tem-se estudado outras alternativas para potencializar o efeito antimicrobiano do amônio quaternário, tais como: uso de repelente para proteínas, permitindo o contato direto do amônio quaternário com a bactéria (27, 28), combinação do amônio com polimetilmetacrilato e irradiação por feixe de elétrons, pois esta irradiação induz a despolarização de membrana, isso gera maior permeabilidade e consequentemente morte bacteriana, ocorrendo um efeito bactericida e não só bacteriostático (29), e até mesmo a combinação com flúor, para oferecer um mecanismo duplo na recidiva de cárie (30).

Nanopartículas de prata (AgNPs), podem também serem descritas como material antimicrobiano com amplo espectro de ação incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (27). E embora AgNPs alterem a cor dos materiais dentários, existem estudos que conseguiram contornar este problema sintentizando as nanopartículas de prata revestidas com dióxido de silício (31), além da possível manutenção da estética essas partículas se mostraram eficientes no controle da atividade metabólica do biofilme contra *S. Mutans* e na ausência de citotoxidade em células dentárias humanas (31).

Peptídeos antimicrobianos (AMPs), possuem em sua estrutura aminoácidos carregados positivamente, com isso são facilmente atraídos por membranas microbianas que estão carregadas negativamente (27). O seu emprego em adesivo mostrou resultados positivos na atividade antibacteriana contra *S. Mutans*, tal efeito parece ser potencializado em função do aumento da concentração do peptídeo, no estudo foram testadas as concentrações de 1%, 3% e 5%, mas quanto maior a concentração menor os valores de resistência de união (32). Óxido de zinco, titânio, cobre e ouro também exibem propriedades antibacterianas, entretanto seu uso é mais comum em implantodontia (27).

2.2. MONTMORILONITA (MMT)

A Montmorilonita é uma nanopartícula argilomineral, que possui sua origem em Montmotillon, região de Poitou na França. É constituída pela sobreposição de duas lâminas tetraédricas de SiO_4 e uma centralizada de octaedros (Al_2 $(OH)_6$) e Mg_3 $(OH)_6$), ligadas entre si por átomos de oxigênio, o que constitui uma estrutura única, a chamada lamela. Essa estrutura lamelar é formada pela orientação paralela dos planos cristalinos (33).

O formato e a dispersão da nanopartícula em relação à matriz polimérica são determinantes para a melhoria das propriedades dos nanocompósitos, tais como: resistência à compressão, impacto, fratura, tração e a flexão e o módulo de Young. Essa espécie de nanopartícula é frequentemente utilizada na fabricação de nanocompósitos, pois limita a mobilidade das cadeias poliméricas, desempenhando função de reforço (34). De acordo com estudos prévios, a adição de até 10% de concentração da nanopartícula de MMT, pode elevar propriedades mecânicas, térmicas e a estabilidade dimensional dos nanocompósitos (35,36).

A nanopartícula de MMT é capaz de absorver moléculas, com isso tornou-se alvo de estudos que relataram possível uso da nanopartícula na indústria farmacêutica como veículo de liberação de fármaco (17, 36). As drogas podem ser incorporadas no espaço intercamadas e por ser biocompatível e possuir capacidade de troca catiônica razoavelmente alta a referida nanopartícula pode ser utilizada com medicamentos e supõe-se que até mesmo com a entrega de materiais genéticos, mas a montmorilonita ainda é pouco explorada neste ramo de terapia genética e engenharia de tecidos e muitas pesquisas ainda devem ser realizadas para entender e elaborar o papel da montmorilonita nesse tipo de terapêutica (37)

Explorando essa aplicação na área odontológica, um estudo comparou resinas compostas experimentais adicionadas com MMT e Vidro de Bário como carga, utilizando a mesma matriz polimérica à base de BisGMA/TEGDMA. Observou-se que o grau de conversão foi estatisticamente semelhante para os dois tipos de carga, mostrando que a adição da nanopartícula de MMT não alterou a cinética de polimerização dos nanocompósitos. Também foi observado que na concentração de 20% em volume de MMT, houve um aumento estatisticamente significante do módulo de elasticidade e da resistência à flexão, quando comparada com a mesma concentração de Vidro de Bário (38).

2.3. CLOREXIDINA (CHX)

É um antimicrobiano com natureza catiônica, capaz de se adsorver a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral (39, 40). Com amplo espectro de ação, age sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (40).

O mecanismo de ação da CHX é explicado por sua molécula catiônica, uma vez que a mesma pode ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, e assim é adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente, este é o motivo pelo qual em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana, entretanto em doses mais baixas, ocorre alteração na integridade da membrana celular, o que resulta em extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (39, 40).

Assim como em todo medicamento, reações adversas podem ser desencadeadas, mas tais reações ocorrem pelo uso em períodos prolongados e incluem alterações no paladar, xerostomia, coloração dentária entre outras ainda mais incomuns (41)

As indicações de clorexidina em odontologia vão além do uso como colutórios, é possível utilizá-la como substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico e como medicação intracanal (42), antissepsia extra oral (43) e tem-se pesquisado sobre sua incorporação em compósitos (12-14).

Ao que parece a literatura aponta duas estratégias para evitar a liberação excessiva e descontrolada da clorexidina livre na matriz de resina, são elas: O encapsulamento e a nanoparticulação (27). No encapsulamento, como o próprio nome sugere a clorexidina é encapsulada em um “transportador” e através dele é liberada lentamente (27), pois sabe-se que a incorporação de clorexidina à matriz resinosa, quando associada a partículas de carga de sílica coloidal, favorece a liberação da CHX de maneira gradual e prolongada, demonstrando atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, sem influenciar negativamente as propriedades mecânicas do compósito experimental, por outro lado quando está na

matriz resinosa sem a presença da sílica, há uma queda nas propriedades, aumento na rugosidade e liberação rápida e excessiva (12). Portanto, entende- se que as nanopartículas de sílica desempenham um papel importante no que diz respeito ao aumento das propriedades mecânicas de compósitos (44,45) e combiná-las com materiais que reduzem a patogenicidade dos microorganismos orais, como a clorexidina seria uma combinação muito promissora. A segunda estratégia trata-se da síntese de nanopartículas de hexametafosfato de clorexidina (27), essa nanopartícula foi incorporada ao cimento ionômero de vidro e demonstrou que houve liberação de clorexidina durante 33 dias, entretanto não é possível adicionar mais que 20% de partículas no cimento, pois esta é uma condição limítrofe em que já foi possível observar alguma queda nas propriedades mecânicas (46).

