



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**PEDRO HENRIQUE ACIOLY GUEDES PEIXOTO VIEIRA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTICÁRIE DE SELANTES  
RESINOSOS E IONOMÉRICOS CONTENDO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

**FORTALEZA**

**2016**

**PEDRO HENRIQUE ACIOLY GUEDES PEIXOTO VIEIRA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTICÁRIE DE SELANTES  
RESINOSOS E IONOMÉRICOS CONTENDO DIGLUCONATO DE  
CLOREXIDINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Biofilme de Patógenos Orais.

Orientador: Profa. Dra. Lidiany Karla de Azevedo Rodrigues.

**FORTALEZA**

**2016**

---

Página reservada para ficha catalográfica que deve ser confeccionada após apresentação e alterações sugeridas pela banca examinadora.

Para solicitar a ficha catalográfica de seu trabalho, acesse o site:

[WWW.BIBLIOTECA.UFC.BR](http://WWW.BIBLIOTECA.UFC.BR), clique no banner Catalogação na Publicação

(Solicitação de ficha catalográfica)

---

**PEDRO HENRIQUE ACIOLY GUEDES PEIXOTO VIEIRA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTICÁRIE DE SELANTES  
RESINOSOS E IONOMÉRICOS CONTENDO DIGLUCONATO DE  
CLOREXIDINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Biofilme de Patógenos Orais.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Prof. Dra. Déborah Castelo Branco  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fechine  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, por ser meu guia, minha força,  
meu ânimo. E aos meus pais, família e  
amigos que tanto estimo.

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por sempre guiar e iluminar meu caminho, concedendo forças, ânimo e determinação para continuar em busca das conquistas da minha vida. E em momentos difíceis, sendo minha luz, nada seria possível.

A minha **FAMÍLIA**, pelo apoio e por sempre acreditarem no meu potencial desde cedo. E em especial aos meus pais, **PAULO VIEIRA** e **VÂNIA ACIOLY**, educadores e fonte de inspiração. Bem como aos meus irmãos, **PAULO ANDRÉ E DUDU**.

A minha orientadora, **PROFA. DRA. LIDIANY KARLA DE AZEVEDO RODRIGUES GERAGE**, por sua competência e segurança na transmissão do conhecimentos. E, por seu constante incentivo e dedicação dispensados ao longo deste convívio. Admirável pessoa e profissional, feliz por todos os conselhos, ensinamentos e valores a mim repassados.

A minha “co-orientadora” **PROFA.DRA. BEATRIZ GONÇALVES NEVES**, por toda paciência, ensinamento e companheirismo. Agradeço, profundamente, as valiosas contribuições para o trabalho e toda disponibilidade a mim dispensados.

À querida **PROFA. DRA. RAMILLE LIMA**, pela sua receptividade, pela troca de conhecimentos. Um doce de pessoal e profissional exemplar.

A **PROFA. DRA. DÉBORA CASTELO BRANCO**, por toda sua competência e simplicidade admiráveis. Saiba que carrega meu carinho e estima, e meu muito obrigado.

Ao **PROF. DR. PIERRE BASÍLIO ALMEIDA FECHINE**, por sua disponibilidade e contribuição nesse momento tão importante. Fico lisojeando com tal presença.

Aos Professores especiais do PPGMM/UFC que contribuíram muito na minha caminhada, tais: **PROFA. DRA. SÂMIA BRILHANTE**, **PROFA. DRA. CIBELE**

**CARVALHO, PROFA. DRA. ROSSANA CORDEIRO, PROFA. DRA. FERNANDA EDNA MOURA E PROF. DR. JÚLIO SIDRIM**, muito obrigado.

A minha fiel amiga **SARAH GUEDES**, por todo seu apoio, conselhos e ações dispensados a minha pessoa. Por todos momentos, boas risadas, e também pelo companheirismo nos mais delicados. Agradeço por tudo que vivenciamos nessa caminhada, sou grato.

A minha dupla especial **ERNANDA SALES**, amiga e companheira de pesquisa, sempre. Você foi essencial na minha jornada desde à graduação, obrigado por seus valores a mim acrescentados, minha grande amiga.

A querida **MARCELA**, obrigado por toda sintonia e disponibilidade que só cresceram nessa jornada. Tudo foi mais leve, com nossas horas de conversas, risadas e dietas, muito feliz de ter ganhando você, Máh.

Aos colegas da turma de mestrado e da vida em especial **WESLANY MORAIS, MYRNA ARCANJO, LUCIANA ARCANJO, HANIERY, DAVID, ANA CATARINA, SAMILLA, EDMILSON, GLAUTEMBERG, PEDRO QUINTELA, APARECIDA**, obrigado pela troca de conhecimentos e amizades.

À secretária do PPGMM, **CAROLINDA VILMA SOARES DE OLIVEIRA**, pela ajuda prestada, carinho e simpatia constantes.

A Universidade Federal do Ceará, na pessoa do **MAGNÍFICO REITOR PROF. HENRY DE HOLANDA CAMPOS**.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA (PPGMM/UFC)** por todo aprendizado e desafios lançados.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA (PPGO/UFC)** pela parceria e conhecimentos dispensados em minha formação. Todo carinho e dedicação dispensados foram valiosos.

**À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)**, pela concessão de bolsa de estudos.

### **RESUMO**

Os selantes são materiais adesivos aplicados em cicatrículas e fissuras para prevenir *in loco* o início do processo de cárie ou interromper sua progressão. A clorexidina (CLX) é um agente antimicrobiano de amplo espectro, cuja incorporação tem sido testada em diversos materiais odontológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* da incorporação de digluconato de clorexidina (DC) a 0,5% sobre as propriedades anticárie de um selante resinoso (SR) e um selante ionomérico quimicamente ativado (SI). O efeito da incorporação de CLX na rugosidade dos materiais também foi avaliado. Blocos de esmalte dentário bovino (8x8x4 mm) com preparos cavitários foram restaurados utilizando o selante, de acordo com os grupos: SR (Bioseal®-grupo controle), SRDC (Bioseal® + 0,5% de DC), SI (Riva Protect ®) e SIDC (Riva Protect ® + 0,5% de DC). Para a indução de cárie em esmalte, utilizou-se um modelo microbiológico de formação de biofilme de *S. mutans* durante cinco dias, sendo três blocos de cada grupo para cada triplicata experimental. O efeito antimicrobiano foi avaliado através da contagem de UFCs (unidades formadoras de colônia), análise do peso seco e microscopia confocal. Para avaliar a desmineralização, os blocos foram analisados por microdureza longitudinal do esmalte em 50 µm e 100 µm da margem de restauração. Além disso, para cada grupo experimental, corpos de prova de todos os grupos foram analisados quanto ao seu padrão de rugosidade de superfície. Os dados foram analisados utilizando ANOVA (dois fatores), com nível de significância de 5%. SR apresentou menos UFCs quando comparado a SI (p=0,004). Em relação ao peso seco, SR foi menor que o SI (p=0,006). Na análise de dureza à 50 µm, menor desmineralização foi observada para os grupos com ionômero quando comparados àqueles com resina (p<0,001), assim como entre os grupos com CLX quando comparados aos grupos sem CLX (p=0,026). Na distância de 100 µm, os grupos com ionômero apresentaram uma menor desmineralização quando comparados àqueles com resina (p<0,001). A rugosidade em SI foi superior a SR, tanto antes (p=0,032) quanto após a exposição ao biofilme cariogênico (p<0,001). De forma geral, os dados de microscopia confocal a laser (MCLS) forneceram informações condizentes com a eficácia da incorporação de CLX favorecendo a atividade antimicrobiana dos selantes resinosos quando comparada ao selantes ionoméricos. Os materiais ionoméricos têm um

maior efeito anticárie, no entanto a incorporação de DC parece ser mais eficaz e necessária quando da utilização de selantes resinosos.

Palavras- chave: Biofilmes. Cárie dentária. Cimentos de ionômero de vidro. Clorexidina. Placa dentária. Selantes de fóssulas e fissuras. *Streptococcus mutans*.

