



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

TABATHA MARINA TREVIZOR GARCIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE DIACETATO DE CLOREXIDINA NA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E PROPRIEDADES FÍSICAS DE UM
SELANTE RESINOSO DE FÓSSULAS E FISSURAS**

Piracicaba

2018

TABATHA MARINA TREVIZOR GARCIA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE DIACETATO DE CLOREXIDINA NA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E PROPRIEDADES FÍSICAS DE UM
SELANTE RESINOSO DE FÓSSULAS E FISSURAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestra em Materiais Dentários.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Tabatha Marina Trevizor Garcia e orientada pela profa. Dra. Fernanda Miori Pascon

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

G165e Garcia, Tabatha Marina Trevizor, 1993-
Efeito da adição de diacetato de clorexidina na atividade antibacteriana e propriedades físicas de um selante resinoso de fôssulas e fissuras / Tabatha Marina Trevizor Garcia. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Fernanda Miori Pascon.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Clorexidina. 2. Selantes de fossas e fissuras. 3. Microscopia eletrônica de varredura. 4. Dureza. I. Pascon, Fernanda Miori, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of chlorhexidine diacetate in antibacterial activity and physical properties of a resin pit and fissure sealant

Palavras-chave em inglês:

Chlorhexidine

Pit and fissure sealants

Scanning electron microscopy

Hardness

Área de concentração: Materiais Dentários

Titulação: Mestra em Materiais Dentários

Banca examinadora:

Fernanda Miori Pascon [Orientador]

Fabiana Mantovani Gomes França

Mário Alexandre Coelho Sinhoreti

Data de defesa: 23-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Materiais Dentários



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2018, considerou a candidata TABATHA MARINA TREVIZOR GARCIA aprovada.

PROF^ª. DR^ª. FERNANDA MIORI PASCON

PROF^ª. DR^ª. FABIANA MANTOVANI GOMES FRANÇA

PROF. DR. MÁRIO ALEXANDRE COELHO SINHORETI

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à DEUS, fonte de inspiração divina, a quem devo tudo que sou.

Aos Meus Pais, Claudinei Garcia e Melissa Cláudia Trevizor Garcia, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora terminou, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem.

Ao meu marido, Felipe Matheus, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Por tudo, a minha enorme gratidão!

AGRADECIMENTOS

O espaço limitado desta seção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu mestrado me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação acadêmica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Diretor Professor Doutor Guilherme Elias Pessanha Henrique e Diretor Associado Professor Doutor Francisco Haiter Neto, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha dissertação e por permitir a minha integração num centro de investigação de tão elevada qualidade e exigência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, importante para a conclusão desse trabalho.

À Professora Doutora Cinthia Pereira Machado Tachoury, Coordenadora Geral dos cursos de Pós-Graduação, e aos funcionários da Coordenadoria de pós-graduação Ana Paula Carone, Claudinéia Prata Pradella, Érica A. Pinho Sinhoreti, Leandro Viganó e Raquel Q. Marcondes Cesar, pela ajuda e profissionalismo.

À Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Materiais Dentários, Professora Doutora Regina Maria Puppin Rontani, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Mestrado que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação acadêmica e científica.

À Professora Doutora Fernanda Miori Pascon, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a confiança que em mim depositou, desde o início, e o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do projeto.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Materiais Dentários, Prof. Dr. Américo Bortolazzo Correr, Profa. Dra Fernanda Miori Pascon, Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, Prof. Dr. Mario Alexandre Coelho Sinhoreti, Prof. Dr. Mario Fernando de Goes, Profa. Dra. Regina Maria Puppim-Rontani, Prof. Dr. Simonides Consani, Profa. Dra. Ana Rosa Costa Correr, Profa. Dra. Andreia Bolzan de Paula, Prof. Dra. Carmem Silvia Costa Pfeifer, Prof. Dr. Marcelo Giannini e Prof. Dr. Rafael Leonardo Xediek Consani, por todos os preciosos ensinamentos, aulas, seminários e discussões em grupo, essenciais para minha formação e evolução durante o mestrado.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial ao Professor Doutor Rafael Nobrega Stipp, pela disponibilização dos laboratórios para a realização dos experimentos desse trabalho, e pela orientação nos ensaios microbiológicos.

À Professora Doutora Vânia Célia Vieira de Siqueira, por todo o ensinamento, amizade e momentos de descontração nas aulas de Oratória. Certamente, essas aulas foram muito importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Engenheiro Marcos Blanco Cangiani, funcionário do laboratório de Materiais Dentários, pela colaboração nos ensaios laboratoriais, e à Selma A. Barbosa Segalla, secretária da área de Materiais Dentários, por toda ajuda e apoio.

Ao Adriano Luis Martins, do Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da FOP/UNICAMP, por estar sempre à disposição para ensinar.

Aos colegas de mestrado, Mariana Vianna Vercellino, Ronaldo de Araújo Júnior, Vinícius Barçal Cavalcante da Silva, Lincoln Pires Silva Borges, Jessica Rodrigues Camassari, Lucas de Oliveira Tomaselli, Eduardo Fernandes de Castro e Robson Ferraz de Oliveira, pelo companheirismo, ensinamento e ajuda durante esse tempo.

Aos amigos, Letícia Durante e Lucas do Amaral Colombo, por todo o carinho e amizade, desde a graduação. Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, pelos intermináveis desabafos e pela partilha de bons e maus momentos. Vocês foram muito importantes na realização desta dissertação e me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de diacetato de clorexidina (CHX) na atividade antibacteriana, microdureza e propriedades de superfície (rugosidade e morfologia) de um selante de fósulas e fissuras. Espécimes dos materiais seladores (2mm de espessura x 6mm de diâmetro) foram preparados de acordo com os grupos: Selante resinoso (Fluroshield®) (controle - S), S + 0,1% de CHX (SC1) e S + 0,2% de CHX (SC2). Após a adição de CHX, o material foi homogeneizado, inserido em matrizes e fotoativados seguindo as recomendações do fabricante. Para o ensaio de *Pour Plate* (n=9) os espécimes foram esterilizados em luz ultravioleta por 30 minutos e colocados em placas contendo ágar e *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Os halos de inibição foram mensurados com paquímetro digital (em mm). Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) (n=9), as cepas do *S. mutans* foram ajustadas para a absorbância de 0,08 a 0,10 A e 625 nm em espectrofotômetro. Cada espécime foi colocado em tubo falcon contendo diferentes volumes do meio de cultura com as cepas de *S. mutans*. Os volumes foram: 5 ml, 10 ml, 20 ml e 40 ml. Portanto, a diluição começou com a maior concentração de CHX, diminuindo progressivamente a concentração antimicrobiana na mistura. As culturas foram realizadas em câmara anaeróbica a 37°C. O crescimento de microrganismos foi examinado após 24h. Os testes de *Pour Plate* e MIC foram realizados em triplicata. Para determinação da rugosidade (n=21) utilizou-se 0,25mm de *cut off* e velocidade de 0,1mm/s e para a microdureza de superfície (n=21) foram realizadas 3 medidas em cada espécime e utilizou-se carga de 50g/5s. Foram realizadas imagens representativas da morfologia de superfície em microscopia eletrônica de varredura, com aumentos de 35x e 500x. Os resultados obtidos no ensaio de *Pour Plate* e nos testes de microdureza e rugosidade foram submetidos aos testes Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey ($\alpha=5\%$). Os dados obtidos após a determinação da MIC e microscopia eletrônica de varredura foram analisados de forma descritiva. Foi observada menor atividade antibacteriana para S ($3,45 \pm 1,94$) com diferenças significativas para os SC1 ($10,77 \pm 0,32$) e SC2 ($10,26 \pm 0,45$) ($p < 0,05$). O grupo SC2 apresentou maior inibição com a menor diluição (5ml). Para a rugosidade, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p=0,32$). Para a dureza, observou-se diferença significativa entre SC1 ($29,26 \pm 4,44$) e SC2 ($24,87 \pm 2,75$) ($p < 0,05$) e ambos os grupos não diferiram do controle ($p > 0,05$). Assim como a rugosidade, a morfologia de superfície não apresentou alterações morfológicas significativas entre os grupos. Concluiu-se que adição de diferentes concentrações de CHX a um selante de fósulas e fissuras aumentou atividade antibacteriana do material e não reduziu

as propriedades físicas avaliadas. O presente estudo sugeriu que a concentração de 0,1% de CHX adicionada ao selante de fósulas e fissuras seria a mais indicada por apresentar ação antibacteriana e não alterar negativamente as propriedades físicas avaliadas no presente estudo.

Palavras-chave: Clorexidina, Dureza, Microscopia Eletrônica de Varredura, Selante de fossas e fissuras.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of the addition of chlorhexidine diacetate (CHX) on the antibacterial activity, hardness and physical properties (roughness and surface morphology) of a sealant of pit and fissures. Specimens of the sealants (2mm thick x 6mm diameter) were prepared according to the following groups: resinous sealant (Fluroshield®) (S-control), S + 0.1% CHX (SC1) and S + 0.2 % CHX (SC2). After addition of CHX, the material was homogenized, inserted into matrices and photoactivated following the manufacturer's recommendations. For the Pour Plate assay (n=9) the specimens were sterilized in ultraviolet light for 30 minutes and placed on plates containing agar and *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Inhibition halos were measured with digital caliper (in mm). For determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (n=9), strains of *S. mutans* were adjusted for absorbance of 0.08 to 0.10 A and 625 nm in spectrophotometer. Each specimen was placed in a falcon tube containing different volumes of the culture medium with *S. mutans* strains. The volumes were: 5 ml; 10 ml; 20 ml; and 40 ml. Therefore, the dilution started with the highest concentration of CHX, progressively decreasing the antimicrobial concentration in the mixture. Cultures were performed in anaerobic chamber at 37 °C. The growth of microorganisms was examined after 24h. The Pour Plate and MIC tests were performed in triplicate. To determine the roughness (n=21), a cut-off of 0.25mm and a velocity of 0.1mm/s was used for the surface hardness (n=21). Three measurements were taken in each specimen and 50g/5s. Representative images of the surface morphology were obtained in scanning electron microscopy, with increases of x35 and x500. The results obtained in the Pour Plate test and microhardness and roughness tests were submitted to the Shapiro-Wilk, ANOVA and Tukey tests ($\alpha = 5\%$). The data obtained after MIC determination and scanning electron microscopy were analyzed in a descriptive way. Lower antibacterial activity was observed for S (3.45 ± 1.94) with significant differences for SC1 (10.77 ± 0.32) and SC2 (10.26 ± 0.45) ($p < 0.05$). The SC2 group presented higher inhibition with the lowest dilution (5 ml). For the roughness, no significant differences were observed between the groups ($p=0.32$). For the hardness, a significant difference was observed between SC1 (29.26 ± 4.44) and SC2 (24.87 ± 2.75) ($p < 0.05$) and both groups did not differ from the control ($p > 0.05$). As with the roughness, the surface morphology did not show significant morphological alterations between the groups. It was concluded that addition of different concentrations of CHX to a sealant pits and fissures of the material increased antibacterial activity and did not reduce the measured physical properties. This study also suggested that

the concentration of 0.1% CHX added to pits and fissure sealant would be most suitable for presenting antibacterial action and not negatively altered physical properties evaluated in the present study.

Key words: Chlorhexidine, Hardness, Scanning Electron Microscopy, Pit and Fissure Sealants

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 <i>Delineamento experimental</i>	30
4.2 <i>Adição de CHX ao selante de fósulas e fissuras</i>	32
4.3 <i>Preparo dos espécimes</i>	32
4.4 <i>Microrganismos e testes de susceptibilidade microbiana</i>	33
4.4.1 <i>Ensaio de Pour Plate</i>	34
4.4.2 <i>Ensaio de Concentração Mínima de Inibição (MIC)</i>	35
4.5 <i>Avaliação da rugosidade de superfície</i>	36
4.6 <i>Avaliação da microdureza de superfície</i>	37
4.7 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	37
4.8 <i>Análise estatística</i>	37
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária continua a ser a condição crônica mais comum entre crianças e adolescentes com idade entre 5 a 17 anos em todo o mundo (Ribeiro et al., 2017). Possui etiologia multifatorial, que depende da interação de fatores relacionados ao hospedeiro, especialmente uma dieta rica em carboidratos fermentáveis e a presença de microrganismos cariogênicos (Thylstrup, 1998). *S. mutans* é conhecido por ser uma das bactérias mais prevalentes na flora oral humana, e é amplamente reconhecida como agente etiológico principal da doença cárie (Burne, 1998; Cornejo et al., 2013).

Observou-se uma diminuição da prevalência da cárie dentária, devido, principalmente, ao uso, em larga escala, de compostos fluoretados presentes em dentifrícios e água de abastecimento público (Pardi, 2014). No entanto, a literatura demonstra que a superfície oclusal é a que apresenta maior incidência de lesões de cárie (Pardi, 2014). Estudos demonstram que apesar da superfície oclusal representar apenas 12,5% da área do dente, esta é responsável por cerca de 56 a 70% da experiência de cárie de crianças e jovens entre 5 e 17 anos (Kaste et al., 1996; Meneghim et al., 1999). Assim, métodos preventivos específicos para essa superfície devem ser implantados (Pardi, 2014).