Além da combinação entre clorexidina com nanopartículas de sílica (12), montmorilonita (14) e o flúor (46), o referido antimicrobiano também já foi associado ao fosfato de cálcio em suas diversas fases (47,48,49), e apesar das limitações envolvendo principalmente as propriedades mecânicas, resultados positivos foram descritos: No estudo em que a clorexidina foi associada ao fosfato monocálcico monohidratado e fosfato β-tricálcio, os autores desenvolveram um material resinoso com possível aplicação como base ou para ser incorporado em adesivo (47). A combinação da CHX com fosfato de cálcio amorfo e flúor mostra uma liberação relativamente alta na primeira semana e um platô após duas semanas, os autores ainda ressaltam que a porcentagem de CHX liberada do ACP durante um mês foi pequena, cerca de 2%, por isso os autores esperam que tal quantidade desempenhe um efeito local, mas não sistêmico (49). Este estudo ainda mostra que o pH dos compósitos com flúor, clorexidina e fosfato mostrou-se superior ao grupo contendo apenas CHX e fosfato, possivelmente devido a liberação de íons flúor que potencializa a redução na produção de ácido das bactérias. Todos esses dados mostram o quanto a incorporação da clorexidina pode ser benéfica em materiais resinosos, visto que sempre demonstra resultados positivos nas avaliações antibacterianas.

2.4. USO DE MONTMORILONITA E CLOREXIDINA EM COMPÓSITOS ODONTOLÓGICOS RESTAURADORES

Estudos demonstram que é possível e parece ser vantajoso associar o complexo montmorilonita/clorexidina à matriz resinosa à base de Bis-GMA/TEGDMA, supondo-se que a MMT funcione como um carreador que auxilie na liberação controlada do fármaco, uma vez que a adição dessa partícula apresentou efetiva atividade antibacteriana para *Streptococcus Mutans, Porphyromonas Gingivallis, e Staphylococcus Aureus* (14). Esse estudo avaliou o comportamento da adição do complexo em três concentrações, 2,5%, 5% e 10% e observou que a concentração de 5% apresentou atividade antimicrobiana para todas as bactérias avaliadas, sem diminuição das propriedades mecânicas (resistência a flexão e módulo de elasticidade) e do grau de conversão. No que diz respeito à atividade antibacteriana, para o *S. Mutans* a mesma foi dependente da concentração de MMT/CHX, e a zona de inibição no ágar foi influenciada pela presença de CHX, uma vez que grupos contendo apenas MMT não exibiram resultados tão promissores se comparado aos grupos com CHX (14).

Dando continuidade a esta linha de pesquisa, o estudo subsequente com dados ainda não publicados avaliou se a atividade antimicrobiana continua existindo em compósitos com outros tipos de cargas associadas, ou seja, compósitos híbridos, e é possível afirmar que alguns grupos atingiram formação de halos de inibição por até 10 meses de forma consecutiva, e outros chegando a 12 meses não consecutivos e que tanto para o ensaio de biofilme como para halos de inibição parece que as carga vidro de bário e sílica exercem influência sobre a liberação das partículas do complexo MMT/CHX, uma vez que nos grupos em que a carga foi adicionada se mostraram mais estáveis e previsíveis, especula-se que isso se deve a um aumento na rigidez que resulta numa liberação mais lenta da clorexidina.

Estudos de microdureza KNOOP realizados em esmalte e dentina nos permitem avaliar a dureza das superfícies destes e ser comparados por médio de protocolos descritos na literatura no caso da presente pesquisa realizaremos com carga de 25 g que foi aplicada por 10 s (58).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Avaliar a desmineralização *in vitro* do esmalte dental humano através da microdureza Knoop,
- Avaliar as Unidades Formadoras de Colônias.

A hipótese nula do trabalho foi que a desmineralização fosse igual para todos os grupos testados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MANIPULAÇÃO DOS COMPÓSITOS

Foram confeccionados compósitos experimentais com matrizes resinosas à base de Bis-GMA (Sigma-Aldrich) e TEGDMA (Sigma-Aldrich) em proporções iguais em peso. Os compósitos tinham como carga carreadora a montmorilonita organofilizada (Cloisite 30B) com incorporação de clorexidina, e cargas inorgânicas convencionais o vidro de bário e a sílica coloidal. O sistema fotoiniciador utilizado foi composto por amina terciária (Sigma-Aldrich) na concentração de 1% em peso, e canforoquinona (Sigma-Aldrich) na concentração 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 manipulado a matriz orgânica com o auxílio de uma balança analítica (BEL Engineering, Monza, Itália). Para a incorporação da carga foi utilizado um misturador automático à vácuo (SpeedMixer DAC 150 FVZ, Hauschild) por um período de 3 minutos numa velocidade de 3500 rpm.

Afim de verificar a influência da carga inorgânica sobre a liberação da clorexidina foram avaliadas em duas concentrações diferentes, 30 ou 60% em peso, sendo que dessas concentrações a proporção vidro de bário/sílica foram 80/20 e 70/30, compondo os grupos de 1 a 4 conforme detalhado a seguir na tabela 1. Dentre os grupos controle, o grupo 5 da tabela 1 não tinha vidro de bário e sílica coloidal, mas recebeu 5% de MMT/CHX, o 6 não recebeu qualquer tipo de carga, sendo constituído apenas por matriz resinosa e o 7 foi constituído por uma resina comercial (3M™ ESPE™ FILTEK™ Z350 XT Restaurador Universal, Minnesota, EUA), cuja composição é resumida em Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, Bis-EMA, partículas de sílica e zircônia [1].

Ao término da manipulação foram estabelecidos 7 grupos conforme tabela 1 no item 4.2 deste trabalho que foram armazenados em frascos escuros hermeticamente fechados e mantidos sob refrigeração até o momento do uso.

[1] Informações extraídas do perfil técnico da resina.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Sete grupos foram estabelecidos conforme a tabela abaixo:

Tabela 1- Grupos experimentais distribuídos de acordo com as concentrações e proporções determinadas, a matriz orgânica foi a mesma para todos. VB= Vidro de bário, Si= Sílica Coloidal. *Z350- compósito comercial cuja descrição da composição encontra-se no item 4.1

<table>
<tr><th rowspan="2">Grupo</th><th colspan="2">Carga inorgânica</th><th rowspan="2">Carga Bioativa
MMT/CHX
(% em peso)</th><th rowspan="2">Matriz</th></tr>
<tr><th>Concentração
(% em peso)</th><th>Proporção
VB/Si</th></tr>
<tr><td>1</td><td rowspan="2">30</td><td>80/20</td><td rowspan="5">5</td><td rowspan="5">Composição:
Bis-GMA
TEGDMA
Amina terciária
Canforoquinona</td></tr>
<tr><td>2</td><td>70/30</td></tr>
<tr><td>3</td><td rowspan="2">60</td><td>80/20</td></tr>
<tr><td>4</td><td>70/30</td></tr>
<tr><td>5</td><td colspan="2">Nenhuma</td></tr>
<tr><td>6</td><td colspan="2">Nenhuma</td><td>Nenhuma</td><td rowspan="2"></td></tr>
<tr><td>7</td><td colspan="2">Z350-comercial*</td><td>Nenhuma</td><td>Nenhuma</td></tr>
</table>

4.3 PREPARO DAS CAVIDADES E RESTAURAÇÃO

O projeto foi inicialmente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Santo Amaro (CAAE: 58611322.8.0000.0081, ANEXO A), uma vez que dentes humanos foram usados na confecção dos corpos de prova, onde posteriormente foi realizada a restauração com os compósitos descritos no item 4.2.