### **ABSTRACT**

Sealants are materials applied to scars and fissures to prevent onset the onset of the caries process or interrupt its progression. Chlorhexidine (CLX) is a broad spectrum antimicrobial agent whose incorporation has been tested in various dental materials. The objective of this study was to evaluate the in vitro effect of the incorporation of chlorhexidine digluconate (DC) at 0.5% on the properties of a resinous sealant (SR) and a chemically activated ionomeric sealant (SI). The effect of the incorporation of CLX on the roughness of the materials was also evaluated. (Bioseal®-control group), SRDC (Bioseal® + 0.5% DC), SI (Riva Protect®) and SIDC (Riva Protect®) + 0.5% of DC). For an enamel caries induction, a microbiological model of *S. mutans* biofilm formation was used for five days, three blocks of each group for each experimental triplicate. The antimicrobial effect was evaluated by counting UFCs (colony forming units), dry weight analysis and confocal microscopy. To evaluate the demineralization, the blocks were analyzed by longitudinal microhardness of the enamel at 50 µm and 100 µm of the restoration margin. In addition, for each experimental group, test specimens from all groups were analyzed for their surface roughness pattern. Data were analyzed using ANOVA (two factors), with significance level of 5%. SR presented fewer CFUs when compared to SI ( $p = 0.004$ ). Regarding dry weight, SR was lower than SI ( $p = 0.006$ ). In the analysis of hardness at 50 µm, lower demineralization was observed for groups with ionomer when compared to those with resin ( $p < 0.001$ ), as well as between groups with CLX when compared to groups without CLX ( $p = 0.026$ ). In the distance of 100 µm, the groups with ionomer showed a lower demineralization when compared to those with resin ( $p < 0.001$ ). The roughness in SI was superior to SR, both before ( $p = 0.032$ ) and after exposure to cariogenic biofilm ( $p < 0.001$ ). In general, confocal laser microscopy (MCLS) data provided information consistent with the efficiency of CLX incorporation favoring the antimicrobial activity of resinous sealants when compared to ionomeric sealants. The ionomeric materials have a higher anticaryeffect, however the incorporation of DC seems to be more effective and necessary when using resinous sealants.

Key words: Biofilms. Dental caries. Glass Ionomer Cements. Chlorhexidine. Dental Plaque. Pit and Fissure Sealants. *Streptococcus mutans*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Desenho esquemático da barreira mecânica formada por selantes de cicatrículas e fissuras..... 25
- Figura 2 – Estrutura molecular da clorexidina..... 31
- Figura 3 – Modelo microbiológico de formação de biofilme ..... 39
- Figura 4 – Coleta do biofilme sobre a face vestibular do bloco restaurado..... 39
- Figura 5 – Desenho esquemático das indentações realizadas durante a análise de microdureza em corte longitudinal do esmalte..... 41
- Figura 6 – Representação Esquemática do cálculo de perda de dureza ( $\Delta S$ )..... 42
- Figura 7 – Padrão de formação de biofilmes de *S. mutans* em materiais seladores resinosos e ionoméricos, em fotomicrografias obtidas com MCVL.(A) Grupo SR com pequenos conglomerados celulares (seta), sem biofilme formado. (B) Grupo SRDC apresentando biofilme em formação, com células mortas e danificas (vermelho). (C) Grupo SI mostra biofilme estruturado, homogêneo, e celulares organizadas em massa. (D) Grupo SIDC com biofilme desestrururado (setas)..... 53

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Médias e desvios-padrão das unidades formadoras de colônia de *S. mutans* em relação aos diferentes grupos testados. Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p = 0,004$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,122$ ), bem como entre os dois fatores ( $p=0,3170$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05)..... 44
- Gráfico 2 – Média  $\pm$  DP do peso seco ( $\text{mg/ml} \times 10^{-4}$ ) do biofilme acumulado pelos respectivos grupos avaliados. Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p = 0,006$ ) e fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,215$ ). Houve interação entre os dois fatores ( $p = 0,020$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05)..... 45
- Gráfico 3 – Perfil da perda de dureza ( $\Delta S$ ) dos grupos avaliados às distâncias de 50  $\mu\text{m}$  da margem do selante. Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p < 0,001$ ) e fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,026$ ). Não houve interação entre os dois fatores ( $p=0,259$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05). 46
- Gráfico 4 – Perfil da perda de dureza ( $\Delta S$ ) dos grupos avaliados às distâncias de 100  $\mu\text{m}$  da margem do selante (média  $\pm$  DP). Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,097$ ) e interação entre os dois fatores ( $p = 0,094$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05). 47
- Gráfico 5 – Rugosidade de superfície dos espécimes de materiais seladores (média  $\pm$  48

DP), expressos em Ra ( $\mu\text{m}$ ). Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p = 0,032$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,095$ ) e interação entre os dois fatores ( $p = 0,125$ )(ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).

Gráfico 6 – Rugosidade de superfície dos espécimes de materiais seladores (média  $\pm$  DP), expressos em Ra ( $\mu\text{m}$ ). Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,545$ ) e interação entre os dois fatores ( $p = 0,723$ )(ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Descrição dos grupos.....	35
Tabela 2 –	Descrição dos materiais utilizados.....	36
Tabela 3–	Resultados da ANOVA dois fatores (valores de p) para análise de microscopia confocal do biofilme formado sobre o selante.....	50
Tabela 4–	Análise quantitativa de células vivas em biofilme de <i>S. mutans</i> UA 159 crescido por 5 dias.....	51
Tabela 5–	Análise quantitativa de células mortas em biofilme de <i>S. mutans</i> UA 159 crescido por 5 dias.....	52

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CLX	Clorexidina
SR	Selante resinoso
SI	Selante a base de ionômero de vidro
SRDC	Selante resinoso
SIDC	Sistema Integrado de Bibliotecas
UFC	Unidade formadora de colônia
MCVL	Microscopia confocal de varreduta a laser

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Cárie dentária: Aspectos gerais</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Biofilme oral e <i>Streptococcus mutans</i></b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Selamento de cicatrículas e fissuras</b> .....	22
<b>2.4</b>	<b>Selantes resinosos</b> .....	26
<b>2.5</b>	<b>Selantes ionoméricos</b> .....	27
<b>2.6</b>	<b>Clorexidina</b> .....	30
<b>33</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>4.1</b>	<b>Tipo de estudo</b> .....	35
<b>4.2</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	35
<b>4.3</b>	<b>Obtenção das amostras</b> .....	36
<b>4.3.1</b>	<i>Seleção dos dentes e obtenção dos blocos</i> .....	36
<b>4.4.2</b>	<i>Preparo das cavidades</i> .....	37
<b>4.4.3</b>	<i>Preparo dos materiais e restaurações dos blocos</i> .....	37
<b>4.4</b>	<b>Modelo Microbiológico</b> .....	38
<b>4.4.1</b>	<i>Formação do biofilme in vitro e indução de cárie</i> .....	38

4.4.2	<i>Coleta do biofilme/Contagem das UFC</i> .....	39
4.4.3	<i>Análise do peso seco do biofilme</i> .....	40
4.6	<b>Análise da microdureza em corte longitudinal de esmalte</b> .....	40
4.7	<b>Análise da rugosidade de superfície</b> .....	42
4.8	<b>Microscopia confocal de varredura a laser</b> .....	42
4.9	<b>Análise estatística</b> .....	43
5	<b>RESULTADOS</b> .....	44
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58



## 1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença caracterizada pela desmineralização dos tecidos dentários, promovida pela ação de ácidos orgânicos resultantes do metabolismo de carboidratos, especialmente a sacarose, pelos microrganismos presentes no biofilme dental, sendo considerada, portanto, uma doença biofilme-açúcar dependente (BAKRY *et al.*, 2014; CURY *et al.*, 2009; TENUTA *et al.*, 2010). Quando não controlada, a doença cárie pode levar à destruição dos tecidos dentários (FEJERSKOV, 2004).

Esta desordem é considerada ainda como uma das doenças mais prevalentes em todo o mundo, sendo considerado um grande problema de saúde pública em vários países (RADFORD *et al.*, 2000; RAMOS-GOMEZ *et al.*, 2002; PAVINATO; IMPARATO, 2012). Água fluoretada e aplicação tópica de fluoretos reduziram significativamente a cárie dentária na maior parte da população (DEWHIRST, 2016), no entanto esta doença ainda é considerada um problema para alguns indivíduos e populações, especialmente as mais desfavorecidas (AHOVUO-SALORANT *et al.*, 2013).