Os locais mais propícios para o desenvolvimento das lesões cariosas são as regiões interproximais, margem gengival e superfícies oclusais de dentes posteriores, locais de maiores depósitos bacterianos (Fejerskov et al., 2005). Dessa forma, além da instituição de medidas preventivas, analisando o risco à cárie do paciente, o uso de selantes de fóssulas e fissuras tem demonstrado grande eficácia na prevenção do aparecimento de lesões, principalmente quando aplicados em molares e pré-molares recém irrompidos (Mejàre et al., 2003).

Os selantes aplicados sobre as fóssulas e fissuras atuam como uma barreira mecânica para microrganismos e alimentos (Wright et al., 2016). Esse material pode ser à base de resina (selantes resinosos) ou à base de ionômero de vidro (selantes ionoméricos) (Wright et al., 2016). Uma revisão sistemática da literatura verificou que crianças e adolescentes que receberam selantes em superfícies oclusais de molares decíduos ou permanentes apresentaram uma redução de 76% no risco de desenvolver novas lesões cariosas após dois anos de acompanhamento, em comparação com crianças que não receberam tratamento com selantes, e que, mesmo após 7 anos ou mais de acompanhamento, crianças e adolescentes que passaram por esse tratamento apresentaram incidência de cárie de 29%, enquanto que aqueles sem tratamento apresentaram incidência de 74% (Wright et al., 2016). O sucesso do tratamento com selantes de fóssulas e fissuras está relacionado à adaptação marginal do material, o que é

importante para que o mesmo seja efetivo na prevenção da cárie (Pardi, 2014). A capacidade de selantes de fósulas e fissuras para prevenir as cáries de fissuras é também relacionada à adaptação dos selantes, em que falhas na adaptação ou perdas parciais podem levar à infiltração marginal, isto é, a passagem de microrganismos, fluídos, moléculas ou íons entre a parede cavitária e o material restaurador (Kidd, 1976; Puppini-Rontani et al, 2006), o que pode propiciar o desenvolvimento e progressão da lesão cariosa.

Além do uso de materiais seladores, outra maneira de auxiliar o controle do biofilme dentário é com a utilização de agentes antimicrobianos, como a clorexidina (CHX). Este agente tem sido utilizado em várias formas de apresentação como enxaguatórios bucais, géis, espumas e vernizes (Autio-Gold, 2008). Diante dos efeitos que agentes antimicrobianos poderiam exercer quando associados a materiais restauradores, ou seja, diminuir ou impedir a adesão de biofilme na superfície da restauração e inibir o crescimento de colônias bacterianas na interface dentária ou da restauração (Imazato, 2003), estudos tem sido conduzidos com a intenção de adicionar agentes antimicrobianos a diversos materiais odontológicos (Li et al., 2011; Inagaki et al., 2016; Benetello, 2016).

Estudos anteriores demonstraram a eficácia antibacteriana contra *S. mutans* e *L. acidophilus* de baixas concentrações de clorexidina (0,1% e 0,2%) em infiltrantes experimentais sem afetar negativamente nas propriedades dos materiais como grau de conversão e dureza Knoop (Inagaki et al., 2016). Em outro estudo, Inagaki et al. (2016) incorporaram as mesmas concentrações de diacetato de CHX a misturas resinosas experimentais e avaliaram sorção e solubilidade, amolecimento, resistência flexural e módulo de elasticidade das misturas monoméricas. Os resultados mostraram que as características dos monômeros químicos têm mais influência nas características físicas dos materiais experimentais do que o aditivo do antimicrobiano, e que as adições de 0,1% e 0,2% de CHX não interferiram nas propriedades físico-químicas avaliadas na maioria das misturas experimentais.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Benetello (2016), ao incorporar 0,1% e 0,2% de clorexidina a um infiltrante comercial e avaliar atividade antibacteriana e propriedades físicas dos grupos experimentais e controle. Deste estudo concluiu-se que os grupos com adição de CHX, independente da concentração, apresentaram atividade antibacteriana satisfatória, e apresentaram diminuição da biodegradação superficial. Além disso, mantiveram ou melhoraram as propriedades físico-químicas do material. Já Nojosa (2014) avaliou o efeito da incorporação de CHX nas concentrações 1% e 2% em forma livre e 5% e 10% encapsulada em micropartículas poliméricas, nas propriedades físico-químicas de

selantes resinosos e observou que diferentes formas de CHX afetaram o grau de conversão dependendo do tipo de selante utilizado.

Diante da literatura observa-se que a adição de agentes antimicrobianos aos materiais resinosos poderia diminuir ou controlar a adesão de biofilme na superfície do material e assim evitar novos episódios de desmineralização dos tecidos dentários (Yoshida et al., 1999; Bürgers et al., 2009; de Fúcio et al., 2009; Aydin Sevinç e Hanley, 2010). Além disso, poderia aumentar a efetividade dos selantes de fóssulas e fissuras quanto à atividade antibacteriana, principalmente em relação aos microrganismos cariogênicos residuais presentes nas fóssulas e fissuras. Ainda, sabendo que pode haver falhas ou perdas parciais do material selador, que poderia levar a um insucesso clínico, a adição de um antibacteriano poderia ter um efeito protetor da estrutura dentária mesmo quando o selante encontra-se quebrado ou com defeitos e bolhas (Pereira, 2015). Entretanto, ainda há lacunas no conhecimento em relação à adição de CHX, seja em baixas ou altas concentrações, e os efeitos em propriedades antibacterianas e físicas, como dureza e rugosidade dos selantes de fóssulas e fissuras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Evidências científicas demonstram que a cárie é uma doença multifatorial sacarose-biofilme-dependente, e que para o início e desenvolvimento da mesma é necessária à presença de fatores negativos como a sacarose; fatores essenciais como o biofilme e fatores determinantes, como interação entre hospedeiro, dieta, biofilme e tempo. Além disso, sabe-se que fatores sociais, econômicos e comportamentais podem influenciar no processo de desenvolvimento da doença (Fejerskov e Kidd, 2003; Tenuta e Cury, 2005; Sheiham e James, 2015).

Desde a década de setenta observa-se declínio na incidência e prevalência da cárie em crianças e adolescentes e que os principais responsáveis por esse declínio estão relacionados à mudança nos hábitos de higiene oral e uso diário de fluoretos (Dorantes et al., 2005). Dessa forma, o fluoreto é considerado um fator positivo para a prevenção da doença. A eficácia dos fluoretos para redução da cárie é indiscutível, porém, essa eficácia se refere principalmente as superfícies lisas, como as faces vestibulares e linguais, sendo que as áreas de cúspide e incisal dos dentes são desprovidas do acúmulo bacteriano por estarem continuamente expostas ao desgaste mecânico e cisalhamento durante a função oral.

Já as faces proximais e superfícies oclusais apresentam maior susceptibilidade de ocorrer depósitos bacterianos, tornando-se assim mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões cariosas (Thylstrup, 1998; Fejerskov et al., 2005). Além disso, a profundidade e forma das fissuras oclusais são fatores relevantes para o depósito de biofilme, dificuldade para realização remoção mecânica do mesmo e desenvolvimento de lesões nesta superfície (Jodkowska, 2008; Carvalho, 2014). Ainda, fatores como a falta de acesso da saliva no interior da fissura podem contribuir para alta prevalência de cárie nas superfícies oclusais, as quais representam mais de 80% da prevalência de lesões em dentes permanentes jovens (Feigal e Donly, 2006).

Dessa maneira, para auxiliar na prevenção do desenvolvimento das lesões de cárie nestas superfícies, materiais seladores de fóssulas e fissuras tem sido amplamente utilizados desde a proposição por Bowen na década de 50 e a partir de então, amplamente recomendados (Lavonius et al., 2002, Simecek et al., 2005). A principal indicação para aplicação de selantes e os mais beneficiados são pacientes (crianças) de alto risco à cárie e em idade escolar. Assim, para a prevenção de cárie a utilização de selantes de fóssulas e fissuras de molares e pré-molares recém-irrompidos é uma estratégia eficaz (Mejàre et al., 2003; Martignon et al., 2006). Evidências sugerem que a aplicação dos selantes é eficaz na prevenção da cárie em

crianças e adolescentes, quando se comparou a não aplicação do material e que isso pode estar relacionada também a prevalência de cárie na população (Ahovuo-Saloranta et al., 2017).

Historicamente, Eklund e Ismail (1986), com base nos dados na Primeira Pesquisa Nacional de Exames de Saúde e Nutrição (da sigla, em inglês NHANES I), conduzida entre 1971 e 1974, e dos Componentes de Saúde e Nutrição Hispânica e Pesquisa de Exame Nutricional (da sigla em inglês HHANES), conduzida entre os anos de 1982 a 1984, ambos sob direção do Centro Nacional de Estatísticas em Saúde (NCHS) verificaram que aproximadamente 70% de todas as superfícies oclusais dos molares tornavam-se cariadas em 10 anos, e uma alta taxa dessas lesões ocorriam nos primeiros 3 anos após a erupção dos dentes. Nestes estudos, mais de 27.000 pessoas com idade entre 6 meses a 74 anos de vida foram examinadas em ambos os programas. Os dados foram compilados de acordo com cada superfície, dente e faixa etária envolvidas na pesquisa. Analisando esses dados, os autores concluíram que a cárie ou restaurações poderiam ser evitadas em pelo menos 50% dos casos em molares permanentes, e 10% no caso dos pré-molares permanentes, caso esses dentes fossem submetidos ao selamento das fóssulas e fissuras. Além disso, esses dados apoiaram a política da *Council of Dental Research*, de que selantes deveriam ser universalmente aplicados, principalmente em molares, nos primeiros 3 anos de erupção (Eklund e Ismail, 1986).

Desde então, os selantes tem sido usados na odontologia. O método foi introduzido no final da década de 1960 e a primeira geração de selantes, à base de resina composta, era polimerizada utilizando luz ultravioleta (UV). A segunda geração era polimerizada por meio de reação química; a terceira por meio de luz visível e a quarta geração apresenta a capacidade de liberação de flúor. A técnica consiste na aplicação de uma fina camada do selante nas fóssulas e fissuras após condicionamento ácido prévio da superfície de esmalte, sendo uma técnica sensível devido à possibilidade de contaminação com saliva após o condicionamento ácido (Mejare et al., 2003).

Conforme dito anteriormente, as taxas de incidência/prevalência de cárie diminuíram desde a década de 1970. Portanto, o custo-benefício do tratamento com selantes sofreu uma redefinição, baseando-se no risco e atividade de cárie apresentado pelos pacientes. Assim, perspectiva é de que os selantes sejam indicados para àqueles pacientes de alto risco à carie, e não a todos os pacientes indiscriminadamente (Feigal e Donly, 2006).

A principal finalidade dos materiais seladores está relacionada à proteção que estes materiais proporcionam às superfícies oclusais, compostas de fendas, muitas vezes profundas que colaboram para o acúmulo de restos alimentares e biofilme e impedem que as cerdas da

escova os removam adequadamente. Os selantes são materiais plásticos, geralmente a base de bisfenol glicidil-dimetacrilato (BIS-GMA), os quais penetram nas fóssulas e fissuras, formando uma barreira mecânica, protegendo o esmalte do acúmulo do biofilme e dos ácidos provenientes deste.

Puppini-Rontani et al. (2006) avaliaram a efetividade e retenção após 24 meses de compômeros e selantes de fóssulas e fissuras. O estudo avaliou 57 crianças com idade entre 7 a 9 anos. As crianças apresentavam alto risco de cárie e todos os primeiros molares permanentes irrompidos, totalizando 228 dentes. Os 228 dentes foram divididos em 2 grupos, de acordo com os materiais estudados, sendo que os dentes do grupo I foram selados utilizando um material selante resinoso e os do grupo II foram selado usando um compômero. A retenção do material foi avaliada após 6, 12 e 24 meses sendo classificada como retenção total, parcial ou perda total usando um método tátil-visual. A incidência de cárie também foi avaliada. Os pesquisadores concluíram que, durante o período de acompanhamento, ambos os materiais impediram efetivamente o desenvolvimento da lesão em superfícies oclusais, embora ambos tenham apresentado baixas taxas de retenção.

Amin (2008) comparou a taxa de retenção, efeitos preventivos e efeitos antibacterianos de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, de compósitos restauradores de baixa viscosidade e de selantes resinosos como materiais seladores de fóssulas e fissuras. No estudo foram incluídas 45 crianças livres de cárie com idades entre 7 a 10 anos. As crianças foram divididas em 3 grupos diferentes (n=15), de acordo com o tipo de selante a ser utilizado. O primeiro grupo foi tratado com um selante resinoso convencional, que foi considerado o grupo controle positivo. O segundo grupo foi tratado com cimento de ionômero de vidro modificado por resina fotoativada e o terceiro grupo recebeu tratamento com resina composta de baixa viscosidade. Os materiais foram aplicados de acordo com as recomendações dos fabricantes. A retenção dos materiais foi avaliada após 1 mês, 6 meses, 1 ano e 2 anos após a aplicação do selante e os resultados foram classificados em três grupos: totalmente presente (quando o selante ainda estava em boas condições); perda parcial (quando uma parte das fóssulas e fissuras estava expostas); e perda total (completa perda do selante). A quantidade de *S. mutans* também foi mensurada em amostras de saliva de cada paciente 1 dia após a aplicação do selante e posteriormente nos tempos de 6 meses, 1 ano e 2 anos. Os resultados desse estudo indicaram uma baixa retenção para o cimento de ionômero de vidro modificado por resina comparado com a resina composta de baixa viscosidade e o selante resinoso e que não houve diferença significativa na prevenção de cáries ou na inibição bacteriana em longo prazo.