Mediante aprovação do comitê, 49 amostras (n=7) oriundas de 25 terceiros molares humanos extraídos foram preparadas com auxílio de caneta de alta rotação (NSK Pana-Max PLUS, Japão) e acopladas a ela, pontas diamantadas FG 2131 Cônica e FG 3053 Roda (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) sob constante refrigeração.

Os dentes foram seccionados inicialmente na junção esmalte-cemento, e em seguida as coroas foram seccionadas ao meio no sentido vestíbulo-lingual, de modo que cada dente resultasse em duas amostras (mesial e distal que são as faces mais paralelas e menos convexas). As faces foram ligeiramente planificadas. Com auxílio de uma fita dupla face, os espécimes foram fixados em uma placa de vidro, com a face planificada livre e incluídas em tubos de PVC com 16mm de diâmetro e 8,0mm de altura (Tigre, Bolívia), e o tubo foi completamente preenchido com resina acrílica auto-polimerizável (VIPI, Pirassununga, São Paulo, Brasil). Após a polimerização da resina acrílica, as faces livres do esmalte foram 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), permitindo desta forma o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de PVC no qual foram fixados os espécimes.

Cavidades circulares com diâmetro aproximado de 2,1 mm e profundidade de 2,4 mm foram preparadas na porção central das faces planificadas sob constante refrigeração com ponta diamantada FG 2131 (MICRODONT, São Paulo, SP, Brasil) as quais foram restauradas com um dos 7 compósitos do estudo. As paredes das cavidades foram condicionadas com ácido fosfórico a 37% (Condac, FGM, Joinville, Santa Catarina, Brasil) por 15 segundos e em seguida lavadas também por 15 segundos com seringa tríplice. O excesso de água foi removido com jatos de ar e o sistema adesivo de frasco único (3M™ Adper™ Single Bond 2, Minnesota, EUA) foi aplicado de forma ativa utilizando microbrush, em seguida fotoativados com uma dose de 18J/cm^2 (Radii Plus LED SDI, Southern Dental Industries). Finalmente as cavidades foram restauradas com um dos compósitos e a fotoativação realizada em bloco único com uma dose de também de 18J/cm^2, posteriormente os corpos de prova foram lixados de forma manual com lixa 1200 (Norton, Guarulhos, São Paulo, Brasil) para remoção dos excessos do adesivo e a resina.

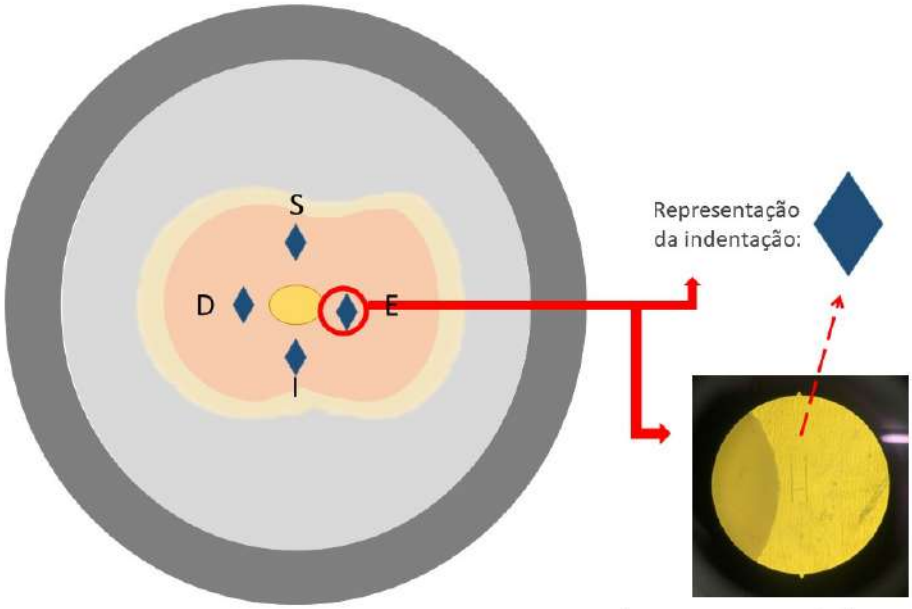
4.4 AVALIAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL

Concluída a etapa de confecção das cavidades e restauração, os corpos de prova foram distribuídos aleatoriamente entre os 7 grupos experimentais. A dureza de superfície inicial foi avaliada aproximadamente 24 horas após a confecção da restauração e a final após 7 dias de biofilme em todos os espécimes com o auxílio do equipamento Microdurômetro (Shimadzu HMV 2T) que possui um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP, com carga de 25 g que foi aplicada por 10 s. A dureza inicial e final foi mensurada em 4 pontos padronizados ao redor da restauração, cerca de 200μ da sua borda (figura 1), sendo que as indentações após 7 dias foram realizadas muito próximo das iniciais, mas não sobre as mesmas. A diferença entre elas foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$X = \frac{(DK_1 - DK_2).100}{DK_1}$$

Onde: X representa a porcentagem de diminuição da microdureza. Dk_1 representa a Dureza inicial. Dk_2 representa a dureza final.

Figura 1- Representação esquemática da indentação em pontos padronizados ao redor da restauração.



Representação esquemática: Face proximal (que coincide com a face mais plana) do terceiro molar.
D: Direita, E: Esquerda, S: Superior/Oclusal, I: Inferior/ cervical

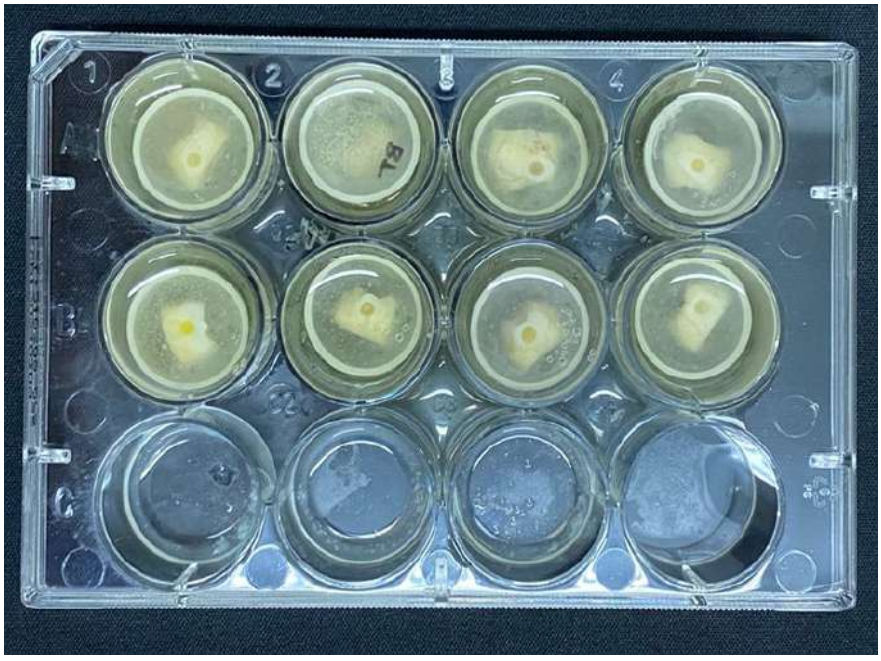
Imagem no momento do ensaio, mostrando a indentação próximo a restauração.