Um fator primordial relacionado ao processo cariioso é a formação de biofilme (MARSH, 2010), o qual é composto por uma comunidade estruturalmente organizada, de células microbianas aderidas a uma superfície úmida e aglomeradas em uma matriz de polissacarídeos (NASCIMENTO *et al.*, 2014; FLEMING; WINGENDER, 2010). O biofilme é considerado um ecossistema dinâmico e extremamente complexo e a sua relação com a iniciação e a progressão da cárie dentária é inquestionável (MARSH, 2006; DIGE *et al.*, 2014).

Há evidências de que microrganismos Gram-positivos, acidogênicos, acidúricos e com capacidade de aderência às superfícies dentárias, pertencentes a um grupo heterogêneo denominado estreptococos do grupo mutans (EGM), são especialmente envolvidos na dinâmica do processo cariioso (LOESCHE, 1986; PARISOTTO *et al.*, 2010). Estas bactérias são fortemente associadas com cárie dentária em virtude dos seus atributos metabólicos, ecológicos e epidemiológicos (LOESCHE, 1986). Dentre os EGM, *Streptococcus mutans* é considerado o micro-organismo mais cariogênico da microbiota bucal e está relacionado com as diferentes formas de progressão da doença cárie (LIU *et al.*, 2013).

O padrão clínico da cárie dentária difere entre indivíduos, dentes e superfícies. A maioria das lesões cariosas em crianças e adolescentes estão localizadas nas superfícies oclusais de dentes posteriores (AHOVUO-SALORANT *et al.*, 2013). Lesões cariosas em cicatrículas e fissuras englobam aproximadamente 80 a 90% de todas as lesões cariosas em dentes posteriores permanentes e 44% em dentes decíduos (BEAUCHAMP *et al.*, 2008). Assim, a aplicação de métodos para prevenir o estabelecimento da cárie dentária em superfícies oclusais é fundamental, dentre as quais incluem a escovação dentária, controle de dieta, uso de dentifrícios fluoretados, aplicações tópicas profissionais de flúor e uso de selantes de cicatrículas e fissuras (AHOVUO-SALORANT *et al.*, 2013).

Os selantes são materiais adesivos aplicados em fósulas e fissuras para prevenir o início do processo de cárie ou interromper sua progressão, promovendo uma barreira física que inibe a retenção de substratos cariogênicos e de biofilme bacteriano nessa região (AHOVUO-SALORANTA *et al.*, 2008). Além disso, estes materiais constituem uma das formas mais utilizadas no controle da cárie dentária, sendo indicados em pacientes com alto risco ao desenvolvimento desta doença (WELBURY *et al.*, 2004; AHOVUO-SALORANTA *et al.*, 2008; FRENCKEN, 2014), principalmente, quando há presença de dentes com fissuras profundas, estreitas e retentivas (BERGER *et al.*, 2010). Nesses casos, há limitação da ação protetora exercida pela saliva e pelo flúor, dificultando a autolimpeza e a remineralização dentária (SALAMA; AL-HAMMAD 2002; FEATHERSTONE, 2006).

As superfícies oclusais dos dentes posteriores são as áreas mais suscetíveis à retenção de placa, em virtude de sua peculiar configuração anatômica (EKSTRAND; RICKETTS; KIDD, 2001; GOMEZ *et al.*, 2013), com cicatrículas e fissuras que facilitam o acúmulo de restos alimentares e constituem um nicho propício ao desenvolvimento da cárie dentária, que se agrava ainda mais pela dificuldade de autolimpeza e a realização inadequada da escovação dentária desta área (CARVALHO; EKSTRAND; THYLSTRUP, 1991; CARVALHO, 2014).

Em dentes em fase de erupção, há um maior risco para o desenvolvimento de lesões cariosas por ser um período marcado por uma menor mineralização e maior porosidade do esmalte, por ausência da limpeza mecânica promovida durante a mastigação pelo contato oclusal e pela dificuldade de acesso à escovação (KUZMINA; EKSTRAND, 1995; ARROW, 1998; GOMEZ, 2015). Assim, durante a fase de erupção,

que pode se prolongar por até dois anos, os dentes em infra-oclusão, tornam-se mais vulneráveis aos desafios cariogênicos (CARVALHO; EKSTRAND; THYLSTRUP, 1989; EKSTRAND; CHRISTIANSEN, 2005).

Diante das propriedades exigidas para um material selador, incluem biocompatibilidade, anticariogenicidade, retenção, boa integridade marginal, resistência à abrasão e ao desgaste, bem como rentabilidade (SRIDHAR *et al.*, 2016). Os materiais utilizados para selamento de cicatrículas e fissuras são os selantes resinosos ou ionoméricos (FRENCKEN, 2014). Os selantes atuam através de uma barreira física à formação de biofilme ou através da liberação de flúor (FEIGAL, 2002; KLOUKOS *et al.*, 2013), além disso, tais materiais se apresentam como uma opção conservadora aos tratamentos restauradores, possibilitando preservar a estrutura do dente e paralisar a lesão cariiosa, desde que ele permaneça aderido à superfície dentária (BERALDO *et al.*, 2015).

A literatura científica apresenta tentativas de melhorar o desempenho dos materiais restauradores odontológicos, através da incorporação em materiais dentários de agentes com atividade antimicrobiana, como: íons prata, íons zinco, compostos quaternários de amônio, triclosan (RATHKE *et al.*, 2010) e clorexidina (CLX) (MELO *et al.*, 2013; TAKAHASHI *et al.*, 2006). Entre os diversos agentes antimicrobianos utilizados no controle de microorganismos dentários, a CLX é considerada a substância mais segura e eficaz. Esta substância apresenta efeito antimicrobiano, atuando como agente de amplo espectro, bastante efetivo contra micro-organismos gram-positivos e gram-negativos, fungos, leveduras e vírus, bem como possui elevada eficácia contra cepas de *Streptococcus mutans* (WADE; ADDY, 1989; MISTRY *et al.*, 2014).

A clorexidina tem sido incorporada em vários materiais resinosos, como polímeros experimentais (PALLAN *et al.*, 2012), cimentos resinosos (HIRAISHI *et al.*, 2010), *primers* (HIRAISHI *et al.*, 2010), adesivos dentinários (AGUIAR *et al.*, 2015) e nanocompósitos com fosfato de cálcio e fluoretos de cálcio (CHENG *et al.*, 2012). Os estudos demonstram a viabilidade de incorporação de clorexidina em formulações de sistemas resinosos, sem comprometimento das suas propriedades físico-químicas (PALLAN *et al.*, 2012) e também com potencial de inibição de crescimento bacteriano, potencializando o efeito anticárie dos materiais odontológicos (CHENG *et al.*, 2012).

A incorporação de componentes dotados de propriedades antimicrobianas em selantes pode ser uma estratégia eficaz para modificar a cariogenicidade do biofilme e inibir o desenvolvimento das lesões de cárie, através do controle do biofilme por meio da liberação de um agente antimicrobiano *in loco*. Adicionalmente, uma combinação de flúor e liberação de CLX pode apresentar resultados terapêuticos promissores. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano e do controle de lesões de cáries artificiais da incorporação de digluconato de clorexidina em um selante resinoso e em um selante ionomérico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cárie dentária: aspectos gerais

A cárie dentária é uma doença complexa causada por uma desarmonia no equilíbrio fisiológico entre os minerais dos dentes e fluido do biofilme dental. Essa desmineralização pode progredir rapidamente, desenvolver cavitação e envolver a polpa dentária, provocando consequências graves, como dor e infecção da polpa (AAPD, 2014; OBATA *et al.*, 2014).

A doença cárie é resultante de uma alteração no equilíbrio fisiológico entre os íons minerais presentes na estrutura do dente e fluido da placa dentária, representado por processos de desmineralização e remineralização (FERJESKOV, 2004). A mudança na saturação do fluido da placa ocorre pela redução do pH, como consequência da produção de ácido pelas bactérias, causando uma diminuição no nível de pH abaixo de 5,5, o que resulta na desmineralização dos cristais de hidroxiapatita do esmalte e quebra proteolítica da estrutura de tecidos duros do dente. Os processos alternados de diminuição e aumento do pH são seguidos pelos respectivos processos de desmineralização e remineralização da superfície do dente. Em condições saudáveis, esses processos estão em equilíbrio e sem danos permanentes à superfície dental (MELO *et al.*, 2013; STRUZYCKA, 2014).