Beun et al. (2012) estudaram as propriedades físicas, mecânicas e reológicas de selantes resinosos comparados com resinas de baixa viscosidade para o selamento de fósulas e fissuras. Foram avaliadas oito resinas de baixa viscosidade e quatro selantes resinosos disponíveis no mercado, quanto à porcentagem e morfologia da fração inorgânica, módulo de elasticidade, módulo estático e resistência flexural, microdureza Vickers e propriedades reológicas. Os autores concluíram que, uma vez que o selamento preventivo de fósulas e fissuras não exige um material com altas propriedades mecânicas, o uso de materiais especialmente projetados para esse fim parece totalmente adequado, e que, apesar dos materiais classificados como resinas de baixa viscosidade tenham propriedades mecânicas superiores aos dos selantes resinosos, devido a sua maior quantidade de carga, esses materiais podem ter diferentes viscosidades que podem interferir em sua capacidade de escoamento para dentro das fósulas e fissuras, tornando-os inadequados.

Deste modo, os selantes resinosos demonstram alta taxa de sucesso na prevenção da cárie, mas o sucesso também depende da retenção dos materiais utilizados, sendo recomendados pela *American Academy of Pediatric Dentistry* (AAPD) para dentes decíduos ou permanentes após avaliação do risco à cárie do paciente (AAPD, 2017-2018). No entanto, cárie secundária pode se formar em torno do selamento e nas fissuras, na interface material-dente, devido à perda parcial do material ou à microinfiltração induzidas pela contração de polimerização. O flúor liberado a partir de selantes de fósulas e fissuras pode impedir a formação de cáries, aumentando a remineralização e inibindo o metabolismo microbiano. Entretanto, em longo prazo, verificou-se que não houve diferença significativa nos resultados entre os selantes de fósulas e fissuras que contêm fluoreto quando comparado aos que não tem fluoreto, devido ao curto período de liberação de flúor (Itota et al., 2004).

Assim como os compósitos, os materiais seladores de fósulas e fissuras estão sujeitos à degradação pelo ambiente bucal e à falha (Martin et al., 2013). Assim, as propriedades físico-mecânicas desses materiais, bem como a capacidade antimicrobiana ainda precisam ser melhoradas, havendo a necessidade do desenvolvimento de novos materiais que não somente apresentem estabilidade e boas propriedades físicas, mas também propriedades antibacterianas contra os microrganismos orais, como por exemplo, o *S. mutans* (Jandt e Sigusch, 2009), principal microrganismo presente no biofilme dental.

O biofilme dental é composto por restos alimentares e bactérias colonizadoras da microbiota dental. Quando as bactérias começam a crescer, sem que ocorra a desorganização mecânica do biofilme, a falta de oxigênio favorece gradualmente o crescimento de bactérias anaeróbicas. Na ausência do oxigênio, a glicose pode ser quebrada apenas para o ácido lático

ou etanol, os produtos finais da glicose anaeróbica. Ou seja, a produção de energia das bactérias anaeróbicas, que são dominantes na placa dental cariogênica, resulta na produção de ácido que dissolve o esmalte subjacente (Thylstrup, 1998). *S. mutans* é considerado a espécie mais importante da microbiota humana, e é amplamente associada como principal causadora de cárie dentária (Loesche, 1986).

de Fúcio et al. (2009) caracterizaram quantitativamente e qualitativamente o arranjo arquitetônico de microrganismos em biofilme, desenvolvidos na superfície de diferentes materiais restauradores: cerâmica, resina composta, cimento de ionômero de vidro convencional e cimento de ionômero de vidro modificado por resina. *S. mutans* foi utilizado para desenvolver um biofilme selecionado de 30 dias. As superfícies investigadas de cada material ficaram expostas em condição estática em 80µL de solução bacteriana em BHI durante 2 horas, tempo indicado para a formação do biofilme na cavidade bucal. As bactérias não-aderidas foram lavadas com solução estéril e cada disco foi colocado em um poço (em uma placa de 24 poços) e 2ml de caldo BHI esterilizado e 1% de sacarose foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas por 30 dias, em situações ideais para o crescimento bacteriano e com o meio renovado a cada 48h. Os espécimes foram corados e analisados por microscopia de varredura a laser confocal e COMSTAT. Foram avaliados a espessura média de biofilme, biocombustível total, coeficiente de rugosidade e a relação superfície-volume, assim como as características de distribuição e arquitetura das células viáveis/não viáveis no biofilme. Somente a espessura média do biofilme teve uma diferença estatística entre os materiais testados, em que a resina composta e a cerâmica acumularam os biofilmes mais espessos. A análise qualitativa mostrou agregados celulares e canais cheios de líquido penetrando em uma profundidade considerável do biofilme. Além disso, as imagens demonstraram uma progressão de células mais viáveis em regiões superficiais do biofilme para células proporcionalmente mais não viáveis nas regiões mais profundas do biofilme perto dos discos. Baseado nos resultados do referido estudo, seria interessante a adição de antimicrobianos para auxiliar no controle do biofilme formado sob a superfície de materiais odontológicos.

Jarvien et al. (1993) estudaram a susceptibilidade do *S. mutans* de amostras salivares coletadas de indivíduos saudáveis para a CHX. Foram coletadas amostras de saliva estimulada com parafina de 70 crianças, escolares, saudáveis de 11 anos e 46 estudantes de odontologia também saudáveis com idade de 23 a 32 anos. A saliva foi armazenada e cultivada em meio de cultura, e foram isoladas cepas de *S. mutans*, que foram submetidas à CHX e a seis outros agentes antimicrobianos (amoxicilina, cefuroxima, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina e

eritromicina). Os autores concluíram que embora haja uma seleção crescente e contínua sobre o *S. mutans* por agentes antimicrobianos comumente usados, especialmente a CHX, os *S. mutans* permanecem susceptíveis a estes agentes antimicrobianos.

O estudo de Ruiz-Linares e colaboradores (2014) avaliou a capacidade de vários antimicrobianos no controle do biofilme de *S. mutans* formado na dentina. Foram avaliadas as atividades antimicrobianas de 0,2% e 2% de CHX, 0,2% de cetrimida e 0,2%, 0,5%, 1% e 2% de alexidina em biofilme de 1 semana formado sob blocos de dentina coronária. A atividade antimicrobiana do biofilme pelos diferentes protocolos foi expressa como a porcentagem de morte do biofilme, sendo 100% de morte da população bacteriana denotada de erradicação. A CHX foi considerada padrão-ouro entre os agentes antimicrobianos, por ser um potente inibidor de metaloproteinases e nesse estudo foi capaz de reduzir em 85% a carga bacteriana do biofilme dental em uma concentração de 0,2% e erradicar a população de *S. mutans* a uma concentração de 2%.

Sabendo-se dos efeitos que agentes antimicrobianos podem exercer no controle do biofilme, estes quando associados a materiais restauradores poderiam diminuir ou impedir a adesão do biofilme na superfície da restauração e inibir o crescimento de colônias bacterianas na interface dentária ou da restauração (Imazato, 2003) ou até mesmo de superfícies oclusais seladas. Estudos recentes tem sido conduzidos com o objetivo de caracterizar novos materiais incorporados de agentes antimicrobianos, como resinas compostas, cimentos de ionômero de vidro e materiais seladores de fôssulas e fissuras (Marti, 2013; Duque et al, 2017; Kim et al, 2016; Inagaki et al, 2016.)

Jedrychowski et al. (1983) avaliaram a atividade antibacteriana de uma resina composta e de um material restaurador a base de ionômero de vidro com adição de 0,1%, 2%, 3%, 5% e 10% de gluconato ou dicloridrato de CHX. A atividade antimicrobiana foi medida por inibição do crescimento de *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *S. mutans*, *L. acidophilus* e *Escherichia coli* durante 4 dias. Além das propriedades antibacterianas, foram avaliadas também propriedades mecânicas como resistência à compressão, tração e resistência ao cisalhamento da adesão ao esmalte. Os autores verificaram que a adição de ambos agentes aumentou a atividade antimicrobiana da resina composta e do cimento de ionômero de vidro e que a adição da CHX alterou as propriedades mecânicas, diminuindo-as principalmente nas concentrações mais altas. Dessa maneira, eles concluíram que a adição de pequenas concentrações de CHX aumentou a atividade antibacteriana sem comprometer as propriedades mecânicas.

Imazato (2003), em uma revisão de literatura, relatou a necessidade e evolução dos agentes restauradores com adição de antimicrobianos. Devido à alta taxa de cáries secundárias, após tratamentos restauradores, desde 1977 um grande número de estudos tem examinado as atividades antibacterianas dos compósitos comerciais e seus constituintes. Essas investigações frequentemente utilizam o método de difusão em ágar, em que bactérias são inoculadas em placas de ágar e os materiais resinosos são dispostos sobre elas de maneira polimerizada e não-polimerizada. Por meio deste método, uma zona de inibição ao redor do material é produzida se algum componente do material se solubilizar e se lixiviar dos espécimes. A maioria dos estudos não produzia nenhum halo de inibição ao redor dos materiais polimerizados, justamente, pois seus componentes não apresentam efeito bacteriostático/bactericida contra as bactérias da cavidade bucal em baixas concentrações. Essa característica dos compósitos os diferencia das restaurações realizadas com amálgamas ou cimentos de ionômero de vidro, que mostram alguns efeitos antibacterianos pela liberação de íons metálicos ou fluoreto. A partir disso, compósitos carregados com flúor começaram a ser estudados, porém, embora alguns materiais apresentassem zonas de inibição quando não-polimerizados, os materiais polimerizados não demonstravam nenhum efeito antibacteriano, e portanto, é provável que a quantidade de flúor liberada a partir de compósitos fluoretados polimerizados seja muito pequena para revelar efeitos antibacterianos.

Li et al. (2011) incorporaram um monômero antibacteriano, metalcriloxietilo cloreto de cetil dimetil amônio (DMAE-CB) a 1% em peso a um selante de fósulas e fissuras disponível comercialmente e determinaram os efeitos dos selantes polimerizados e seus eluentes sobre o crescimento de *S. mutans* por meio de um teste de contato com o biofilme e medição da absorvância, respectivamente. Eles mediram e compararam o ângulo de contato com a superfície, o grau de conversão, microdureza e microinfiltração. Os autores concluíram que a incorporação do monômero antibacteriano pode fornecer selante com atividade antibacteriana de contato após a polimerização, sem afetar o ângulo de contato da superfície, grau de conversão, dureza e microinfiltração.

Yu et al. (2016) avaliaram o efeito antimicrobiano de um monômero antibacteriano quando incorporado a um selante de fósulas e fissuras. O estudo incorporou 4% em peso de um brometo de 2-metacriloxietil-dodecilmetil amônio (MAE-DB) a um selante resinoso comercialmente disponível e avaliou os efeitos antimicrobianos de acordo com a contagem de unidades formadoras de colônias e testes metabólicos. Os efeitos dos selantes polimerizados sobre a aderência e a integridade da membrana de *S. mutans* foram investigados usando microscopia confocal a laser em conjunto com indicadores fluorescentes. Como resultado, o

selante de fóssulas e fissuras com MAE-DB exibiu um efeito inibitório significativo no crescimento de *S. mutans* em comparação com o grupo controle. A análise de fluorescência das imagens da microscopia confocal a laser demonstrou que o MAE-DB incorporado ao selante poderia dificultar a adesão do *S. mutans* e exercer um prejuízo sobre a integridade da membrana bacteriana. Portanto, o estudo demonstrou que o selante de fóssulas e fissuras, contendo MAE-DB, foi considerado promissor para prevenir ou controlar cáries dentárias nas fóssulas e fissuras.

de Castilho et al. (2012) avaliaram *in vitro* e *in vivo* o comportamento biológico e mecânicos de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina contendo CHX. Para os estudos *in vitro*, o cimento de ionômero de vidro modificado por resina (RMGIC) foi associado com 0,2%, 0,5%, 1,25% e 2,5% de CHX. A avaliação microbiológica foi realizada por meio do teste de difusão em ágar em bactérias cariogênicas durante 24h. O metabolismo das células de odontoblastos e as análises de morfologia mediram os efeitos citotóxicos dos grupos após 24h. Os mesmos grupos foram submetidos à resistência à compressão e a resistência à tração diametral. O objetivo do tratamento *in vivo* foi verificar a ação microbiológica da melhor concentração de CHX associado ao RMGIC aplicado na dentina remanescente após tratamento indireto da polpa. O tratamento *in vivo* constituiu então em tratamento indireto da polpa usando um RMCIG associado com a melhor concentração de CHX e foram realizadas avaliações clínicas e microbiológicas antes e após 3 meses. Como resultados, os autores obtiveram que o uso de 1,25% de CHX melhorou significativamente os efeitos antibacterianos do RMCIG sem causar quaisquer efeitos prejudiciais às células odontoblásticas, e sem prejudicar as propriedades mecânicas. Essa combinação de RMGIC e CHX eliminou completamente os *S. mutans* após 3 meses do tratamento indireto da polpa.