4.5 BIOFILME

A etapa inicial deste ensaio se deu através da reativação da bactéria *S. Mutans* em meio de cultura composto por BHI caldo e glicose a 20%, onde foi incubada em ambiente anaeróbio a 37ºC por 18 horas. Após o período correspondente uma nova solução com BHI caldo e glicose a 20% foi preparada substituindo-se 0,5 mL desta solução pela cultura bacteriana preparada inicialmente, a nova solução também foi incubada sob as mesmas condições que a anterior durante o período de aproximadamente 6 horas, para que a leitura de absorbância no espectrofotômetro corresponda a 0,7. Ao término deste período procedeu-se com o preparo do meio de cultura que foi dispensado nos poços da placa de 12 poços. Este meio foi constituído por BHI caldo, sacarose a 20% e o inóculo bacteriano e finalmente foi dispensado cerca de 2mL por poço onde os espécimes foram posicionados individualmente em cada poço, posteriormente a placa foi fechada e incubada em estufa no ambiente anaeróbio por 24 horas.

No dia seguinte, o meio foi removido dos poços, e substituído por outro meio semelhante ao anterior, distinguindo-se apenas na ausência de bactéria, a placa retornou para estufa em ambiente anaeróbio por mais 24 horas. Essa etapa foi igualmente repetida pelos próximos dias até completar 7 dias de crescimento do biofilme. (Figura 2)

Figura 2-Placa recém removida da estufa para troca do meio de cultura.



Após 7 dias de cultura com o auxílio de uma pinça estéril cada espécime foi removido de seu respectivo poço (Figura 2) e foi imediatamente imerso em solução salina, com o objetivo de remover as bactérias fracamente aderidas. Em seguida o espécime foi colocado em tubo tipo falcon com 5mL de soro estéril (Figura 3), que foi vortexeado e sonicado, para em seguida ser diluído. Deste soro tomou-se uma alíquota de 10 µl e transferiu-se para um eppendorf contendo 990 µl de soro estéril, desta diluição tomou-se uma alíquota de 100 µl e transferiu-se para outro eppendorf contendo 900 µl. A cada repetição deste último processo consegue-se uma diluição 10 vezes maior, assim sendo 8 diluições foram feitas:

- 1:100 = 10^2
- 1:1000 = 10^3
- 1:10000 = 10^4
- 1:100000 = 10^5
- 1:1000000 = 10^6
- 1:10000000 = 10^7
- 1:100000000 = 10^8
- 1:1000000000 = 10^9

Após as 8 diluições foi selecionada a última para realizar o plaqueamento.

Figura 3- Espécime sendo removido com pinça estéril para imersão em salina

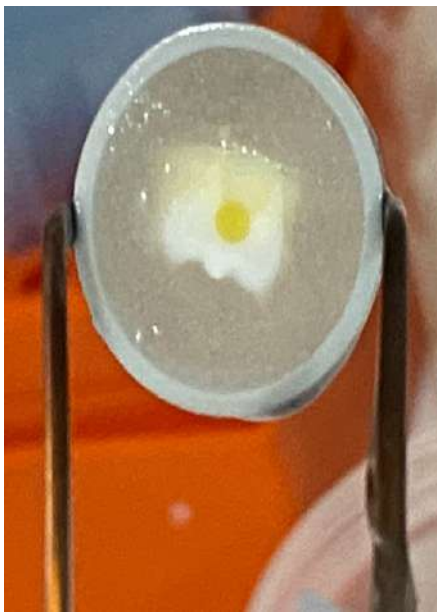
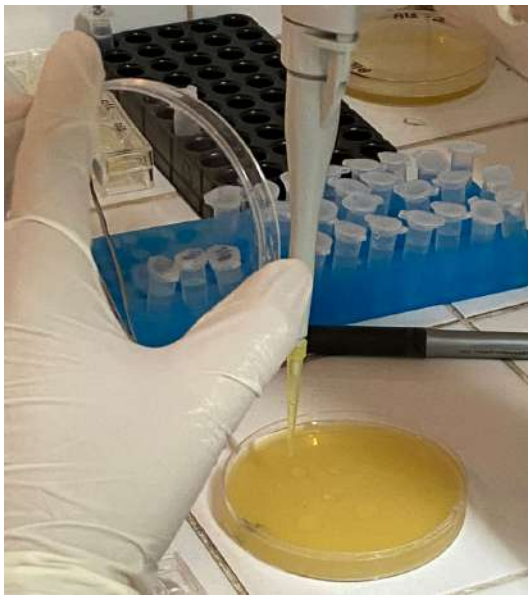


Figura 4- Apreensão do espécime com pinça estéril sendo levado ao tubo de Falcon com 5mL de soro estéril

.

O plaqueamento (Figura 5) é a etapa que consiste na semeadura sobre meio de cultura ágar, essa etapa, assim como as demais foi realizada entre as chamas do bico de Bulsen, onde uma alíquota da diluição foi dispensada sobre a placa de BHI Ágar e espalhada com uma alça Drigalski estéril sobre toda a superfície do ágar, esse procedimento foi repetido para todos os espécimes e as placas foram acondicionadas nas jarras de anaerobiose com gerador ativado e mantidas assim por 48 horas. No último dia do experimento, após as 48 horas, as placas foram retiradas da estufa e a contagem das colônias (UFCs) foi realizada a olho nú.

Figura 5- Plaqueamento, etapa em que a última diluição é semeada no meio de cultura BHI Ágar.



4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando ANOVA de dois fatores (compósito e tempo) para o ensaio de microdureza Knoop e ANOVA de um fator (compósito), para o ensaio de biofilme, e para ambos o teste de Tukey. O nível global de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Na tabela 2 encontramos as médias (desvios-padrão) para os dados de microdureza Knoop, e redução de microdureza (em %) entre inicial e após 7 dias de crescimento de biofilme, de acordo com resultados apresentados todos os grupos foram desmineralizados, notada a menor dureza em todos os espécimes após 7 dias de crescimento do biofilme estatisticamente significante ($p<0,05$). Não houve diferença estatística entre os valores de dureza inicial ($p=0,0530$) e dureza final ($p=0,1470$) entre os diferentes grupos. Onde, a menor redução foi observada no grupo 6 (Grupo sem adição de carga e do complexo MMT/CHX) com 33% e a maior redução observada no grupo 5 (Composto apenas por matriz e 5% do complexo MMT/CHX) com 63%.