Fatores externos como condições socioeconômicas, nível de educação e acesso à saúde (HALLETT; O'ROURKE, 2003; HALLETT; O'ROURKE 2006; OLIVEIRA *et*

*al.*, 2008) podem ter um papel importante no estabelecimento da doença cárie. Além disso, fatores locais como dieta rica em açúcares, acesso ao flúor e uso de substâncias antimicrobianas (TEN CATE *et al.*, 1998; THYLSTRUP *et al.*, 1994) podem estar relacionados à alteração dos padrões de desenvolvimento e ao estado de atividade das lesões (HIRSCH *et al.*, 2012; PIOVESAN *et al.*, 2014). No entanto, nenhum fator causal sozinho foi identificado como único responsável pela doença (MALTZ, 2000; BAELUM; FEJERSKOV, 2005).

Quando diagnosticadas, lesões cáries, em estágios iniciais, permitem a adoção de procedimentos de controle clínico, enquanto que, em estágios mais avançados são indicados tratamentos minimamente invasivos, por meio de procedimentos restauradores e da estrutura dental, sempre tendo como objetivo principal o tratamento da doença cárie e a contenção de seus fatores etiológicos, por meio da mudança de hábitos e condutas adotadas pelo paciente e responsáveis (KRAMER; FELDENS; ROMANO, 2003), através da aplicação de flúor, controle de biofilme, modificação da dieta e a orientação e educação dos pacientes ou dos seus responsáveis (ARAUJO *et al.*, 2014).

Já os fatores patológicos incluem bactérias acidogênicas presentes no biofilme dental, que produzem vários ácidos orgânicos após a metabolização de açúcares fermentáveis. Indivíduos com baixo fluxo salivar e alta frequência na ingestão de carboidratos fermentáveis também constituem fator de risco para o desenvolvimento da cárie. Por outro lado, o alto fluxo salivar, enzimas bactericidas presentes na saliva como a lisozima, lactoperoxidase, lactoferrina (LOESCHE *et al.*, 1993), exposição frequente ao flúor e substituição de alguns componentes da dieta como a glicose, sacarose e frutose pelo xilitol, por exemplo, constituem fatores protetores (FEATHERSTONE *et al.*, 2007; ABUCHAIM *et al.*, 2011).

A abordagem primária deve ser baseada na prevenção. Higiene oral adequada, associada ao uso de dentífrício preferencialmente fluoretado, e a restrição da ingestão de carboidratos da dieta é essencial para alcançar o máximo controle de cárie (CURY *et al.*, 2016). O tratamento secundário deve estar centrado na gestão do processo de cárie, com uma abordagem minimamente invasiva e máxima preservação do tecido dental (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Abordagens de adequação do meio bucal através de procedimentos clínicos, dentre eles selamento provisório de cavidades abertas e

remoção de fatores retentivos de placa, podem diminuir risco/atividade de cárie (VOLPATO *et al.*, 2011).

Apesar de a cárie não ser o resultado de deficiência de flúor, esse íon é o único agente terapêutico conhecido por controlar eficazmente a progressão da lesão de cárie, e materiais que liberam flúor podem ser considerados uma forma ou veículo de entrega de flúor. O efeito anticárie do flúor pode ser obtido pelo mesmo modo de ação, independentemente da fonte ou forma de utilização (CURY *et al.*, 2016). Ele pode inibir a desmineralização e promover a remineralização dos tecidos dentários duros. No entanto, a dificuldade de penetração em depósitos de placa residuais poderia diminuir seu poder inibitório, em locais de difícil acesso e estagnação (WATSON *et al.*, 2005). Consequentemente, controle de lesões de cárie em margens de restaurações e em superfícies proximais ainda é um desafio para a pesquisa na área de cariologia (MALTERUD, 2012).

Durante anos, houve dificuldades para distinção da cárie como uma doença de seus sinais. A odontologia restauradora tradicional baseava o diagnóstico e o tratamento da doença cárie quase exclusivamente no reparo da lesão. Uma cavidade, no entanto, é apenas o resultado de uma perda mineral progressiva provocada por cáries, dependente da presença de exposição de biofilme e do açúcar (CURY *et al.*, 2009). Já o atual modelo da Dentística está vinculado a uma promoção de saúde e contempla a verificação da atividade da doença. Além disso, adota medidas educacionais e preventivas, equilibrando o processo de des-remineralização do tecido dental e o progresso da doença (JINGARWAR *et al.*, 2014).

## **2.2 Biofilme oral e *Streptococcus mutans***

Mesmo sendo uma doença influenciada por diversos elementos, sabe-se que a microbiota exerce papel fundamental na etiologia da doença cárie. É relatado na literatura existir mais de 700 espécies de bactérias na cavidade oral, sendo cultiváveis apenas 50-60% das espécies bacterianas identificadas (DEWHIRST *et al.*, 2010).

O biofilme é entendido como uma comunidade microbiana estruturalmente organizada, aderidas a uma superfície úmida e envolta por uma matriz de polissacarídeos de origem microbiana e do hospedeiro (NASCIMENTO *et al.*, 2006;

FLEMING; WINGENDER, 2010; MARSH, 2010). Todos os biofilmes bacterianos possuem pelo menos uma propriedade em comum: a presença de uma matriz, denominada substância extracelular polimérica (EPS). Esta envolve as células e facilita a adesão às superfícies bióticas ou abióticas, além de promover a coesão do próprio biofilme, formando estruturas multicelulares que se ligam firmemente à superfície, comunicando-se entre si. Um dos sistemas de biofilme mais complexos da natureza é a placa dentária humana, e, portanto, serve como um modelo geral para o estudo biológico de biofilmes (XIAO *et al.*, 2012).

O biofilme oral é uma estrutura tridimensional, composta por micro-organismos aderidos a uma superfície dentária, como o esmalte, dentina ou cimento (SMULLEN *et al.*, 2012; KRZYŚCIAK *et al.*, 2013). Inicialmente, a adesão dos micro-organismos à superfície dentária ocorre através da interação específica e inespecífica da película adquirida sobre uma camada de proteínas denominada película adquirida, que é constituída por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e componentes do fluido gengival (MARSH, 2004). Já o desenvolvimento da placa bacteriana dentária pode ser dividido em vários estágios, iniciando com a formação da película e finalizando com a formação da placa madura (FEJERSKOV; KIDD, 2005; SUMEI *et al.*, 2014).

Na superfície dentária, os colonizadores iniciais se aderem à película adquirida - uma camada de proteínas derivada da saliva e/ou dieta (FERJESKOV, 2008). As forças físico-químicas envolvidas na agregação inicial das bactérias são essenciais ao desenvolvimento do biofilme, podendo ser forças inicialmente fracas de longo alcance ( $> 50$  nm) e, em seguida, fortes de pequeno alcance ( $< 5$  nm), intensificadas em função das adesinas na superfície celular microbiana, tornando-se interações específicas, com receptores complementares na película adquirida (ALLAKER, 2010; FERJESKOV, 2008). Essas interações podem ter impacto no sucesso da terapia antimicrobiana na desordem inicial do biofilme (SUTHERLAND, 2001). Após o crescimento desses primeiros colonizadores, o microambiente local torna-se susceptível à sobrevivência de outras espécies em um processo conhecido como sucessão microbiana (FERJESKOV, 2008).

Em relação a cárie dentária, o perfil dos micro-organismos presentes no biofilme dental é decisivo no estabelecimento de uma microbiota virulenta ou não no sentido do desenvolvimento de lesões cariosas; sendo, portanto, mais virulento um biofilme

composto de maior número de bactérias que sobrevivem em meio ácido (acidúricas) e que produzem ácido (acidogênicas), uma vez que o ácido (principalmente o ácido láctico), produzidos por estes, provocará a perda de minerais da superfície do esmalte, dando início à lesão cariiosa; cavitação (BEZERRA ; TOLETO, 2005).

Os estreptococos são micro-organismos constituintes da microbiota oral residente (MARSH; MARTIN, 2005), e são comumente encontrados na cavidade oral e no trato respiratório superior (HAMADA; SLADE, 1990). Dentre estes estreptococos, os isolados mais comuns na mucosa oral são *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*.