Nojosa (2014) avaliou o efeito da incorporação de CHX, em suas formas livre e encapsulada, nas propriedades físico-químicas de selantes resinosos. Foram incorporadas 2 formulações de CHX (digluconato de CHX – DC e diacetato de CHX – DA) na sua forma livre a 1% e 2% e encapsulada em micropartículas poliméricas de Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) a 5% e 10% em um selante resinoso comercial com flúor (Bioseal®), e a um selante experimental sem flúor. Foram realizados testes de grau de conversão dos monômeros, avaliação da liberação de CHX em meios de dissolução e liberação do fluoreto. Nesse estudo foi avaliada também, a resposta antimicrobiana das micropartículas poliméricas de PLGA contendo digluconato ou diacetato de CHX. Como resultados, os autores encontraram que *S. mutans* foram inibidos para ambas as formas de CHX (DG e DA), representando a atividade farmacológica do antimicrobiano após o processo de encapsulação e

que as formulações contendo mais CHX (2%) foram responsáveis pelas maiores zonas de inibição. A adição de CHX livre ou encapsulada aos selantes afetou o grau de conversão, dependendo do tipo de CHX incorporada e do selante, tendo maior grau de conversão (77,69%) para o grupo composto de digluconato de CHX a 2% em forma livre incorporado ao selante experimental sem flúor, e o menor grau de conversão (69,74%) no grupo em que foi incorporado o digluconato de CHX encapsulado a 10% no selante comercial com flúor. Os grupos com CHX livre liberaram maior quantidade de fármaco no início do estudo, e os selantes contendo micropartículas apresentaram liberação lenta e gradual da CHX. Houve também uma maior liberação de fluoreto dos selantes contendo as micropartículas poliméricas carregadas com CHX comparado com o grupo controle.

Para avaliar o efeito antibacteriano da clorexidina, Shanmugaavel et al. (2015) incorporaram 1% de CHX a um cimento de ionômero de vidro convencional e um selante resinoso de fôssulas e fissuras, e avaliou a ação antimicrobiana e propriedades mecânicas desses materiais. Como propriedades mecânicas, o estudo avaliou resistência à compressão e força de tração diametral. A adição de 1% de CHX diminuiu significativamente a atividade bacteriana dos selantes, e não houve diferença nas propriedades mecânicas estudadas, concluindo assim que a adição de 1% de CHX, tanto em um cimento de ionômero de vidro, quando em um selante resinoso, foi suficiente para prover atividade antibacteriana sem afetar significativamente as propriedades mecânicas dos materiais.

Kim et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de cimento de ionômero de vidro incorporado com nanopartículas zeolite carregadas com CHX. Um sistema restaurador funcional com propriedades antibacterianas foi desenvolvido usando nanopartículas de zeólito (ZENPs) como transportadoras de fármacos. As ZENPs carregadas com CHX foram preparadas usando o método de imobilização iônica, e então foram incorporados a um cimento de ionômero de vidro comercial. O tamanho médio do ZENP carregado com CHX era de cerca de 100 a 200 nm, e eles foram dispersos de forma homogênea no cimento de ionômero de vidro. O perfil de liberação *in vitro* do cimento de ionômero de vidro carregado com CHX mostrou uma explosão de liberação inicial aproximadamente 30% da CHX total ao dia 7, enquanto o cimento de ionômero de vidro contendo ZENPs carregado com CHX mostrou uma liberação sustentada do antimicrobiano sem a explosão do lançamento inicial, em um estudo de imersão de 4 semanas. Os resultados dos testes de difusão em ágar mostraram que o cimento de ionômero de vidro incorporado com os ZENPs carregado com CHX mostrou uma zona de inibição maior para o *S. mutans* do que o cimento de ionômero de

vidro sozinho, mostrando que essa plataforma de entrega de fármaco conferiu atividade antimicrobiana ao cimento de ionômero de vidro.

No estudo de Inagaki et al. (2016) foram avaliadas as propriedades antibacterianas, grau de conversão e dureza Knoop de infiltrantes experimentais com adição de diacetato de CHX. Foram preparados nove tipos de infiltrantes comerciais, sendo eles: TEGDMA, TEGDMA/0.1% CHX, TEGDMA/0.2% CHX, TEGDMA/UDMA, TEGDMA/UDMA/0.1% CHX, TEGDMA/UDMA/0.2%CHX, TEGDMA/BisEMA, TEGDMA/BisEMA/0.1%CHX, TEGDMA/BisEMA/0.2% CHX. Uma solução de CHX a 0,12% foi utilizada como controle positivo para as propriedades antibacterianas, e o infiltrante comercial Icon[®] foi utilizado como controle comercial. Os infiltrantes comerciais foram testados, nas condições polimerizados e não-polimerizados quanto a atividade antimicrobiana (avaliada por meio do ensaio de *Pour Plate*) para *S. mutans* e *L. acidophilus*. Além das propriedades antibacterianas, foram avaliados também o grau de conversão e microdureza Knoop dos infiltrantes. Como conclusão, os autores apontam que: as misturas de resinas puras não mostram atividade antibacteriana contra ambas as cepas, e que a adição de CHX (0,1% ou 0,2%) às misturas de resina promoveu efeitos antibacterianos dependendo do tipo de monômero e da fotopolimerização; e que as características de cada monômero na formulação das misturas de resina foram fatores consideráveis que mais influenciaram no grau de conversão e microdureza do que a adição de CHX.

Inagaki et al. (2016), em outro estudo mas na mesma linha de pesquisa, avaliaram propriedades físico/mecânicas de nove tipos de misturas resinosas experimentais, sem CHX e com a incorporação de 0,1% e 0,2% de CHX. As propriedades avaliadas foram: sorção e solubilidade, amolecimento, resistência flexural e módulo de elasticidade. Para as formulações monoméricas, o TEGDMA foi usado como componente principal para todas as misturas; os monômeros UDMA ou BisEMA foram utilizados em algumas misturas numa proporção de 1:4 em peso, assim, as formulações dos grupos experimentais foram: TEGDMA, TEGDMA/0.1% CHX, TEGDMA/0.2% CHX, TEGDMA/UDMA, TEGDMA/UDMA/0.1% CHX, TEGDMA/UDMA/0.2%CHX, TEGDMA/BisEMA, TEGDMA/BisEMA/0.1%CHX, TEGDMA/BisEMA/0.2% CHX. O infiltrante Icon[®] foi utilizado como controle comercial. Para a sorção e solubilidade, espécimes cilíndricos foram confeccionados e o peso foi mensurado; os espécimes foram imersos em água deionizada durante 7 dias a 37°C e o peso foi verificado novamente. Para o amolecimento, foram preparados espécimes cilíndricos e a dureza Knoop inicial foi mensurada. Os espécimes foram imersos em etanol absoluto por 24h a 37°C e a mensuração da dureza Knoop final foi

realizado. Os valores de amolecimento foram calculados pela porcentagem de redução da dureza. Para o módulo de elasticidade e resistência flexural, foram preparadas amostras em forma de barra e os valores foram obtidos com um dispositivo universal (três pontos, 5mm de distância, 0,5mm/min, carga de 50N). As misturas TEGDMA/BisEMA e Icon[®] mostraram a maior sorção entre as misturas, porém o Icon[®] foi o material mais solúvel. TEGDMA/UDMA/0,1%CHX apresentou o maior amolecimento, similar ao controle comercial. Para a resistência flexural, o TEGDMA foi semelhante ao Icon[®] e demonstrou as médias mais baixas, e para o módulo de elasticidade, todos os grupos foram diferentes do Icon[®], porém a incorporação de CHX não afetou os resultados, e sim as características intrínsecas de cada monômero. Assim, os autores concluíram que a incorporação de CHX não interferiu negativamente nas propriedades físico/mecânicas das composições estudadas.

Benetello (2016) avaliou a influência da incorporação de CHX nas propriedades físicas, químicas e biológicas de um material infiltrante comercial. Os grupos estudados foram: Infiltrante Icon[®]; Icon[®] + CHX a 0,1%; Icon[®] + CHX a 0,2%. A atividade antimicrobiana foi realizada em relação ao *S. mutans* e *L. acidophilus* utilizando teste de difusão em ágar e o teste de biodegradação foi realizado referente à rugosidade e à morfologia de superfície. As propriedades físico-químicas foram avaliadas por grau de conversão, módulo de elasticidade, dureza Knoop, amolecimento, sorção e solubilidade, e ângulo de contato. O estudo apresentou bons resultados, e pôde-se concluir que os grupos adicionados a CHX mostraram resultados promissores, uma vez que foram fornecidas propriedades biológicas aumentadas, com a inibição do *S. mutans* e *L. acidophilus* e a resistência à biodegradação. Além disso, propriedades físicas e químicas foram mantidas e melhoradas, exceto para a sorção de água.

Duque et al. (2017) avaliaram *in vitro* e *in vivo* um cimento de ionômero de vidro (CIV) contendo CHX para tratamento restaurador atraumático (ART), cujo objetivo foi avaliar os efeitos da incorporação do antimicrobiano nas propriedades biológicas e químico-mecânicas do material e acompanhamento *in vivo* do ART realizado com CIV contendo ou não CHX. Para os estudos *in vitro*, os grupos foram divididos em CIV, CIV com 1,25% CHX e CIV com 2,5% CHX. A atividade antimicrobiana do material foi analisada usando o método de difusão em ágar. Os efeitos citotóxicos, resistência à compressão, microdureza e liberação de flúor também foram analisados. Um estudo randomizado controlado foi conduzido em 36 crianças que receberam ART com CIV ou CIV com CHX. Saliva e biofilme foram coletados para contagem de *S. mutans* e a taxa de sobrevivência das restaurações foi checada depois de 7 dias, 3 meses e 1 ano. Como resultados, os pesquisadores encontraram que a incorporação

de 1,25% e 2,5% de CHX promoveu atividade antimicrobiana ao CIV sem afetar a liberação de flúor e as características mecânicas, porém 2,5% de CHX foi citotóxica. A taxa de sobrevivência das restaurações usando CIV com 1,25% CHX foi similar ao controle. Houve redução de *S. mutans* no grupo de crianças tratadas com CIV com CHX na saliva e biofilme 7 dias após o tratamento. Dessa forma os autores concluíram que a incorporação de 1,25% de CHX aumentou a atividade antimicrobiana *in vitro*, sem alteração das propriedades químico-mecânicas do CIV e a viabilidade celular dos odontoblastos. Essa combinação melhorou o efeito microbiológico *in vivo* em curto prazo sem afetar o desempenho clínico das restaurações ART.

Tersi et al. (2017) incorporaram baixas concentrações de diacetato de CHX (0,1 e 0,2%) a um selante resinoso comercial com flúor com o objetivo de avaliar se a liberação de fluoreto do material selador seria afetada pela incorporação das duas concentrações de CHX. A liberação de fluoreto foi avaliada durante 30 dias em meios contendo soluções desmineralizadora e remineralizadora. Observou-se que a adição de 0,1% de CHX não interferiu na liberação de fluoreto quando em solução desmineralizadora, uma vez que não foi observada diferença significativa entre o grupo controle (sem adição de CHX), até o 7º dia de análise. Entretanto, esse mesmo resultado não foi observado quando da adição de 0,2% de CHX. Já para a solução remineralizadora, observou-se que os grupos controle e 0,1% de CHX apresentaram padrão similar de liberação de fluoreto nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 9 e 12. No 15º dia, o grupo 0,1% de CHX apresentou liberação maior quando comparado ao controle e ao grupo 0,2%.

Diante dos resultados promissores obtidos nos estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (Inagaki et al., 2016; Inagaki et al., 2016, Benetello, 2016 e Tersi et al., 2017) quando da adição de baixas concentrações de CHX a materiais com características infiltrantes e a um material selador de fósulas e fissuras), observou-se a necessidade de dar continuidade ao estudo de caracterização do material inicialmente testado, avaliando as propriedades físico-mecânicas relacionadas ao mesmo.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo neste estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de diacetato de CHX na atividade antibacteriana, microdureza e propriedades de superfície (rugosidade e morfologia) de um selante resinoso de fósulas e fissuras.