A tabela 3 expressa as médias (desvios-padrão) para os dados de unidades formadoras de colônias (UFC/µl), numa diluição de 10^9 , nela podemos observar que embora não exista diferença estatística entre os grupos analisados ($p>0,05$) apenas numericamente existe uma tendência de menor formação de UFCs nos grupos com 60% de cargas convencionais e 5% do complexo MMT/CHX.

O alto valor de 63% na redução apresentado pelo grupo 5 na tabela 2 pode ser correlacionado com a segunda maior média da tabela 3, também apresentada por este mesmo grupo.

Dentre os grupos experimentais de 1 a 4, é possível notar resultados mais previsíveis para os grupos com maior concentração de carga inorgânica tanto para os dados de redução na dureza, quanto para as unidades formadoras de colônia no ensaio do biofilme.

Tabela 2- Médias (desvios-padrão) para os dados de microdureza Knoop, e redução de microdureza (em %) entre inicial e após 7 dias de crescimento de biofilme. Na mesma coluna (ou seja, comparação entre os grupos em um mesmo período), valores seguidos pela mesma letra maiúscula são estatisticamente semelhantes (P>0,05). Na mesma linha (ou seja, comparação entre inicial e 7 dias para um mesmo grupo), valores seguidos pela mesma letra minúscula são estatisticamente semelhantes (P>0,05).

Grupo	Composição				Microdureza Knoop		
	Carga				Inicial	7 dias	Redução
	Quantidade	Proporção	Bioativa	Matriz			
1	30%	80/20	MMT+CHX	Matriz	82,9 (29,4)Aa	51,6 (20,7)Ab	38
2	30%	70/30	MMT+CHX	Matriz	72,5 (26,9)Aa	37,2 (24,3)Ab	51
3	60%	80/20	MMT+CHX	Matriz	56,4 (31,2)Aa	24,21(16,9)Ab	55
4	60%	70/30	MMT+CHX	Matriz	91,8 (50,5)Aa	46,5 (33,9)Ab	53
5	------	------	MMT+CHX	Matriz	84,1 (79,5)Aa	41,1 (48,4)Ab	63
6	------	------	-----	Matriz	95,6 (62,7)Aa	63,3 (44,1)Ab	33
7	Z350				82,4 (52,2)Aa	43,8 (37,7)Ab	52

Tabela 3- Médias (desvios-padrão) para os dados de unidades formadoras de colônias (UFC). Não houve diferença estatística entre os grupos analisados (p>0,05).

Grupo	Composição				UFC 7 dias
	Carga				
	Quantidade	Proporção	Bioativa	Matriz	
1	30%	80/20	MMT+CHX	Matriz	19,0 (23,8)
2	30%	70/30	MMT+CHX	Matriz	28,4 (32,4)
3	60%	80/20	MMT+CHX	Matriz	6,20 (3,3)
4	60%	70/30	MMT+CHX	Matriz	12,0 (9,1)
5	------	------	MMT+CHX	Matriz	22,0 (10,8)
6	------	------	-----	Matriz	19,6 (7,9)
7	Z350				15,0 (16,6)

6 DISCUSSÃO

Foi realizada a leitura da dureza inicial na superfície de esmalte do corpo de prova e a leitura final para observar a desmineralização de forma indireta porque o *Streptococcos Mutans* desmineraliza formando carie dessa forma podemos nos aproximar mas perto da realidade da flora bucal.

Introduzidos na odontologia há mais de 50 anos, os compósitos resinosos já percorreram um extenso caminho visando sua evolução e ainda hoje são alvo de estudos, visto que não existe um único material que combine todas as características e propriedades ideias (21). Tal empenho no avanço desse material é justificado pelo amplo uso entre os clínicos e principalmente por ser indicado em diversas situações para o tratamento da doença que já chegou a afetar 35% da população mundial em 2010: A cárie (50).

A cárie dentária é considerada uma doença evitável, mediada por biofilme que resulta na desmineralização dos tecidos (51), sendo o coco Gram positivo denominado de *Streptococcos Mutans*, a bactéria de grande importância envolvida na formação de biofilmes cariogênicos (52, 53), por esta razão se faz importante o estudo da metodologia para o biofilme e o desenvolvimento de materiais restauradores bioativos.

O encapsulamento e a nanoparticulação são duas estratégias apontadas pela literatura para evitar a liberação excessiva e descontrolada da clorexidina na matriz de resina (27). Sendo o encapsulamento, ou seja, o uso de uma partícula que funcione como um carreador para a clorexidina, uma estratégia muito promissora (12).

Foi nessa mesma perspectiva de partícula “carreadora” que um estudo propôs avaliar a incorporação de MMT/CHX em compósitos e sugeriu através da atividade antimicrobiana expressa pelo compósito que este teria um amplo espectro contra espécies orais, pois demostrou no teste de diluição em ágar, halos de inibição contra *S.Mutans, P. Gingivalis e S. aureus* em todos os grupos experimentais, com tal resultado esperava-se que o compósito pudesse impedir a colonização bacteriana em torno da superfície, entretanto para a formação de biofilme com *S. Mutans* não houve diferença estatística entre resina sem carga bioativa e os grupos com MMT/CHX (14), esses resultados concordam com os nossos, pois embora no presente estudo exista o acréscimo de cargas inorgânicas (vidro de bário e a sílica coloidal), além do complexo MMT/CHX, também não foi observado diferença estatística entre os grupos

controles (compósito comercial e compósito sem qualquer tipo de carga) e os grupos experimentais, a possível explicação para isso reside no fato que monômeros residuais lixiviáveis podem ser citotóxicos (54) e a presença de polímeros com longas cadeias podem causar morte de células (55).

Ainda sobre as unidades formadoras de colônia nota-se que o grupo 5 apresenta a segunda maior média (tabela 3), isso explica a maior redução na dureza encontrada na tabela 2. No referido grupo não houve a incorporação de cargas convencionais inorgânicas, sendo composto apenas por matriz resinosa e partículas de MMT/CHX, isso lhe confere uma matriz polimérica com menor rigidez, pois como se sabe a carga é a responsável por conferir melhores propriedades mecânicas ao compósito (56), com isso supõe-se que a menor rigidez permitiu uma liberação mais rápida e excessiva da clorexidina, assim como descrito por Zhang e colaboradores (12). Já o grupo 2 apresentou o valor mais alto para UFCs, fato que nos chamou atenção, e ao que parece é provável que exista alguma relação com a quantidade de carga, pois ao comparar os grupos experimentais de 1 a 4 sempre que o vidro de bário e a sílica estão em menor concentração (30%), há uma maior tendência para formação de colônias bacterianas, estes resultados também concordam com um outro estudo ainda não publicado desta linha de pesquisa, onde ao avaliar o biofilme apenas nos compósitos os grupos com maior quantidade de carga forneceram resultados mais previsíveis e demonstrou halos de inibição por períodos prolongados.