O irrompimento dos dentes modifica a microbiota bucal, pois alguns micro-organismos necessitam de superfícies duras para a colonização, como é o caso do *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. Em bebês com poucas semanas de vida, e, portanto, edêntulos, podemos identificar *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* (LENA-PUY *et al.*, 2000; CORREIA, 2000; MARSH; NYVAD, 2005).

Os estreptococos bucais são representados por: *Streptococcus cricetti*, sorotipo a; *Streptococcus rattis*, sorotipo b; *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae*; *Streptococcus downei*, sorotipo h; *Streptococcus sobrinus*, sorotipo d e g; e *Streptococcus mutans*, sorotipos c, e e f (MARSH; MARTIN, 2005; KÖHLER *et al.*, 2003), sendo as duas últimas espécies as mais associadas à cárie dental em humanos (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2011). O *S. mutans* é a mais comum das espécies bacterianas isoladas do biofilme dental humano, sendo a segunda espécie mais prevalente o *S. sobrinus* (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

O *S. mutans* é considerado o microrganismo mais cariogênico da microbiota bucal e envolvido em todos os tipos de cárie dentária (LIU *et al.*, 2013). *S. mutans* são bactérias Gram-positivas, do grupo viridans, com morfologia de cocos, catalase-negativas. Estes micro-organismos são associados em todos os estágios de lesão de cárie, consumo de sacarose e produção de ácidos relacionados a dissolução da estrutura dentária (BADET; THEBAUD, 2008; LIU *et al.*, 2013).

Evidências apontam o *S. mutans* como principal agente patogênico microbiano relacionado à doença cárie, em virtude de seus atributos metabólicos, ecológicos e epidemiológicos (LEMOS; BURNE, 2008; TAKAHASHI; NYVAD, 2011). A virulência de *S. mutans* reside em três atributos essenciais: a habilidade para formar

biofilme, a produção de grandes quantidades de ácidos orgânicos (acidogenicidade), e a tolerância ao estresse ambiental, particularmente pH baixo (aciduricidade) (LAW *et al.*, 2007; SHAW, 1987; SHEN *et al.*, 2004). Embora o *S. mutans* seja um dos microrganismos cariogênicos mais pesquisados, estudos têm sugerido que a etiologia da cárie dentária pode envolver comunidades mais complexas de espécies bacterianas (BECKER *et al.*, 2002; VAN HOUTE, 1994).

Estudos têm identificado outros patógenos envolvidos na cárie dentária, tais como *Bifidobacterium* (BECKER *et al.*, 2002; AAS *et al.*, 2008; MANTZOURANI *et al.*, 2009; PALMER *et al.*, 2010), *Lactobacillus* (BECKER *et al.*, 2002.; AAS *et al.*, 2008) e *Actinomyces* (MARCHANT *et al.*, 2001). Todos estes microrganismos são potenciais produtores de ácido e capazes de sobreviver em ambiente ácido (TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

Pesquisas relacionadas a expressão do *S. mutans* (ZHU *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2003; REDMO *et al.*, 2003; NAKANO *et al.*, 2005) afirmam o sequenciamento genético totalmente sequenciado (AJDIC *et al.*, 2002), sendo constituído por 2.030.936 pares de nucleotídeos. As funções de aproximadamente 63% destes genes já estão conhecidas, como manutenção de seu metabolismo, defesa contra mecanismos do hospedeiro e outras espécies bacterianas, o que pode levar a novas estratégias para a prevenção e tratamento da cárie dentária.

Apesar da importância da microbiota e da compreensão de seus mecanismos moleculares, a doença cárie é baseada na coexistência de múltiplos fatores, como a dieta, e o tempo envolvido no processo, além de fatores comportamentais, culturais e sociais inerentes ao hospedeiro (MARSH, 1991). Fatores como renda familiar, nível de educação e assistência médica são fatores já citados em pesquisas como contribuintes ao surgimento e desenvolvimento da doença cárie (HALLETT; O'ROURKE, 2003, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e devem ser lembrados para o entendimento e diagnóstico da doença (CATÃO *et al.*, 2012).

### **2.3 Selamento de cicatrículas e fissuras**

A cárie dentária se apresenta como uma doença passível de ser prevenida e controlada (KRAMER, 2003). Lesões diagnosticadas em estágios iniciais no esmalte permitem a adoção de procedimentos de paralisação e controle. Em estágios mais avançados, podem ser realizados tratamentos minimamente invasivos, por meio de procedimentos restauradores conservadores da estrutura dentária, levando-se em consideração os fatores etiológicos (MARINHO, 1998; PITTS, 2004; CATÃO, 2012).

Cada vez mais, a atenção da área odontológica se volta para o aperfeiçoamento de técnicas que visem à prevenção da instalação de lesões cariosas (KRAMER, 2010), envolvendo desde a orientação sobre controle da dieta e higiene bucal, até o uso de fluoretos e selamento de cicatrículas e fissuras na prática clínica (BRAGA *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a Odontologia vem alcançando grande desenvolvimento tecnológico e científico. A partir das décadas de 1960 e 1970, em países mais desenvolvidos, houve uma redução contínua nos níveis da doença cárie, e esse avanço preventivo se faz presente em populações de países industrializados e em alguns países em desenvolvimento (SELWITZ, ISMAIL, PITTS, 2007; SPLIETH *et al.*, 2010). Segundo o SB Brasil 2010, o índice de cárie da população reduziu nos últimos sete anos, com isso, entrando para o grupo de países com baixa prevalência de cárie. Isso pode estar associado à melhoria dos indicadores de saúde geral, alterações nos critérios de diagnóstico e tratamento da doença cárie e, principalmente, à utilização extensiva de medidas preventivas importantes (LOCKER *et al.*, 2003; YENGOPAL *et al.*, 2010).

A redução dos índices não afetou a população de modo homogêneo, tendo sido observado que a população menos favorecida, a de menor nível socioeconômico, continua apresentando os índices mais elevados da doença cárie. Assim, a cárie dentária ainda está entre as doenças mais prevalentes entre todas as agressões à saúde humana, constituindo-se em um grave problema de saúde pública no mundo. Acredita-se que, para reverter este quadro, a implementação de cuidados básicos, enfatizando a promoção e a prevenção da saúde bucal aos grupos mais vulneráveis, pode melhorar a qualidade de vida da população, diminuindo a polarização da doença (MICKENAUTSCH; YENGOPAL, 2011; LOPES E SILVA; SILVA, 2015).

Cabe ressaltar que a diminuição nos índices de cárie ocorreu na maior parte em superfícies lisa e proximal dos dentes, no entanto os índices de cárie para superfícies oclusais não apresentaram redução, devido às práticas de higiene oral e tratamentos fluoretados não serem tão eficientes na prevenção da doença em cicatrículas e fissuras

quanto em superfícies lisas (YOUNG *et al.* 2015; DYE *et al.*, 2016). Dados mostram que 21% das crianças em idade 6 a 11 anos e 58% dos adolescentes com idades entre 12 a 19 anos apresentaram experiência de lesões de cárie (não tratada e tratada) em seus dentes permanentes (DYE *et al.*, 2015). Além disso, estudos têm demonstrado que apenas 16% da prevalência da cárie dentária em crianças entre 5 e 17 anos ocorrem em superfícies lisas, enquanto 84% envolvem superfícies com cicatrículas e fissuras (TELLEZ *et al.*, 2011; BROUWERS; KERKVLIT; SPITHOFF, 2016)

O selamento de cicatrículas e fissuras é uma das medidas mais utilizadas na prevenção da cárie oclusal, uma vez que constitui um método seguro e viável (BERNARDO *et al.*, 2000, AAPD, 2008; MICKENAUTSCH; YENGOPAL, 2011). Revisões sistemáticas, com o foco em estudar alternativas para o tratamento de lesões de cárie incipientes, concluíram que o selamento de lesões cariosas é a abordagem mais efetiva para lesões restritas ao esmalte (SUNDFELD *et al.*, 2002; BADER *et al.*, 2006).

A técnica de selamento de cicatrículas e fissuras foi introduzida na década de 1960 a partir de uma mistura de cianocrilato e polimetilmetacrilato adicionados a uma solução inorgânica (CRAIG *et al.*, 1997). Apresenta como vantagens a diminuição da incidência de cárie quando comparado a um dente não selado, e baixo custo comparado ao tratamento restaurador (SIMONSEN, 1997; YOUNG; FEATHERSTONE, 2010). Porém, os benefícios da prevenção no tratamento dependem da capacidade do material em preencher as áreas anatômicas da superfície oclusal, e possuir retenção prolongada (AUTIO-GOLD, 2002; YENGOPAL *et al.*, 2009).