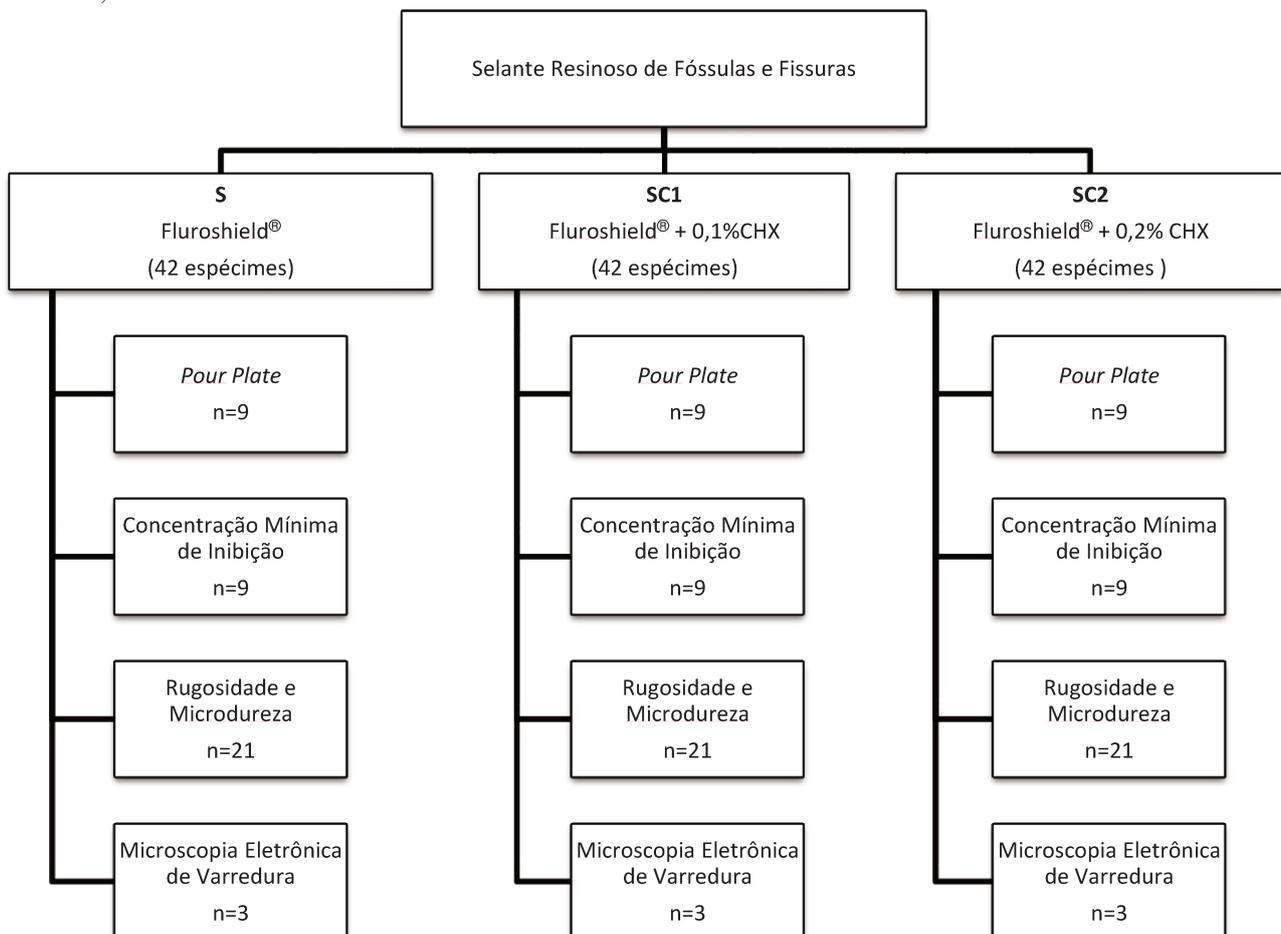
A primeira hipótese testada foi que adição de CHX ao selante de fósulas e fissuras aumentaria a atividade antibacteriana do material e a segunda que a microdureza e as propriedades de superfície do selante de fósulas e fissuras poderiam ser alteradas após a adição das diferentes concentrações de CHX.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram: diferentes concentrações de CHX (0,1% e 0,2% em peso) adicionadas a um selante resinoso comercial. A amostra consistiu de espécimes de material que foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: **S** - Selante resinoso (Controle negativo), **SC1**- Selante resinoso + 0,1% de CHX e **SC2** - Selante resinoso + 0,2% de CHX. As variáveis de resposta foram: tamanho do halo de inibição (em mm) do *S. mutans* (avaliada pelo ensaio de *Pour Plate*), avaliação da Concentração Mínima de Inibição (MIC), rugosidade de superfície (determinada em Ra), microdureza de superfície (avaliada por meio da determinação da dureza *Knoop*) e morfologia de superfície (avaliada em Microscopia Eletrônica de Varredura) (**Quadro 1**). O **Quadro 2** demonstra os grupos, materiais, tipo e composição dos materiais utilizados no estudo.

Quadro 1. Esquema representativo dos grupos, unidades amostrais e testes realizados. S = Selante resinoso; SC1 = Selante resinoso + 0,1% de Clorexidina; SC2 = Selante resinoso + 0,1% de Clorexidina.



Quadro 2. Grupos, materiais, tipo e composição dos materiais utilizados no estudo*

GRUPOS/MATERIAIS	TIPO	COMPOSIÇÃO - % EM PESO
<p style="text-align: center;">S</p> <p style="text-align: center;">Fluoroshield® (Lote: 75450)</p>	Selante Resinoso com flúor	Fluoroshield® - Monômero NCO, Nupol Bis GMA, TEGDMA, Penta, N-metil Dietolamina, BHT, Metacrilato de 2_n, Canforoquinona, Cervit T 1000, Bário Silanizado, Fluoreto de Sódio, Cabosil TS 720 e Titanox 3328 - 100%
<p style="text-align: center;">SC1</p> <p style="text-align: center;">Fluoroshield® (Lote: 75450) + Diacetato de clorexidina (Lote: WX8CO155V)</p>	Selante Resinoso com flúor com adição do antibacteriano	Fluoroshield® - Monômero NCO, Nupol Bis GMA, TEGDMA, Penta, N-metil Dietolamina, BHT, Metacrilato de 2_n, Canforoquinona, Cervit T 1000, Bário Silanizado, Fluoreto de Sódio, Cabosil TS 720 e Titanox 3328 - 99,9 + 0,1% de Diacetato de clorexidina
<p style="text-align: center;">SC2</p> <p style="text-align: center;">Fluoroshield® (Lote: 75450) + Diacetato de clorexidina (Lote: WX8CO155V)</p>	Selante Resinoso com adição do antibacteriano	Fluoroshield® - Monômero NCO, Nupol Bis GMA, TEGDMA, Penta, N-metil Dietolamina, BHT, Metacrilato de 2_n, Canforoquinona, Cervit T 1000, Bário Silanizado, Fluoreto de Sódio, Cabosil TS 720 e Titanox 3328 - 99,8% + 0,2% de Diacetato de clorexidina

* Informações fornecidas pelos fabricantes.

NCO = Grupo funcional da molécula de monômero, composto por Nitrogênio, Carbono e Oxigênio

BISGMA = Bisfenol Glicidil Metacrilato (C₂₉H₃₆O₈)

TEGDMA = Trietileno Glicol Dimetacrilato (C₁₄H₂₂O₆)

BHT = Hidroxitolueno butilado (C₁₅H₂₄O)

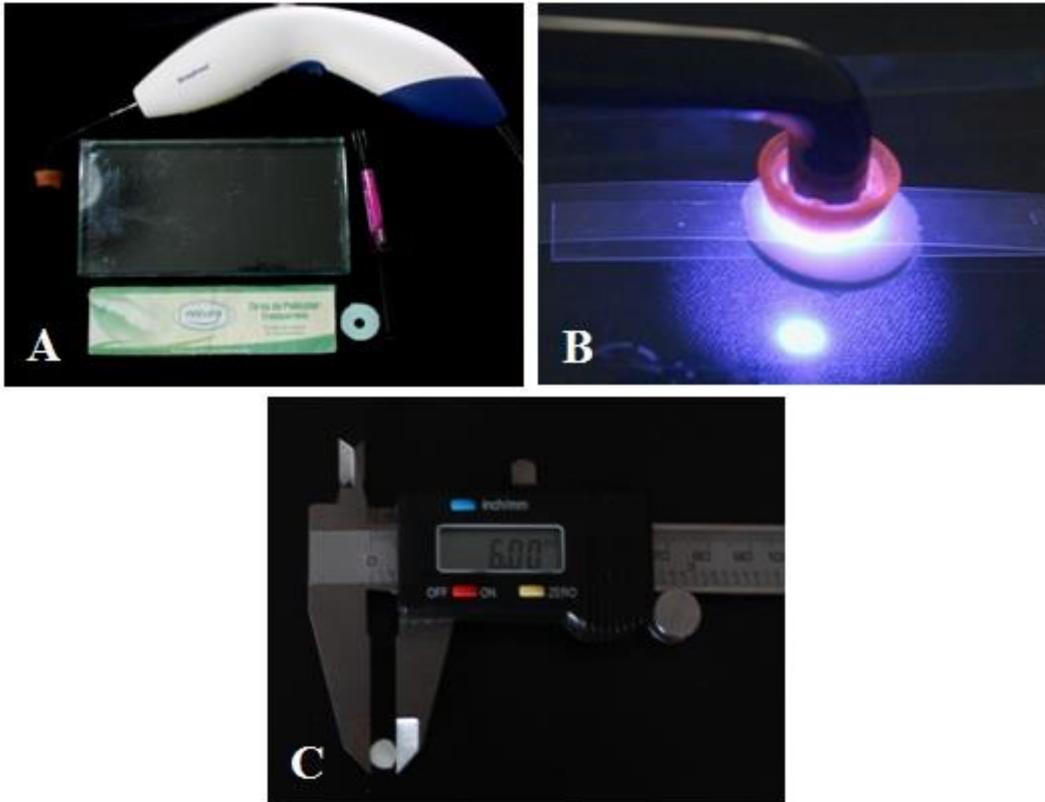
4.2 Adição de CHX ao selante de fóssulas e fissuras

Para a adição do agente antimicrobiano no selante comercial (Fluoroshield®) foi utilizado o diacetato de CHX em pó (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) e foi realizada a proporção peso/peso do material resinoso e agente antimicrobiano nas devidas concentrações (0,1% e 0,2%) (Inagaki et al., 2016). Tanto o material quanto o agente antimicrobiano foram pesados em balança analítica e em seguida foram misturados manualmente utilizando-se espátula. Para evitar a polimerização precoce do material, todo o procedimento foi realizado em ambiente com luz e temperatura controladas e em frascos de cor âmbar.

4.3 Preparo dos espécimes

Para a confecção dos espécimes foram preparadas matrizes de silicone (6 mm de diâmetro x 2 mm de espessura) com silicone de adição (Express, 3M-ESPE, Brasil), nas quais os materiais controle e experimental foram inseridos em único incremento e em seguida, sob a superfície foi colocada uma tira matriz de poliéster de acordo com as normas da ISO 4049. A fotoativação foi realizada utilizando-se o aparelho Bluephase-G2 por 40 segundos (Ivoclar Vivadent, Schaan, Lietchtenstein - 1200 mW/cm²; dose de energia padronizada em 436J). A intensidade de luz foi verificada utilizando-se o radiômetro Curing Radiometer Model 100 (Demetron Research Corp, USA). Em seguida, os espécimes foram removidos das matrizes de silicone e armazenados individualmente em temperatura ambiente, em 100% de umidade, por 24 horas, em estufa (**Figura 1**).

Figura 1. Ilustração da sequencia do preparo dos espécimes: (A) materiais utilizados para a confecção dos espécimes; (B) polimerização dos espécimes; (C) espécime mensurado por meio de por paquímetro digital.



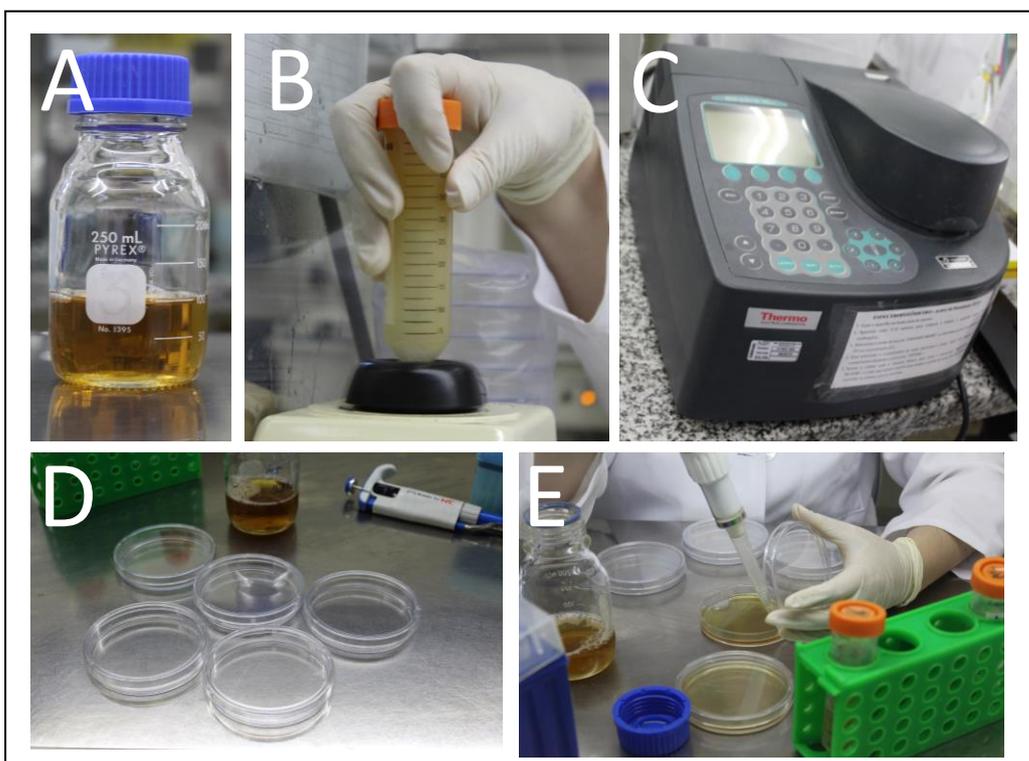
4.4 Microrganismos e testes de susceptibilidade microbiana

Os microrganismos utilizados foram *S. mutans* (UA159) do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brasil. A preparação das cepas de *S. mutans* foram realizadas utilizando o método de microdiluição. Culturas foram preparadas durante 24 horas em soro fisiológico a 0,9% (5 ml) e ajustando a absorbância de 1,055 A e 550nm em espectrofotômetro (Genesys 10uv, Thermo Electron Corporation, EUA) para se obter um inóculo com concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ células/ml. Em seguida, fez-se uma diluição em série atingindo uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células/ml em cultura de caldo BHI (Difco Laboratories, EUA), de modo a medir a atividade antibacteriana dos grupos controle e experimental. O teste foi realizado em triplicata.