Estudos mostram que a liberação de clorexidina do compósito é maior nos primeiros dias (12, 49) e em duas semanas pode atingir um platô (49). De acordo com os dados apresentados neste estudo parece muito difícil inibir o crescimento de biofilme em 7 dias somente com compósitos bioativos, ainda que os grupos com 60% de carga tenham apresentado resultados mais promissores, com menor número de unidades formadoras de colônias, é pouco provável que o seu desempenho seja suficiente para impedir lesões de cárie adjacente a restauração.

Com relação ao ensaio de dureza Knoop, ao observar os resultados apontados pela tabela 2, é relevante nos atentarmos sempre a coluna de redução, e não a coluna que compara dureza inicial e final, pois uma falsa impressão de redução ou aumento na dureza pode ser gerada, mas que possivelmente está relacionada a uma menor ou maior mineralização do próprio dente que permitiu a confecção do espécime, e não desencadeada pelo experimento em si.

Em recente estudo com dados ainda não publicados já foi possível observar que a presença de MMT/CHX apenas no adesivo não é eficiente, uma vez que houve uma redução da dureza significativamente maior ou igual para grupos em que o adesivo experimental foi testado com resina comercialmente disponível e com resina experimental sem carga inorgânica, isso nos sugere que a melhor alternativa é ainda a adição dessas cargas em compósitos, e que possivelmente o melhor cenário seria a incorporação das partículas tanto no adesivo quanto no compósito, obtendo assim um efeito sinérgico de ambas aplicações.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo pode-se concluir que não houveram diferenças significativas e que somente os compósitos experimentais não são capazes de reduzir a desmineralização no período de 7 dias.

Nas unidades formadoras de colônias (UFC/µl), observou-se que não existe diferença estatística entre os grupos analisados.

REFERÊNCIAS

1. Askar H, Krois J, Göstemeyer G, Bottenberg P, Zero D, Banerjee A, Schwendicke F. Secondary caries: what is it, and how it can be controlled, detected, and managed?. Clin Oral Investig. 2020 May;24(5):1869-1876. doi: 10.1007/s00784-020-03268-7.

2. Opdam NJ, van de Sande FH, Bronkhorst E, Cenci MS, Bottenberg P, Pallesen U, Gaengler P, Lindberg A, Huysmans MC, van Dijken JW. Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. J Dent Res. 2014 Oct;93(10):943-9. doi: 10.1177/0022034514544217.

3. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem?.Dent Mater. 2015 Nov;31(11):e247-77. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.001.

4. 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 Jan;104:103541. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103541.

5. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. Adv Dent Res. 2018 Feb;29(1):55-59. doi: 10.1177/0022034517740124.

6. Taha AA, Patel MP, Hill RG, Fleming PS. The effect of bioactive glasses on enamel remineralization: A systematic review. J Dent. 2017 Dec;67:9-17. doi: 10.1016/j.jdent.2017.09.007.

7. Alania Y, Natale LC, Nesadal D, Vilela H, Magalhães AC, Braga RR. In vitro remineralization of artificial enamel caries with resin composites containing calcium phosphate particles. J Biomed Mater Res B ApplBiomater. 2019 Jul;107(5):1542-1550. doi: 10.1002/jbm.b.34246.

8. Zhang K, Zhang N, Weir MD, Reynolds MA, Bai Y, Xu HHK. Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. Dent Clin North Am. 2017 Oct;61(4):669-687. doi: 10.1016/j.cden.2017.05.002.

9. Antonucci JM, Zeiger DN, Tang K, Lin-Gibson S, Fowler BO, Lin NJ. Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications. Dent Mater. 2012 Feb;28(2):219-28. doi: 10.1016/j.dental.2011.10.004.

10. Neves JG, Marcato PD, de Paula E Silva FWG, Mantovani CPT, Prado HS, Aires CP, Massaro TNC, Borsato MC. Synthesis and characterization of na experimental primer containing chitosan nanoparticles - Effect on the inactivation of metalloproteinases antimicrobial activity and adhesive strength. Arch Oral Biol. 2021 Jul;127:105148. doi:

10.1016/j.archoralbio.2021.105148.

11. Kasraei S, Sami L, Hendi S, Alikhani MY, Rezaei-Soufi L, Khamverdi Z. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on Streptococcus mutans and Lactobacillus. Restor Dent Endod. 2014 May;39(2):109-14. doi: 10.5395/rde.2014.39.2.109.

12. Zhang JF, Wu R, Fan Y, Liao S, Wang Y, Wen ZT, Xu X. Antibacterial dental composites with chlorhexidine and mesoporous silica. J Dent Res. 2014 Dec;93(12):1283-9. doi: 10.1177/0022034514555143.

13. Yang Y, Xu Z, Guo Y, Zhang H, Qiu Y, Li J, Ma D, Li Z, Zhen P, Liu B, Fan Z. Novel core-shell CHX/ACP nanoparticles effectively improve the mechanical, antibacterial and remineralized properties of the dental resin composite. Dent Mater. 2021 Apr;37(4):636-647. doi: 10.1016/j.dental.2021.01.007.

14. 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. 2019 Jun;35(6):909-918. doi: 10.1016/j.dental.2019.03.004.

15. He H, Yang D, Yuan P, Shen W, Frost RL. A novel organoclay with antibacterial activity prepared from montmorillonite and Chlorhexidini Acetas. J Colloid Interface Sci. 2006 May 1;297(1):235-43. doi: 10.1016/j.jcis.2005.10.031.

16. Wang X, Du Y, Luo J. Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. Nanotechnology. 2008 Feb 13;19(6):065707. doi: 10.1088/0957-4484/19/6/065707.

17. 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. doi: 10.1016/j.msec.2012.10.028.

18. Kelly P, Akelah A, Qutubuddin S, Moet A. Reduction of residual- stress in montmorillonite epoxy compounds. Journal of MaterialsScience. 1994 May: 29(9):2274- 2280. doi: 10.1007/BF00363414

19. Demarco, F.F.,M.B. Correa, M.S.Cenci, R.R.Moraes and N.J.Opdam. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. Dent Mater 2012 Jan; 28(1): 87-101. doi: 10.1016/j.dental.2011.09.003.

20. Rasines Alcaraz, M.G., A. Veitz-Keenan, P. Sahrmann, P.R.Schmidlin, D. Davis and Z. Iheozor Ejiofor. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanente or adult posterior teeth. Cochrane Database Syst Rev. 2014 Mar 31;(3):CD005620. doi: 10.1002/14651858.CD005620.pub2.

21. Ferracane, J.L.. Resin composite—state of the art.Dent Mater.2011 Jan; 27(1):29-38. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.020.

22. Tavaria F, Jorge M, Marchetti G, Souza V, Ruíz AL, Malcata X, Pintado M, Carvalho JE. Wound healing, anti-ulcerogenic, anti-inflammatory and anti-proliferative properties of chitosan. New Biotechnology. 2009;25:S10.