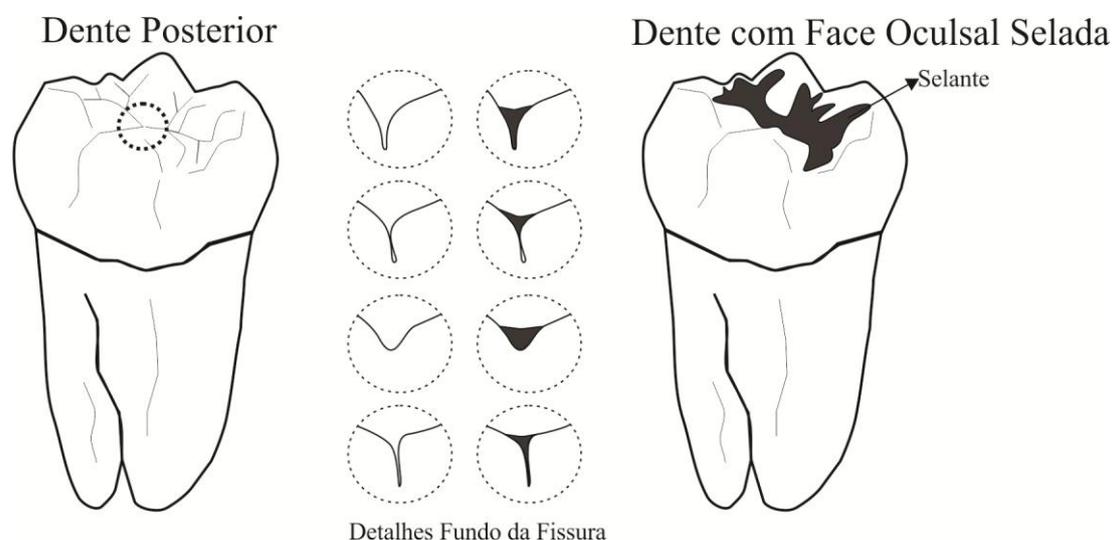
Os dois materiais seladores mais comumente utilizados são os selantes resinosos e os selantes ionoméricos. Os selantes resinosos possuem altas taxas de retenção, porém são clinicamente limitados pelas dificuldades quando não há adequado controle da umidade (BEIRUTI *et al.*, 2006; BHAT *et al.*, 2013). Como alternativa, foi proposto o selamento com cimentos ionoméricos convencionais. Este material apresenta vantagens como a liberação contínua de flúor, a tolerância à umidade e o curto tempo de aplicação (ANUSAVICE; SHEN; RAWLS, 2013).

Em relação à evidência de efetividade, uma revisão da Cochrane concluiu que os selantes aplicados em superfícies oclusais de molares permanentes de crianças e adolescentes reduziu cárie em até 48 meses, quando comparado com nenhuma aplicação de selante (AHOVUO-SALORANTA *et al.*, 2013). De acordo com uma meta-análise de 24 estudos, a efetividade de selantes auto-polimerizáveis na prevenção da cárie dentária foi de 71% (LLODRA *et al.*, 1993). Outra revisão Cochrane verificou que a

aplicação de selantes resinosos em crianças e adolescentes reduz a incidência de cárie de 86% após um ano e 57% com 48 a 54 meses (AHOVOU- SALORANTA *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação dos selantes está associado à formação de uma barreira protetora, adesiva e micromecânica (Figura 1), esta barreira pode estar associada à liberação de flúor que interfere na físico-química do processo de cárie, diminuindo a velocidade de progressão das lesões (SIMONSEN, 2002; BORSATTO; ASSED, 2005; CHEN *et al.*, 2013). Assim, o selante além de agir no controle da cárie dentária, também pode promover a diminuição do acúmulo de biofilme no local (BERNARDO *et al.*, 2000; MACEDO, 2010). Estudos clínicos longitudinais têm demonstrado a excelência desses materiais no que se refere à capacidade de proteção da superfície sobre a qual são aplicados contra o desenvolvimento e/ou progressão de lesões de cárie (MEJÀRE *et al.*, 2003; SPLIETH *et al.*, 2010; MICKENAUTSCH; YENGOPAL, 2011).

Figura 1 . Desenho esquemático da barreira mecânica formada por selantes de cicatrículas e fissuras.



Fonte: Autor, 2016

Em relação ao tipo de material, os selantes podem ser resinosos com ou sem flúor, ter ativação química ou fotopolimerizáveis (BOMBONATTI *et al.*, 2003; LOPES E SILVA; SILVA, 2015). Existem ainda os selantes ionoméricos que, apesar da sua menor capacidade de retenção, são indicados pela sua liberação de flúor e pela biocompatibilidade (HESSE *et al.*, 2007). Nesta categoria, ainda são citados os do tipo

resinosos modificados por poliácidos e ionoméricos modificados por resinas (ABREU *et al.*, 2006; LOSSO *et al.*, 2009; SAN MARTIN *et al.*, 2013).

A indicação dos selantes resinosos ou dosselantes ionoméricos está associada às suas características e ao senso clínico do profissional para eleger aquele mais conveniente às necessidades individuais do paciente (AAPD, 2008). Os selantes resinosos apresentaram uma probabilidade cumulativa de 86,3% de redução de cárie após um ano de sua aplicação (CUETO; BUONOCORE, 1967; SILVA; ARAÚJO; REGO, 1996). Enquanto que os cimentos de ionômero de vidro exercem uma ação remineralizante mais efetiva, porém suas propriedades mecânicas são inferiores aos resinosos (BAYRAK *et al.*, 2010; HOLMGREN; LO; HU, 2013).

## 2.4 Selantes resinosos

Desde a década de 1960, o material mais utilizado para selamento de cicatrículas e fissuras tem sido os selantes à base de Bis-GMA, ditos selantes resinosos. Estes materiais são definidos como polímeros sintéticos, fluidos desenvolvidos para serem aplicados sobre a superfície oclusal de dentes suscetíveis ao desenvolvimento de lesões cariosas, formando uma camada protetora, que dificulta a retenção de restos alimentares e formação do biofilme (RIPA, 1993; FLEISCH *et al.*, 2010).

A técnica preventiva foi iniciada com o uso de selantes resinosos a base de metilcianocrilato e foi documentada pioneiramente em um estudo clínico de selantes de cicatrículas e fissuras (CUETO; BUONOCORE, 1967). Em seguida, o material resinoso a base de Bis-GMA foi idealizado, proporcionando o surgimento de diversos selantes e compósitos resinosos atuais (AHOVUO-SALORANTA *et al.*, 2013).

Quimicamente, esses materiais seladores são ditos monômeros de dimetacrilatos, à base de BIS GMA (bisfenol glicidil metacrilato) ou TEGDMA (com ou sem carga, podendo ser polimerizados quimicamente ou por fotoativação) (PAULA E SILVA *et al.*, 2011; FRANÇA, *et al.*, 2010). Outros dimetacrilatos como UDMA (uretano dimetacrilato) podem ser utilizados na composição desses tipos de materiais (YENGOPAL *et al.*, 2010; SUBRAMANIAM *et al.*, 2008; BAYRAK *et al.*, 2010). De modo geral, os selantes a base de resina são divididos em gerações de acordo com seus mecanismos de polimerização. A primeira geração ativada por luz ultravioleta, a segunda geração que são os materiais autopolimerizáveis, a terceira ativada por luz

visível, e a quarta que são os selantes contendo fluoretos (BEAUCHAMP *et al.*, 2009; AHOVUO-SALORANTA *et al.*, 2013).

Quanto as suas especificações, são classificados em: com carga, que possuem apresentam maior resistência e viscosidade, fazendo com que este material penetre nos sulcos profundos com maior dificuldade; os sem carga, que não possuem partículas e, conseqüentemente apresentam menor viscosidade e resistência (LOSSO *et al.*, 2008; BRAGA *et al.*, 2010; PROVENZANO *et al.*, 2010; NOGOURANI *et al.*, 2012). A presença ou não de carga está diretamente relacionada à formação de maiores ou menores prolongamentos resinosos ou *tags*, associados à adesão e à resistência do material (VIEIRA *et al.*, 2006; AZARPAZHOOH; MAIN, 2008; BERALDO *et al.*, 2015). Os selantes resinosos apresentam diferentes matizes: transparente, opaca ou cromatizada, sendo as duas últimas mais utilizadas na clínica diária, devido à facilidade em sua visualização durante a aplicação (FEJERSKOV, 2004; BRAGA, 2010).