4.4.1 Ensaio de Pour Plate

Esta técnica foi utilizada para observar a zona de inibição formada a partir de misturas de selantes de média viscosidade e grupo de controle. Inicialmente, cada amostra foi exposta a luz ultravioleta durante 15 minutos por face para sua esterilização. Cada inóculo foi ajustado a uma absorbância de 0,6 a 0,7A e 550 nm em espectrofotômetro (Genesys 10uv, Thermo Electron Corporation, EUA), e 10 mL foram adicionados a 100 ml de meio de cultura BHI (Difco Laboratories, USA). Em seguida, 5 ml do conjunto foram transferidos para uma placa de Petri esterilizada (140 x 15 mm) com o auxílio de uma pipeta para evitar a incorporação de bolhas. Após a gelificação do meio, os espécimes (n=9) (6 mm de diâmetro x 2 mm de altura) foram colocados sobre o BHI sem qualquer tipo de pressão, fazendo com que apenas uma superfície da amostra ficasse em contato com as bactérias. As amostras foram colocadas em pontos equidistantes, e uma mesma placa de Petri continham os dois grupos experimentais e o grupo controle (3 amostras de cada grupo por placa) (**Figura 2**).

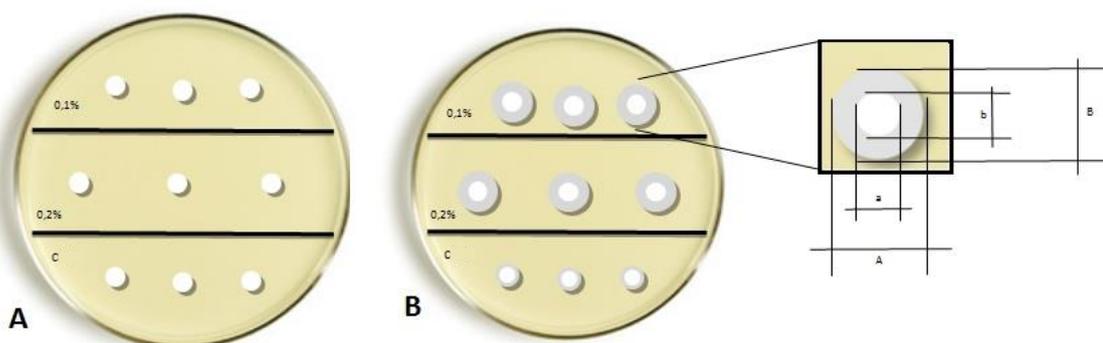
Figura 2. Imagens representativas da sequência de realização do teste *Pour Plate*: A) Meio de cultura BHI; B) Homogeneização do inóculo de *S. mutans*; C) Ajuste da absorbância no espectrofotômetro; D) Placas de Petri utilizadas para o experimento; E) Transferência do meio de cultura BHI para a placa de Petri com o auxílio de uma pipeta para evitar incorporação de bolhas.



Assim, as placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente durante 2 horas para que ocorresse a pré-difusão de substâncias e subsequentemente incubadas a 37°C em câmara anaeróbica por 24 horas. Após incubação, os diâmetros das zonas de inibição de crescimento bacteriano formados em torno dos espécimes foram observados sob luz refletida e medidos com paquímetro digital (**Figura3**).

Para controle do método, foram preparados discos de papel absorventes de 5mm de diâmetro, os quais foram embebidos em 1ml de digluconato de CHX a 0,12% (controle positivo) e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BHI preparado com cepas de *S. mutans*. Em seguida, as placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente durante 2 horas para que ocorresse a pré-difusão de substâncias e subsequentemente incubadas a 37°C em câmara anaeróbica por 24 horas. As medidas foram obtidas conforme demonstrado no esquema abaixo, em que “a” e “b” representam o tamanho da amostra, e “A” e “B” representam o tamanho do conjunto amostra + halo de inibição. Para obter o tamanho do halo de inibição, foi realizada a seguinte equação: $(A+B)/2 - (a+b)/2$ (**Figura 3**). Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 3. (A) Esquema representativo da distribuição dos espécimes na placa de Petri contendo meio BHI e *S. mutans*; (B) Esquema representativo das medições realizadas em cada halo de inibição. 0,1% representa os espécimes contendo selante acrescido de 0,1% de clorexidina; 0,2% representa o grupo contendo selante acrescido de 0,2% de clorexidina e C representa o grupo controle negativo, ou seja, somente o selante.

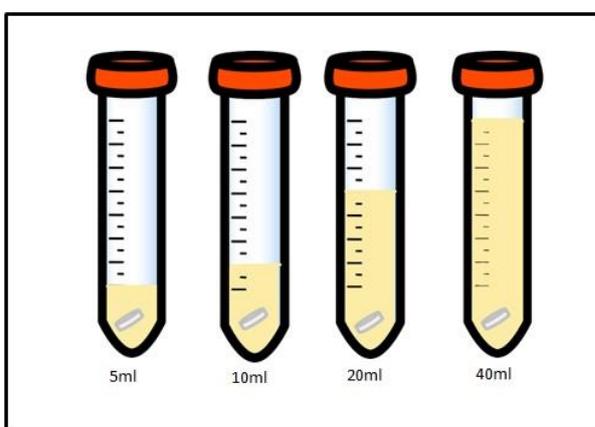


4.4.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Para determinar a MIC dos grupos, as cepas do *S. mutans* foram ajustadas para a absorbância de 0,08 a 0,10 A e 625 nm no espectrofotômetro (Genesys 10uv, Thermo Electron Corporation, EUA). Cada espécime (6 mm de diâmetro x 2 mm de altura) foi

colocado em tubo falcon contendo diferentes volumes do meio de cultura com as cepas de *S. mutans*. Os volumes foram de: 5 ml; 10 ml; 20 ml; e 40 ml. Portanto, a diluição começou com a maior concentração de CHX, diminuindo progressivamente a concentração antimicrobiana na mistura. As culturas foram realizadas em câmara anaeróbica a 37°C. O crescimento de microrganismos foi examinado após 24h (**Figura 4**).

Figura 4. Esquema representativo da diluição dos espécimes contendo os espécimes preparados (material selador – controle, material selador com 0,1% de CHX e material selador com 0,2% de CHX) em um meio de cultura BHI e *S. mutans*.



4.5 Avaliação da rugosidade média de superfície

Para a análise da rugosidade de superfície (n=21), os espécimes foram posicionados individualmente em um rugosímetro SV-3000 (Mitutoyo, Suzano, Brasil) com a superfície a ser analisada voltada para cima. Para a fixação dos espécimes, foi utilizada cera utilidade (Horus-Brasil). Três leituras foram realizadas para mensurar a rugosidade de superfície (Ra). A extensão de cada leitura foi de 1,25 mm com *cut-off* de 0,25 μm . A velocidade da leitura foi de 0,1mm/segundos (**Figura 5**).

Figura 5. Imagem representativa do espécime posicionado e sendo submetido ao ensaio de rugosidade de superfície.



4.6 Avaliação da Microdureza Knoop

Para a realização do ensaio de dureza Knoop é necessário que a superfície da amostra a ser medida esteja plana e perpendicular ao penetrador. Para isso, foi utilizada uma placa de vidro, no qual os espécimes foram sobrepostos e mantidos fixos com auxílio de cera utilidade (Horus-Brasil). Sobre as placas, colocou-se um feltro e o conjunto foi levado ao planificador manual. Após a planificação do conjunto base/espécime, o mesmo foi posicionado no microdurômetro (HMV-2, Shimadzu Corporation, Japan), o penetrador tipo Knoop foi aplicado com carga de 50g durante 5 segundos. Foram realizadas 3 penetrações (n=21) no centro de cada espécime a uma distância de 1mm entre elas.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura, os espécimes (n=3) foram fixados em *stubs* de acrílicos. Em seguida, foram submetidos à metalização com ouro para que se tornassem condutores. Após a metalização, os espécimes foram visualizados em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM 5600 PV - Acoplado com Sistema de EDX - Akishima, Tóquio, Japão) e foram feitas imagens em aumentos de 35x e 500x.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da mensuração dos halos de inibição (ensaio de *Pour Plate*) e microdureza foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($\alpha=5\%$) e como apresentaram distribuição normal ($p>0,05$) a eles foi aplicado o teste ANOVA um critério e o

teste de Tukey ($\alpha=5\%$). Os resultados do teste de rugosidade também foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk ($\alpha=5\%$). Entretanto, como os dados não apresentaram distribuição normal ($p<0,05$), estes foram transformados em LOG 10 e então submetidos aos testes paramétricos (ANOVA um critério) e teste Tukey para a comparação entre os grupos ao nível de significância de 5%. Os dados foram analisados por meio do programa Bioestat 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - Tefé, AM, Brasil).

Os resultados obtidos para determinação da MIC e as imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura foram analisadas qualitativamente de forma descritiva de acordo as mínimas concentrações inibitórias observadas e com a morfologia de superfície dos espécimes obtidos a partir dos materiais estudados.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de *Pour Plate*

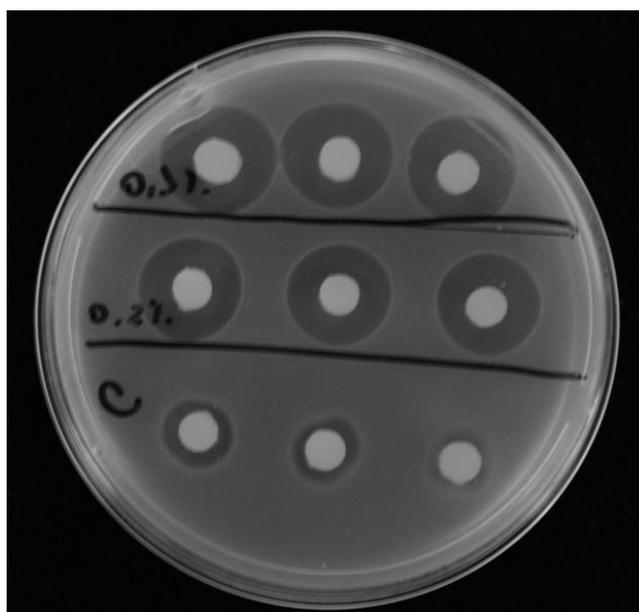
A tabela 1 apresenta as médias e desvio-padrão dos valores obtidos (em mm) a partir do teste microbiológico (ensaio de *Pour Plate*). Observou-se menor atividade antibacteriana para o grupo controle (material selador sem adição da CHX) com diferenças significativas para os grupos aos quais se adicionou o agente antimicrobiano nas concentrações de 0,1 e 0,2% ($p < 0,05$) (**Figura 6**).

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos valores obtidos após o ensaio de *Pour Plate*

GRUPOS	HALO DE INIBIÇÃO (MM)
Controle	3,45 ± 1,94 b
Clorexidina a 0,1%	10,77 ± 0,32 a
Clorexidina a 0,2%	10,26 ± 0,45 a
Controle positivo (Clorexidina a 0,12%)	14,53 ± 0,26

Letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($p < 0,01$), demonstrado pelo teste de Tukey para os grupos avaliados.

Figura 6. Imagem representativa dos halos de inibição observados pelo ensaio de *Pour Plate*. 0,1% representa o grupo de material selador adicionado de 0,1% de clorexidina; 0,2% representa o grupo adicionado de 0,2% de clorexidina; e C representa o grupo controle (material selador sem adição do antimicrobiano).