23. Stenhagen ISR, Rukke HV, Dragland IS, Kopperud HM. Effect of methacrylated chitosan incorporated in experimental composite and adhesive on mechanical properties and biofilm formation. Eur J Oral Sci. 2019 Feb;127(1):81-88. doi: 10.1111/eos.12584.

24. Kikuchi LNT, Freitas SRM, Amorim AF, Delechiave G, Catalani LH, Braga RR, Moreira MS, Boaro LCC, Gonçalves F. Effects of the crosslinking of chitosan/DCPA particles in the antimicrobial and mechanical properties of dental restorative composites. Dent Mater. 2022 Jul 11:S0109-5641(22)00199-3. doi: 10.1016/j.dental.2022.06.024.

25. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against Streptococcus mutans. Biomaterials. 2006 Jul;27(21):3995-4002. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.003

26. Zhang N, Ma J, Melo MAS, Weir MD, Bai YX, Xu HHK. Protein repellent and antibacterial dental composite to inhibit biofilms and caries. J Dent. 2015; 43 : 225-234

27. Makvandi P, Gu JT, Zare EN, Ashtari B, Moeini A, Tay FR, Niu LN. Polymeric and inorganic nanoscopical antimicrobial fillers in dentistry. Acta Biomater. 2020 Jan 1;101:69-101. doi: 10.1016/j.actbio.2019.09.025.

28. Thongthai P, Kitagawa H, Kitagawa R, Hirose N, Noree S, Iwasaki Y, Imazato S. Development of novel surface coating composed of MDPB and MPC with dual functionality of antibacterial activity and protein repellency. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2020 Nov;108(8):3241-3249. doi: 10.1002/jbm.b.34661

29. Thongthai P, Kitagawa H, Iwasaki Y, Noree S, Kitagawa R, Imazato S. Immobilizing Bactericides on Dental Resins via Electron Beam Irradiation. J Dent Res. 2021 Sep;100(10):1055-1062. doi: 10.1177/00220345211026569.

30. Zhang D, Li S, Zhao H, Li K, Zhang Y, Yu Y, Yang X, Cai Q. Improving antibacterial performance of dental resin adhesive via co-incorporating

fluoride and quaternary ammonium. J Dent. 2022 Jul;122:104156. doi: 10.1016/j.jdent.2022.104156.

31. Rodrigues MC, Rolim WR, Viana MM, Souza TR, Gonçalves F, Tanaka CJ, Bueno-Silva B, Seabra AB. Biogenic synthesis and antimicrobialactivity of silica-coated silver nanoparticles for esthetic dental applications. J Dent. 2020 May;96:103327. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103327.

32. Su M, Yao S, Gu L, Huang Z, Mai S. Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. Peptides. 2018 Jan;99:189-194. doi: 10.1016/j.peptides.2017.10.003.

33. Bharadwaj RK. Modeling the barrier properties of polymer-layeredsilicate nanocomposites. Macromolecules. 2001 Nov 34(26):9189-9192.

34. Kornmann X, Lindberg H, Berglund LA. Synthesis of epoxy–clay nanocomposites. Influence of the nature of the curing agent on structure. Polymer. 2001 May 42(10):4493-4499. doi:10.1016/S0032-3861(00)00801-6

35. Gilman JW. 1999. Flammability and thermal stability studies of polymer layered-silicate (clay) nanocomposites1this work was carried out by the national institute of standards and technology (nist), an agency of the u.S. Government, and by statute is not subject to copyright in the united states.1. Applied Clay Science. 15(1):31-49.

36. Wang SF, Shen L, Tong YJ, Chen L, Phang IY, Lim PQ, Liu TX. 2005. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: Preparation and characterization. Polymer Degradation and Stability. 90(1):123-131.

37. Khatoon N, Chu MQ, Zhou CH. Nanoclay-based drug delivery systems and their therapeutic potentials. J Mater Chem B. 2020 Aug 26;8(33):7335-7351. doi: 10.1039/d0tb01031f.

38. Campos LMdP, Lugão AB, Vasconcelos MR, Parra DF. 2014. Polymerization shrinkage evaluation on nanoscale-layered silicates: Bis-gma/tegma nanocomposites, in photo-activated polymeric matrices. Journal of Applied Polymer Science. 131(6):n/a-n/a.

39. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. J Dent Res. 1975;54 Spec No B:B57-62. doi: 10.1177/00220345750540022601.

40. Zanatta FB, Rosing CK. Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. Scientific- A. 2007;1(2):35-4

41. Poppolo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. Int Dent J. 2022 Jun;72(3):269-277. doi: 10.1016/j.identj.2022.01.005.

42. Costa EMMB, Barbosa AS, Arruda TA, Oliveira PT, Dametto FR, Carvalho RA, Melo MD. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. J Bras Patol Med Lab 2010;46(3):175-180. doi: 10.1590/S1676-24442010000300004

43. Privitera GP, Costa AL, Brusaferro S, Chirletti P, Crosasso P, Massimetti G, Nespoli A, Petrosillo N, Pittiruti M, Scoppettuolo G, Tumietto F, Viale P. Skin antisepsis with chlorhexidine versus iodine for the prevention of surgical site infection: A systematic review and meta-analysis. Am JInfect Control. 2017 Feb 1;45(2):180-189. doi: 10.1016/j.ajic.2016.09.017.

44. Hosseinalipour M, Javadpour J, Rezaie H, Dadras T, Hayati AN. Investigation of mechanical properties of experimental Bis- GMA/TEGDMA dental composite resins containing various mass fractions of silica nanoparticles. J Prosthodont. 2010 Feb;19(2):112-7. doi: 10.1111/j.1532-849X.2009.00530.x.

45. Habekost LV, Camacho GB, Lima GS, Ogliari FA, Cubas GB, Moraes RR. Nanoparticle loading level and properties of experimental hybrid resin luting agents. J Prosthodont. 2012 Oct;21(7):540-5. doi: 10.1111/j.1532-849X.2012.00867.x.

46. Hook ER, Owen OJ, Bellis CA, Holder JA, O'Sullivan DJ, Barbour ME. Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. J Nanobiotechnology. 2014 Jan 23;12:3. doi: 10.1186/1477-3155-12-3.

47. Mehdawi I, Neel EA, Valappil SP, Palmer G, Salih V, Pratten J, Spratt DA, Young AM. Development of remineralizing, antibacterial dental materials. Acta Biomater. 2009 Sep;5(7):2525-39. doi: 10.1016/j.actbio.2009.03.030.

48. Yang Y, Xu Z, Guo Y, Zhang H, Qiu Y, Li J, Ma D, Li Z, Zhen P, Liu B, Fan Z. Novel core-shell CHX/ACP nanoparticles effectively improve the mechanical, antibacterial and remineralized properties of the dental resin composite. Dent Mater. 2021 Apr;37(4):636-647. doi: 10.1016/j.dental.2021.01.007.

49. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. Dent Mater. 2012 May;28(5):573-83. doi: 10.1016/j.dental.2012.01.006.

50. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. J Dent Res. 2015 May;94(5):650-8. doi: 10.1177/0022034515573272.

51. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. Nat Rev Dis Primers. 2017 May 25;3:17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.

52. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. J Dent Res. 2006 Oct;85(10):878-87. doi: 10.1177/154405910608501002.

53. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. Oral Dis. 2003;9 Suppl 1:16-22. doi: 10.1034/j.1601-0825.9.s1.4.x. PMID: 12974526.

54. Schweikl H, Hiller KA, Bolay C, Kreissl M, Kreismann W, Nusser A, Steinhauser S, Wieczorek J, Vasold R, Schmalz G. Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. Biomaterials. 2005 May;26(14):1713-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.05.025.

55. Murata H, Koepsel RR, Matyjaszewski K, Russell AJ. Permanent, non-leaching antibacterial surface--2: how high density cationic surfaces kill bacterial cells. Biomaterials. 2007 Nov;28(32):4870-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.012.

56. Kim KH, Ong JL, Okuno O. The effect of filler loading and morphology on the mechanical properties of contemporary composites. J Prosthet Dent. 2002 Jun;87(6):642-9. doi: 10.1067/mpr.2002.125179.

57. Perfil técnico resina Z350 [internet].Campinas; 2010. [acesso em 2022 jul 5]. Disponível em: https://multimedia.3m.com/mws/media/656233O/perfil-tecnico-filtek-z350-xt.pdf.

58. Chuenarrom, C., Benjakul, P., & Daosodsai, P. (2009). Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. *Materials Research*, *12*, 473-476.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA

Plataforma Brasil

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 hibridos 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.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo será avaliar a desmineralização do esmalte dentário utilizando compósitos hibridos contendo o complexo MMT/CHX e
carga convencionais de vidro de bário e silica, 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 silica 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 estatistica será realizada de acordo com a normalidade e a homocedasticidade dos dados.

Avaliação dos Riscos e Beneficios:

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.
Beneficios:
Este trabalho não trará beneficio direto ao paciente participante. Este é um estudo laboratorial que testará um novo material que visa diminuir a
incidência de cárie. Os beneficios, 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.

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA

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 Imbuias **CEP:** 02.450-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 17 de Maio de 2022

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

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuias **CEP:** 02.450-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8887 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

ANE**XO B – Declaração para Co- participantes**

DECLARAÇÃO PARA CO-PARTICIPANTES

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

Pesquisador(es) responsável(eis):

Profa. Dra. Letícia Cristina Cidreira Boaro

Instituição Proponente:

Consultório particular da Profa. Dra. Letícia C. C. Boaro, localizado na Rua Suíça, 1169, Santo André, SP.

Declaro ter lido e concordar com o parecer ético emitido pelo CEP da instituição proponente, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

São Paulo, 24 de setembro de 2019

Dra. Leticia C. Cidreira Boaro
Cir. Dentista
CROSP 90341

Letícia Cidreira Boaro

Assinatura e carimbo do responsável institucional da co-partipante

Consultório Odontológico Profa. Dra. Letícia Boaro

CPF: 303.190.458-38

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

Pesquisador responsável: Letícia Cristina Cidreira Boaro

Instituição/Departamento: UNISA – Universidade Santo Amaro

Telefone para contato: (11) 98762-7200

Local da coleta de dados: Consultório particular da Dra. Letícia Boaro
Rua Suíça 1169, Santo André - SP

Prezado(a) Senhor(a):

Sua participação é totalmente **voluntária**. Você está sendo convidado(a) a doar seu dente do siso que seria descartado para a realização de uma pesquisa. O motivo que o(a) Sr(a) foi convidado(a) a fazer parte da pesquisa é que a Universidade Santo Amaro promove além de pesquisas, a assistência à comunidade. Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento; O pesquisador deverá responder a todas as suas dúvidas antes de você se decidir a participar (Garantia de resposta a qualquer dúvida); Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito. Podendo restringir o uso de informações e de procedimentos; Este documento consta de duas vias, sendo que uma delas você levará para casa assinada pelo pesquisador responsável.

1. Objetivo e justificativa do estudo:
Esse estudo tem o objetivo de criar novos materiais para restauração. Para testar se esses materiais realmente aderem ao dente e se eles têm capacidade de prevenir a cárie precisamos de dentes humanos. Assim, os dentes extraídos que seriam descartados podem ajudar no desenvolvimento de novos materiais. Este termo de compromisso livre e esclarecido (TCLE) irá autorizar o uso dos dentes extraídos para esta pesquisa.

2. Os procedimentos a serem utilizados
Os terceiros molares, também conhecido como dentes do siso, muitas vezes não tem espaço para ficarem na cavidade oral e precisam ser extraídos por razões ortodônticas (melhor acomodamento dos dentes na arcada). Sendo assim, os dentes que tiverem indicações de extração, serão removidos sob anestesia local, e em seguida armazenados em água destilada para que possam ser utilizados posteriormente. No laboratório, os dentes serão restaurados e testados para verificar se o novo material que está sendo desenvolvido é eficaz.

3. Os desconfortos ou riscos esperados
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.
Caso sinta qualquer tipo de constrangimento deverá informar imediatamente ao pesquisador.

4. Os benefícios que se pode obter
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.

5. Garantia de Privacidade

É garantido o sigilo das informações pessoais dos pacientes envolvidos neste projeto. Os dados obtidos na parte experimental serão analisados, comparados e publicados, porém, em nenhum momento iremos divulgar a identificação dos pacientes participantes. A concordância em participar deste estudo não implica em qualquer modificação nos tratamentos realizados de rotina, nenhum material novo está sendo **testado no paciente**. Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido e não acarretará nenhum prejuízo para o paciente.

6. Compromisso com informação atualizada do estudo

Caso tenha interesse nos resultados da pesquisa poderá ligar no telefone disponibilizado ou acessar o currículo lattes do pesquisador.

Eu, ...(paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação sobre os procedimentos a serem realizados e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A Dra. Leticia Boaro (pesquisador responsável) certificou-me de que todos os dados desta pesquisa, bem como o tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

Autorizo o descarte do material coletado que não tenha sido utilizado nesta pesquisa
( ) sem que haja um novo contato comigo
( ) desde que haja um novo contato comigo

Forma de contato com o paciente:
Telefone residencial: ( ) _____
Telefone celular: ( ) _____
Email: _____
Endereço residencial: _____

Nome completo da paciente ou representante legal	
Assinatura da paciente ou representante legal	
RG:	
Local e data:	
Nome completo da testemunha *:	
Assinatura:	
RG:	
Local e data:	
* Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.	

Somente para o responsável do projeto

Declaro que obtivemos de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Pesquisadora responsável	Letícia C. C. Boaro
RG:	20.202.203-1
Assinatura:	
Local e data:	

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro
Rua Professor Enéas de Siqueira Neto, 340
Tel.: (11) 2141-8502