O isolamento do campo operatório bucal é um dos mais importantes aspectos no que tange à aplicação de selantes a base de resina, uma vez que o condicionamento ácido permite a retenção mecânica do material a partir de *tags* resinosos (MULLER-BOLLA *et al.*, 2006; FRENCKEN; WOLKE, 2010). A maioria dos estudos reportados com o uso desse tipo de selante não utilizam isolamento absoluto, e sim, isolamento relativo que fazem uso de roletes de algodão, fator que pode acabar prejudicando a aplicação correta do material e, de certa forma, a retenção do material ao longo do tempo (CHEN *et al.*, 2012; BASEGHIIO *et al.*, 2010).

Embora a maioria dos selantes oclusais disponíveis seja resinoso (tipo BIS-GMA), o interesse no uso do cimento de ionômero de vidro tem aumentado, pois apesar da retenção ser crítica quando comparada a dos selantes resinosos, quando se avalia o efeito protetor, ou seja, o desenvolvimento ou não de lesões de cárie, os resultados são semelhantes (YENGOPAL *et al.* 2010). Os primeiros e segundos molares permanentes, assim como os segundos molares decíduos, são os dentes mais importantes a serem selados devido à morfologia oclusal e ao fato de que a maior susceptibilidade à cárie oclusal ocorre no período entre o início da erupção do dente e a oclusão funcional, sendo a época ideal para o selamento (IMPARATO *et al.*, 2010). Também tem sido aceito que os selantes sejam aplicados em superfícies que apresentam lesão de cárie incipiente, com o objetivo de conter o desenvolvimento da doença (BAUSELLES *et al.*, 2011).

## 2.5 Selantes ionoméricos

No início da década de 1970, baseado em estudos com o cimento de silicato, foi descoberto o cimento de ionômero de vidro (CIV), descrito como um novo cimento odontológico translúcido e deram o nome de ASPA (aluminosilicate-poliacralato) ou cimento de ionômero de vidro (WILSON; KENT, 1972). Este cimento também chamado de cimento ionomérico ou cimento de polialcenoato de vidro é composto por pó e líquido. O pó é constituído de sílica, alumina e fluoreto de cálcio, já o líquido é uma solução aquosa de ácidos polialcenóicos com aceleradores de presa (QUEIROZ, 2003; BARRETO, 2007; PADOVANI, 2008).

Os CIVs são bastante utilizados na Odontologia, sendo derivados de ácidos orgânicos, geralmente um ácido polimérico aquoso e um componente de vidro, como o fluor-alumínio-silicato (MOSHAVERINIA *et al.*, 2011; VAN NOORT, 2000). Estes materiais apresentam muitas formulações que conferem grande versatilidade e eficácia clínica, justificando sua indicação para uma variedade de situações, tais como forrador de cavidades, agente de cimentação, selantes de cicatrículas e fissuras e restaurações dentárias (BERG *et al.*, 2015). O CIV é considerado um material restaurador de alta relevância clínica, especialmente por sua biocompatibilidade, capacidade de liberação e reincorporação de flúor ao longo do tempo e coeficiente de expansão térmica semelhante ao da estrutura dentária (KOVARIK *et al.*, 2005).

Quanto a sua composição química, os CIVs podem ser classificados em convencionais (pó de partículas vítreas e líquido - polialcenóicos); os reforçados por metais (mistura do pó convencional com partículas de liga de amálgama ou de prata sintetizada com as partículas de vidro); e os modificados por resina (parte do ácido polialcenóico é substituído por hidroxietilmetacrilato - HEMA) (CHEN *et al.*, 2012; MICKENAUTSCH *et al.*, 2013; SIMONSEN, 2011; AZEVEDO, *et al.*, 2010).

Em relação à indicação do material, os CIVs podem apresentar uma maior aplicabilidade, sendo classificados como Tipo I (indicados para a cimentação de incrustações, coroas, próteses e dispositivos ortodônticos), Tipo II (indicados para restaurações), Tipo III (indicados para forramentos ou base e selamentos de cicatrículas e fissuras) e Tipo IV (indicados para as mesmas indicações do tipo I e III) (IMPARATO *et al.*, 2009, FOOK *et al.*, 2008).

Entre os materiais restauradores dentários, o CIV é considerado o mais cariostático, devido à sua liberação de flúor. O potencial anticárie do flúor advém da

atuação desse íon diminuindo a desmineralização e facilitando a remineralização (WIEGAND *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2011). Esses íons, disponíveis mais frequentemente no meio bucal, podem, de forma efetiva, diminuir a taxa de progressão da lesão em cada superfície dentária, onde ocorre acúmulo de biofilme e exposição regular a açúcares da dieta (CURY *et al.*, 2016). Embora o flúor seja a mais importante substância anticárie, seu efeito antibacteriano é limitado, pois sua atuação sobre o metabolismo das bactérias ocorre apenas em concentrações de 10 ppmF ou superior, portanto, impossibilitando sustentar essa concentração no biofilme (BRADSHAW *et al.*, 2002; MARINHO, 2008).

Os CIVs convencionais possuem menor resistência ao desgaste, à tração e ao cisalhamento e apresentam problemas de sinérese e embebição durante a geleificação (CHEN *et al.*, 2012; ANUSAVICE; SCHEN; RAWLS, 2013), que podem ser explicadas pelas diferentes cadeias poliméricas ou pela interação destas com as partículas do pó (COSTA *et al.*, 2010). Os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMR) desenvolvem melhores características de trabalho, melhor resistência e estética. O Bis-GMA (Bisfenol-A e Glicidilmetacrilato) é incorporado na composição desse cimento tornando-o um material com propriedades mecânicas mais favoráveis (VIEIRA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2011). Além disso, o material passou a ser mais translúcido, proporcionando uma estética mais adequada (ARAÚJO *et al.*, 2014; ANUSAVICE; SCHEN; RAWLS, 2013).

As principais propriedades do CIV são a contínua liberação de íons fluoreto e a possibilidade de sofrer recargas, ao ser exposto novamente ao flúor, atuando como um reservatório na cavidade bucal, poder antimicrobiano e atividade anticariogênica e cariostática (HANNIG; HANNIG, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2010; BAHROLOLOOMI *et al.*, 2014). A aplicação dos selantes ionoméricos sobre a superfície oclusal acelera o processo de maturação pós-eruptiva favorecido pela liberação de íons flúor para a superfície do esmalte dentário, promove o vedamento das cicatrículas e fissuras e ainda as superfícies desmineralizadas pelo processo cariioso podem ser remineralizadas (FRAGA *et al.*, 2010).

O CIV pode ser utilizado como selante de cicatrículas e fissuras, para obter efeitos preventivos adicionais causados pela liberação de flúor desses materiais, ressaltando que por ser de baixo custo e apresentar boa efetividade, é um cimento muito utilizado na rede pública de saúde (VIEIRA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2010). O CIV quimicamente ativado ou convencionais são indicados

como selantes de cicatrículas e fissuras para situações em que a presença da umidade comprometeria a utilização de selantes resinosos (ADA, 1987). Portanto, em dentes recém-erupcionados ou ainda na presença de manchas brancas ativas, o selante ionomérico está indicado pois têm ação remineralizadora pela liberação de flúor. Entretanto, são considerados “selantes temporários” devido sua reduzida retenção à superfície dentária (FORSS; HALME, 1988; POULSEN, 2001).

Estudos comparando os efeitos retentivos dos selantes observaram menor retenção dos selantes ionoméricos em relação aos resinosos, entretanto, sugerem que seu efeito cariostático pode se manter mesmo com a perda parcial ou total do selante, uma vez que, partículas microscópicas permanecem no interior das fissuras liberando flúor (SIMONSEN *et al.*, 2002; PARDI *et al.*, 2005; CATÃO; RODRIGUES; SILVA, 2013; WRIGHT *et al.*, 2016). É importante resaltar que os selantes ionoméricos podem ter um risco 5 vezes maior de sofrer perda de retenção do dente em comparação aos selantes resinoso, após 2 a 3 anos de acompanhamento (WRIGHT *et al.*, 2016).