5.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os dados obtidos para MIC (em porcentagem de inibição) estão apresentados na tabela 2. Observou-se maior porcentagem de inibição em SC2 com a menor diluição (5ml), seguido das inibições para SC1 nas diluições de 5ml e 10 ml.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (MIC) e respectivas porcentagens de inibição obtida a partir das diluições (5 ml, 10 ml, 20 ml e 40 ml) e grupos estudos frente ao *S. mutans*

GRUPOS	INIBIÇÃO (%)			
	5ml	10ml	20ml	40ml
Controle negativo	0	0	0	0
Clorexidina a 0,1%	15,5	15,5	5,5	5,2
Clorexidina a 0,2%	18,5	11,5	5	3,2

5.3 Rugosidade de superfície

Para os dados de rugosidade de superfície não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p=0,32$) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Média e desvio-padrão do ensaio da rugosidade de superfície.

GRUPOS	VALORES DE RUGOSIDADE (RA)
Controle	$0,28 \pm 0,12$ a
Clorexidina a 0,1%	$0,32 \pm 0,10$ a
Clorexidina a 0,2%	$0,33 \pm 0,15$ a

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente ($p=0,32$), demonstrado pelo teste ANOVA um critério.

5.4 Microdureza

De acordo com a análise estatística, foram observados maiores valores de dureza *Knoop* para o grupo CHX a 0,1% o qual diferiu estatisticamente do grupo CHX a 0,2%, mas não diferiu estatisticamente do grupo controle (**Tabela 4**).

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos valores obtidos após o ensaio de microdureza Knoop.

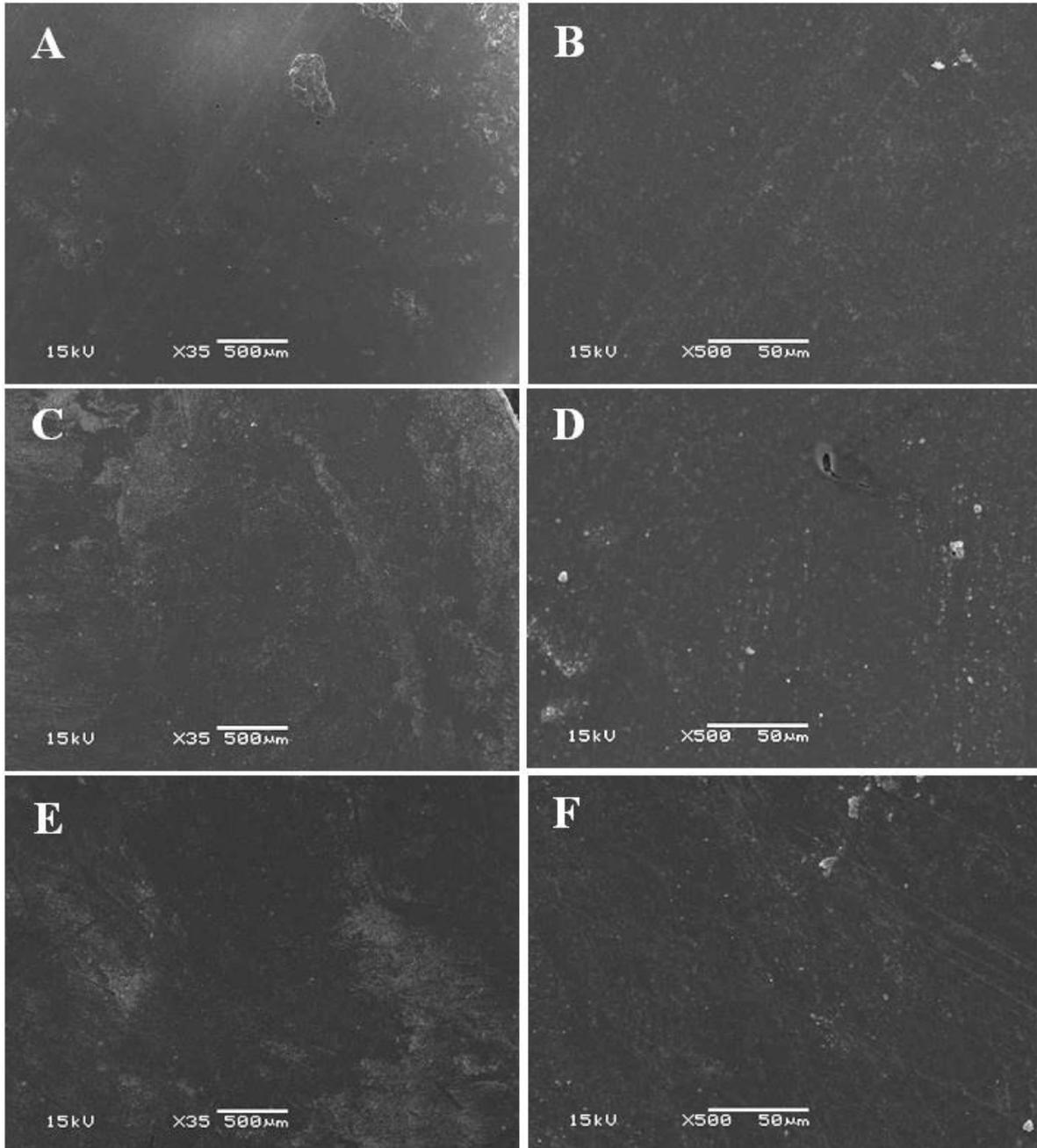
GRUPOS	VALORES DE DUREZA KNOOP
Controle	26,70 ± 4,49 ab
Clorexidina a 0,1%	29,26 ± 4,44 a
Clorexidina a 0,2%	24,87 ± 2,75 b

Letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes ($p=0,001$), demonstrado pelo teste de Tukey.

5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 7 apresenta imagens representativas dos grupos controle e experimentais. Pode-se observar que a adição das duas concentrações de CHX não interferiu com a morfologia da superfície do material selador avaliado no presente estudo. Nas imagens podem-se observar superfícies lisas, ausência de bolhas, e não foi possível diferenciar a matriz resinosa das partículas de carga ou da CHX.

Figura 7. Imagens representativas dos grupos controle (A e B), selante + 0,1% de clorexidina (C e D) e selante + 0,2% de clorexidina (E e F), sendo as imagens da esquerda em menor aumento (35x) e da direita em maior aumento (500x) . As imagens apresentam superfícies lisas e sem bolhas nas quais não é possível distinguir partículas de carga ou de clorexidina na matriz resinosa.



6 DISCUSSÃO

A literatura tem demonstrado importantes aspectos da utilização de novos materiais odontológicos, com melhores propriedades físico-químicas quando associados às propriedades antimicrobianas. Exemplos de agentes antibacterianos adicionados a materiais seladores de fóssulas e fissuras com o objetivo de reduzir ou prevenir a formação do biofilme são as partículas de prata, nanofibras e quitosana (Hamilton et al., 2015) e CHX (Jandt e Sigusch, 2009; Nojosa, 2014; Shanmugaavel et al., 2015). Dessa forma, neste estudo avaliou-se o efeito da adição de duas concentrações de CHX (0,1% e 0,2%) na propriedade antibacteriana e físicas de um selante disponível comercialmente.

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que todos os grupos avaliados apresentaram halos de inibição ao redor dos espécimes de material contra *S. mutans*. Entretanto, a adição de CHX ao selante de fóssulas e fissuras, nas duas concentrações, promoveu maior atividade antimicrobiana quando comparado ao grupo controle (material selador sem CHX). Como controle positivo utilizou-se solução de CHX a 0,12%, a qual apresentou halos de inibição comparáveis aos grupos teste (10,77mm para concentração de 0,1%, 10,26mm para concentração de 0,2% e 14,53mm para controle positivo). Dessa forma, a primeira hipótese do estudo, de que a adição de CHX ao selante de fóssulas e fissuras aumentaria a atividade antibacteriana do material, foi aceita.

A CHX é um agente antimicrobiano de amplo espectro, com alta efetividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como fungos, leveduras e vírus. O efeito antimicrobiano ocorre pela atração e adsorção das moléculas catiônicas da CHX à superfície celular aniônica dos microrganismos, e essa interação resulta na alteração da permeabilidade da membrana celular, promovendo a perda dos componentes intracelulares e o desequilíbrio osmótico da célula. Devido à sua estrutura química, que é composta por dois anéis clorofenólicos e dois grupos bisguanida, interligados simetricamente por cadeias hemetilênicas, um dos cátions da CHX se fixa à película adquirida sobre o dente e o outro fica livre para interagir com as bactérias as quais estão tentando colonizar as superfícies bucais. (Jenkins et al., 1988). Essas características da CHX explicam os resultados desse estudo, nos quais se observou maiores halos de inibição para o grupo controle positivo e para os selantes com adição do agente antimicrobiano quando comparados com o grupo controle sem clorexidina. Para o grupo controle, a formação do menor halo de inibição pode ser explicada pela liberação de fluoreto de sódio do material, que apresenta restrita capacidade antimicrobiana (Loyola-Rodriguez e Garcia-Godoy, 1996). Estes pesquisadores avaliaram a atividade antibacteriana do flúor liberado por 03 selantes resinosos comerciais, contra *S.*

mutans durante 7 dias e concluíram que a inibição da atividade antibacteriana pode estar relacionada com a quantidade de liberação de flúor do material (Loyola-Rodriguez e Garcia-Godoy, 1996).

Para obter efeitos antimicrobianos em materiais resinosos, pode-se alterar a composição dos componentes da resina, ou das partículas de carga. A adição de antimicrobianos solúveis na matriz resinosa é uma maneira simples de promover liberação do agente antimicrobiano em meio úmido, e para esse fim, a CHX é amplamente utilizada (Imazato, 2003). Entretanto, pode haver uma grande liberação do antimicrobiano logo no início, seguido de uma diminuição da liberação em longo prazo, além de uma possível diminuição das propriedades físico/mecânicas da resina quando incorporadas altas doses do material.

Nojosa (2014) incorporou duas concentrações (1% e 2%) de CHX na forma livre, e 5% e 10% de CHX na forma microencapsulada, em selantes resinosos, e encontrou inibição bacteriana para todas as formas e concentrações de CHX, porém algumas das propriedades físicas foram afetadas negativamente. Esses resultados corroboram com os achados do presente estudo quando se avaliou a capacidade antimicrobiana dos materiais adicionados a diferentes concentrações de CHX. Entretanto, no presente estudo não foram observadas alterações negativas nas propriedades estudadas e isso pode ser explicado pelas menores concentrações de CHX (0,1% e 0,2%) utilizadas.

de Castilho et al. (2012) e Duque et al. (2017) incorporaram concentrações menores de digluconato de CHX, variando de 0,2% a 2,5% em cimento de ionômero de vidro modificado por resina, e cimento de ionômero de vidro convencional e observaram que todas as concentrações de CHX apresentaram efeito antimicrobiano para *S. mutans*, e que até a concentração de 1,25% não afetou as propriedades mecânicas e não apresentou efeito citotóxico para os odontoblastos. No presente estudo optou-se pela utilização do pó de diacetato de CHX. A principal diferença entre o digluconato e o diacetato de CHX é a apresentação comercial das fórmulas. O digluconato é apresentado em forma líquida, enquanto o diacetato em pó. Além disso, ao adicionar um líquido a um material restaurador, há um potencial maior de provocar alterações físicas e mecânicas nas restaurações (Marti, 2013).

Semelhante ao presente estudo e no mesmo grupo e linha de pesquisa, Inagaki et al. (2016), Inagaki et al. (2016) e Benetello (2016) incorporaram baixas concentrações de CHX (0,1% e 0,2%) a infiltrantes experimentais e comerciais, e encontraram que formulações que continham só monômeros sem o agente antimicrobiano não apresentaram inibição para as

bactérias testadas, e que as formulações que continham as baixas concentrações de CHX apresentaram halos de inibição semelhantes ao do grupo controle (solução de 0,12% de clorexidina). Além disso, observaram que as propriedades físicas dos materiais dependem mais das suas formulações do que da adição do agente antimicrobiano. Quando incorporadas ao infiltrante comercial, as propriedades físicas e mecânicas (grau de conversão, dureza knoop, módulo de elasticidade, sorção e solubilidade e amolecimento) foram mantidas ou melhoradas, corroborando com os resultados deste estudo.

Com relação às propriedades físicas avaliadas, pode-se observar que para a microdureza de superfície ambos os grupos experimentais (0,1% e 0,2% de CHX) não diferiram estatisticamente do grupo controle, ou seja, não apresentaram alterações na superfície, quanto à dureza, rejeitando assim a segunda hipótese de que a adição de CHX poderia interferir negativamente nas propriedades físicas avaliadas.

Um aspecto importante a ser observado, foi quanto aos maiores valores de dureza observados quando da adição de 0,1% de CHX. Resultado similar foi observado por Benetello (2016) que adicionou as mesmas concentrações de CHX a um infiltrante comercial. Os autores atribuíram o fato à evaporação do monômero diluente (TEGDMA), o que resultaria em uma maior dureza de superfície. Esses resultados corroboraram com o presente estudo, uma vez que à composição de ambos os materiais avaliados são semelhantes. Tanto o selante de fósulas e fissuras quanto o infiltrante possuem o TEDDMA como monômero diluente, o qual pode ter evaporado durante a manipulação do produto experimental elevado assim os valores da microdureza. Outra provável explicação seria que menor concentração de CHX poderia facilitar maior grau de conversão e associado aos demais fatores (evaporação do solvente e partículas de CHX) poderia explicar um valor de dureza Knoop superior quando comparados os grupos controle e o grupo com 0,2% de CHX.

Além disso, os resultados sugerem que uma baixa viscosidade do material com uma menor concentração de CHX poderia ter permitido maior reação de polimerização, já que a viscosidade está inversamente relacionada com o grau de conversão (Lovell et al, 1999). Sendo assim, no presente estudo, o grupo com 0,2% de CHX pode ter apresentado uma maior viscosidade, e conseqüentemente, um menor grau de conversão e menor dureza knoop quando comparado ao grupo 0,1%, porém ressalta-se que ambas as concentrações foram semelhantes ao grupo controle quanto à microdureza.

Além da dureza de superfície, avaliou-se a rugosidade dos grupos controle e experimentais e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. Assim, a adição de CHX em ambas as concentrações não influenciaram nesta propriedade

física do selante estudado. Entretanto, segundo estudos de Bollen et al. (1997), rugosidade de superfície maior do que $0,2 \mu\text{m}$ já apresenta um substrato favorável para o acúmulo de biofilme, e portanto os resultados obtidos nesse estudo para os três grupos estão fora dos limites aceitos para a rugosidade. Apesar dos grupos terem apresentado valores médios de rugosidade entre $0,28$ e $0,33 \mu\text{m}$, não foram observadas alterações na morfologia superficial, quando da observação das imagens em microscopia eletrônica de varredura. Nessas imagens, foram observadas superfícies lisas, ausência de bolhas, e não foi possível diferenciar a matriz resinosa das partículas de carga ou da CHX. Dessa maneira, pode-se afirmar que o material selador estudado já apresenta um grau de rugosidade acima de $0,2 \mu\text{m}$, o que propiciaria um maior acúmulo de biofilme sob o material e que a adição de um antimicrobiano, no caso CHX em baixas concentrações poderia auxiliar na não formação e adesão do biofilme a superfície do dente selado. Ainda, clinicamente, os resultados do presente estudo, poderiam auxiliar na prevenção da cárie secundária, principalmente em sítios de alta aderência e difícil controle mecânico de remoção do biofilme, como são os casos das fóssulas e fissuras.

Diante dos resultados terem sido promissores, quando se adicionou ao selante de fóssulas e fissuras um agente antibacteriano, estudos futuros devem ser conduzidos para investigar outras propriedades físicas de materiais experimentais ou modificados, como grau de conversão, viscosidade, amolecimento, sorção e solubilidade e resistência à tração, além de propriedades antibacterianas em longo prazo.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições do presente estudo, pode-se concluir que a adição de diferentes concentrações de diacetato de CHX a um selante de fósulas e fissuras aumentou a capacidade antimicrobiana do material e não interferiu negativamente nas propriedades físicas e de superfície avaliadas. O presente estudo sugeriu que a concentração de 0,1% de CHX adicionada ao selante de fósulas e fissuras seria a mais indicada por apresentar ação antibacteriana e não diminuir as propriedades físicas avaliadas.

REFERÊNCIAS*

American Academy of Pediatric Dentistry and American Dental Association. Use of Pit-and-Fissure Sealants. Reference manual. 2017-2018;39(6):1-17.

Amin HE. Clinical and antibacterial effectiveness of three different sealant materials. *J Dent Hyg.* 2008 Fall;82(5):45.

Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* 2008 Nov-Dec;33(6):710-6. doi: 10.2341/08-3.

Aydin Sevinç B, Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Jul;94(1):22-31. doi: 10.1002/jbm.b.31620.

Benetello V. Influência da incorporação de clorexidina nas propriedades físicas, químicas e biológicas de um infiltrante comercial [tese] Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2016

Beun S, Bailly C, Devaux J, Leloup G. Physical, mechanical and rheological characterization of resin-based pit and fissure sealants compared to flowable resin composites. *Dent Mater.* 2012 Apr;28(4):349-59.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997; 13(4): 258-69.

Bürgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, *et al.* The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol.* 2009 Jun;54(6):595-601. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.03.004.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Burne R. Oral Streptococci: products of their environment. *J Dent Res.* 1998 Mar;77(3):445-52.

Carvalho JC. Caries process on occlusal surfaces: evolving evidence and understanding. *Caries Res.* 2014;48(4):339-46.

Cornejo OE, Lefébure T, Bitar PD, Lang P, Richards VP, Eilertson K, *et al.* Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol.* 2013 Apr;30(4):881-93. doi: 10.1093/molbev/mss278.

de Castilho AR, Duque C, Negrini TdeC, Sacono NT, de Paula AB, Sacramento PA, *et al.* Mechanical and biological characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. *Arch Oral Biol.* 2012 Feb;57(2):131-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.08.009.

de Fúcio SB, Puppim-Rontani RM, de Carvalho FG, Mattos-Graner R de O, Correr-Sobrinho L, Garcia-Godoy F. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent.* 2009 Jun;22(3):131-6.

Dorantes C, Childers NK, Makhija SK, Elliott R, Chafin T, Dasanayake AP. Assessment of retention rates and clinical benefits of a community sealant program. *Pediatr Dent.* 2005; 27(3): 212 -6.

Duque C, Aida KL, Pereira JA, Teixeira GS, Caldo-Teixeira AS, Perrone LR, *et al.* In vitro and in vivo evaluations of glass-ionomer cement containing chlorhexidine for Atraumatic Restorative Treatment. *J Appl Oral Sci.* 2017 Sep-Oct;25(5):541-550. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0195.

Eklund SA, Ismail AI. Time of development of occlusal and proximal lesions: Implications for fissure sealants. *J Public Health Dent.* 1986 Spring;46(2):114-21.

Feigal RJ, Donly KJ. The use of pit and fissure sealants. *Pediatr Dent.* 2006 Mar-

Apr;28(2):143-50; discussion 192-8.

Fejerskov, EAM Kidd (Eds.), *Dental caries: the disease and its clinical management*, Blackwell Monksgaard, Copenhagen, Denmark (2003)

Fejerskov O, Nyvad B, Kidd AM. Características clínicas e histológicas da cárie dentária. In: *Cárie Dentária – A Doença e seu Tratamento Clínico*. 1. ed. São Paulo: Santos; 2005. p. 71-96.

Hamilton MF, Otte AD, Gregory RL, Pinal R, Ferreira-Zandona A, Bottino MC. Physicomechanical and antibacterial properties of experimental resin-based dental sealants modified with nylon-6 and chitosan nanofibers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015 Nov;103(8):1560-8. doi: 10.1002/jbm.b.33342.

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater*. 2003 Sep;19(6):449-57.

Inagaki LT, Alonso RC, Araújo GA, de Souza-Junior EJ, Anibal PC, Höfling JF, *et al*. Effect of monomer blend and chlorhexidine-adding on physical, mechanical and biological properties of experimental infiltrants. *Dent Mater*. 2016 Dec;32(12):e307-e313. doi: 10.1016/j.dental.2016.09.028.

Inagaki LT, Dainezi VB, Alonso RC, Paula AB, Garcia-Godoy F, Puppini-Rontani RM, *et al*. Evaluation of sorption/solubility, cross-link density, flexural strength and elastic modulus of experimental resin blends with chlorhexidine. *J Dent*. 2016 Jun;49:40-5. doi: 10.1016/j.jdent.2016.04.006.

Itota T, Carrick TE, Yoshiyama M, McCabe JF. Fluoride release and recharge in giomer, compomer and resin composite. *Dent Mater*. 2004 Nov;20(9):789-95.

Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater*. 2009 Aug;25(8):1001-6. doi: 10.1016/j.dental.2009.02.009.

Jarvien H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 May;37(5):1158-9.

Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil*. 1983 Sep;10(5):373-81.

Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol*. 1988 Aug;15(7):415-24.

Jodkowska E. Efficacy of pit and fissure sealing: long-term clinical observations. *Quintessence Int*. 2008 Jul-Aug;39(7):593-602.

Kim HJ, Son JS, Kim KH, Kwon TY. Antimicrobial Activity of Glass Ionomer Cement Incorporated with Chlorhexidine-Loaded Zeolite Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016 Feb;16(2):1450-3.

Lavonius E, Kerosuo E, Kervanto-Seppälä S, Halttunen N, Vilkuna T, Pietilä I. A 13-year follow-up of a comprehensive program of fissure sealing and resealing in Varkaus, Finland; *Acta Odontol Scand*. 2002;60(3):174-9.

Li F, Li F, Wu D, Ma S, Gao J, Li Y, Xiao Y, Chen J. The effect of an antibacterial monomer on the antibacterial activity and mechanical properties of a pit-and-fissure sealant. *J Am Dent Assoc*. 2011 Feb;142(2):184-93.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986 Dec;50(4):353-80.

Loyola-Rodriguez JP, Garcia-Godoy F. Activity of fluoride release sealants on *mutans streptococci*. *J Clin Pediatr Dent*. 1996 Winter;20(2):109-11.

Lovell LG, Stansbury JW, Demetrios CS, Bowman CN. Effects of composition and

reactivity on the reaction kinetics of dimethacrylate/dimethacrylate copolymerizations. *Macromolecules* 1999;32:3913–21.

Marti LM. Incorporação de Gluconato ou Diacetato de Clorexidina a um Cimento de Ionômero de Vidro: porosidade, rugosidade superficial e atividade antibiofilme. [dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; 2013.

Martin J, Fernandez E, Estay J, Gordan VV, Mjor IA, Moncada G. Minimal invasive treatment for defective restorations: five-year results using sealants. *Oper Dent*. 2013 Mar-Apr;38(2):125-33. doi: 10.2341/12-062C.

Martignon S, Ekstrand KR, Ellwood R. Efficacy of sealing proximal early active lesions: An 18-Month clinical study evaluated by conventional and subtraction radiography. *Caries Res*. 2006;40(5):382-8.

Mejare I, Lingström P, Peterson LG, Holm AK, Twetman S, Källestäl C, *et al*. Caries-preventive effect of fissure sealants: a systematic review. *Acta Odontol. Scand*. 2003; 61(6): 321-330.

Nojosa JS. Caracterização de selantes resinosos contendo micropartículas poliméricas carregadas com clorexidina [dissertação]. Fortaleza: Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará; 2014.

Pardi V. Selantes de fósulas e fissuras: avaliação clínica e laboratorial [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2014.

Pereira CS. Análise longitudinal da retenção de selantes oclusais em dentes permanentes [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2015.

Puppin-Rontani R, Baglioni-Gouvea M, de Goes M, Garcia-Godoy F. Compomer as a pit and fissure sealant: effectiveness and retention after 24 months. *J Dent Child (Chic)*. 2006 Jan-Apr;73(1):31-6.

Ribeiro AA, Azcarate-Peril MA, Cadenas MB, Butz N, Paster BJ, Chen T, *et al.* The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PLoS One*. 2017 Jul 5;12(7):e0180621. doi: 10.1371/journal.pone.0180621. eCollection 2017.

Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz T, de Castro P, Aguado B, Baca P. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutans* biofilm. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014 Aug 20;13:41. doi: 10.1186/s12941-014-0041-5.

Shanmugaavel AK, Asokan S, John JB, Priya PG, Devi JG. Effect of one percent chlorhexidine addition on the antibacterial activity and mechanical properties of sealants: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2015 Sep-Dec;8(3):196-201. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1312.

Sheiham A, James WPT. Diet and dental caries: the pivotal role of free sugars reemphasized. *J Dent Res*. 2015 Oct;94(10):1341-7. doi: 10.1177/0022034515590377.

Simecek JW, Diefenderfer KE, Ahlf RL, Ragain JC Jr. Dental sealant longevity in a cohort of young U.S naval personnel. *J Am Dent Assoc*. 2005 Feb;136(2):171-8; quiz 230.

Tersi MB, Pascon FM, Garcia TMT, Puppim-Rontani RM, Kantovitz KR. Avaliação do efeito da adição de clorexidina na propriedade química da liberação de fluoreto de selante de fóssulas e fissuras. In *XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp*. Vol. 3, 2017. doi>10.19146/pibic-2017-78714.

Tenuta LMA, Cury JA. Fluoreto: da ciência à prática clínica. In: Assed, S. *Odontopediatria: bases científicas para a prática clínica*. Capítulo 4, 2005.

Thylstrup A. How should we manage initial and secondary caries? *Quintessence Int*. 1998 Sep;29(9):594-8.

Wright JT, Tampi MP, Graham L, Estrich C, Crall JJ, Fontana M, Gillette EJ, *et al.*

Sealants for preventing and arresting pit-and-fissure occlusal caries in primary and permanent molars. *Pediatr Dent*. 2016;38(4):282-308.

Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M. Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci*. 1999 Aug;107(4):290-6.

Yu F, Yu H, Lin P, Dong Y, Zhang L, Sun X, *et al*. Effect of an Antibacterial Monomer on the Antibacterial Activity of a Pit-and-Fissure Sealant. *PLoS One*. 2016 Sep 29;11(9):e0162281. doi: 10.1371/journal.pone.0162281. eCollection 2016.