## **2.6 Clorexidina (CLX)**

O controle químico é outra maneira de se prevenir a instalação de doenças na cavidade bucal (PRABHAKAR; PATTANSHETTI; SUGANDHAN, 2013; VOLPATO *et al.*, 2011). Várias tentativas de melhorar as propriedades antimicrobianas dos materiais odontológicos vêm sendo relatadas. Dentre as quais liberação de agentes antimicrobianos de baixo peso molecular, incluindo íons de zinco, íons prata, antibiótico e clorexidina (IMAZATO, *et al.*, 2003; XIE *et al.*, 2011; AYDIN SEVINC; HANLEY, 2010; IMAZATO *et al.*, 2012; SHAPIRO *et al.*, 2002).

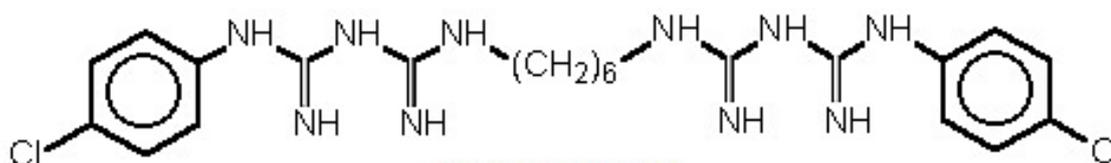
A CLX tem apresentado melhores resultados devido às suas propriedades, tais como: alta substantividade, eficiência clínica, estabilidade e segurança. Portanto, a utilização desse agente antimicrobiano pode ser benéfica para suprimir a população bacteriana e reduzir o risco da cárie dentária (TANG; SENSAT; STOLTENBERG, 2015). Pesquisas vêm incorporando a CLX, em diferentes concentrações, em resinas, cimentos de ionômero de vidro e selantes resinosos (JEDRYCHOWSKI *et al.*, 1983; SANDERS *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2006; FEATHERSTONE *et al.*, 2006; TÜRKÜN *et al.*, 2008; SHANMUGAAVE *et al.*, 2015). Todas as formas de incorporação de CLX (TAKAHASHI *et al.*, 2006; DEEPALAKSHMI *et al.*, 2010;

PASHLEY *et al.*, 2011) melhoram a atividade anticariogênica, porém podem influenciar nas propriedades mecânicas do material (FARRUGIA; CAMILLERI, 2015).

A CLX foi sintetizada na década de 40 e introduzida no mercado em 1954 como anti-séptico para ferimentos na pele (DAVIES *et al.*, 1954). Pioneiramente, foi utilizada por Loe e Schiott (1970), que demonstraram que bochechos de uma solução de digluconato de clorexidina a 0,2%, realizados 2 vezes por dia, se mostraram efetivos em diminuir o crescimento do biofilme bacteriano.

Quimicamente, a CLX é definida como um sal constituído de dois anéis fenólicos clorados e de dois grupos bisbiguanida, ligados por um centro de cadeia hexametileno (HULL, 1980; KOCAK *et al.*, 2009; VERKAIK *et al.*, 2011). Possui fórmula química  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$  (Figura 2), caracterizada por ser um álcali forte praticamente insolúvel em água (MOHAMMADI Z; ABBOTT, 2009). No entanto, quando associada a sais, pode ser aplicada em formulações desinfectantes, tais como: diacetato de clorexidina, digluconato de clorexidina e hidrocloreto de clorexidina (EDEN, 2016).

Figura 2. Estrutura molecular da clorexidina ( $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ )



Fonte: Autor, 2016

A CLX se caracteriza como agente de amplo espectro (DE PAOLA; SPOLARICH, 2007), sendo bastante efetiva contra micro-organismos gram-positivos e gram-negativos, vírus, fungos e leveduras (FARIAS *et al.*, 2003; RECHE, 2005; EDEN *et al.*, 2016). Essa substância é caracterizada por uma base dicatiônica forte, o que a torna muito interativa com ânions. Um dos cátions da CLX se fixa a película adquirida sobre o dente e o outro fica livre para interagir com as bactérias que estão tentando colonizar as superfícies bucais (JENKINS *et al.*, 1988). Dessa forma, o efeito antimicrobiano da CLX ocorre pela atração e adsorção das moléculas catiônicas da CLX à superfície celular aniônica dos micro-organismos. Essa interação promove alteração da permeabilidade celular, resultando na perda dos componentes intracelulares e no desequilíbrio osmótico celular (HENNESSEY, 1973; DELANY *et al.*, 1982;

GOMES *et al.*, 2006). Também possui capacidade de inibir a ação da glicosiltransferase, uma enzima responsável pelo acúmulo de bactérias na superfície dental. Apresenta também efeito sobre o transporte de açúcar e a produção de ácidos pelas bactérias orais (TORRES *et al.*, 2000; RIBEIRO; HASHIZUME; MALTZ, 2007). O efeito antimicrobiano da CLX é dose-dependente, em baixas concentrações (0,02%-0,06%) possui atividade bacteriostática, enquanto em concentrações mais elevadas (> 0,12%) atua como bactericida (JENKINS; ADDY; WADE, 1998; BARON *et al.*, 2012). Sua ação bactericida é devida ao extravasamento dos constituintes celulares com baixo peso molecular e a precipitação do conteúdo da célula. Quando sua ação é bacteriostática, interfere na função da membrana celular, incluindo o transporte básico e manutenção dos gradientes de íons (BENGEL, 1981; ANUSAVICE, 1998; MATTHIJS; ADRIAENS, 2002; BIZHANG *et al.*, 2007).

A CLX tem sido bastante aplicada em Odontologia em enxaguatórios bucais, aerossóis e formulações em *spray* (0,12-0,2%), géis e fios de limpeza dentais (0,12-1%), vernizes dentários (1%, 10%, 40%) bem como em dentifrícios (BARON *et al.*, 2012; PUIG SILLA; MONTIEL COMPANY; ALMERICH SILLA, 2008).

A CLX apresenta baixa evidência de toxicidade sistêmica em seres humanos, e também não tem sido associada a quaisquer alterações teratogênicas ou carcinogênicas (CHANG *et al.*, 2001; CABRAL; FERNANDES, 2007; GIANELLI *et al.*, 2008). Os efeitos adversos dessa substância têm sido descritos em vários estudos, tais como: descamação reversível da mucosa, alterações do paladar, pigmentação de restaurações e dentária, que pode ser removida facilmente com profilaxia dental profissional (BAY, 1978; MACHADO, 2007). Entretanto, tais efeitos são proporcionais à dosagem e ao tempo de uso (ZUCCO *et al.*, 2009). Cabe salientar que algumas substâncias químicas, como o cálcio, detergentes aniônicos e flúor podem influenciar as ligações da CLX, reduzindo sua retenção e sua atividade antibacteriana (SHAPIRO *et al.*, 2002; TOMÁS *et al.*, 2009).

Como a cárie dentária é uma doença biofilme dependente, as intervenções baseadas na CLX se mostraram eficazes na supressão do crescimento bacteriano, em particular *Streptococcus mutans*, constituindo uma importante estratégia para a prevenção da cárie dentária (CAUFIELD, 2001; TWETMAN, 1998; TWETMAN, 2004). Como a CLX parece ter melhor efeito quando da ausência de biofilme formado, a liberação *in loco* e contínua vem sendo testada. Desta forma, estudos investigando o

uso de agentes antimicrobianos, mais especificamente o digluconato de CLX, em combinação com materiais odontológicos vêm sendo desenvolvidos numa abordagem *in vitro* (HOSZEK, ERICSON, 2008; JEDRYCHOWSKI *et al.*, 1983; TAKAHASHI *et al.*, 2006; DEEPALAKSHMI *et al.*, 2010.; SANDERS *et al.*, 2012; PASHLEY *et al.*, 2011; DE CASTILHO *et al.*, 2013) e *in vivo* (FRENCKEN *et al.*, 2010).

A adição de CLX pode ser realizada tanto com diacetato de clorexidina quanto com digluconato de clorexidina (PASHLEY *et al.*, 2011; DE CASTILHO *et al.*, 2013). Diferentes formas de incorporação de CLX podem apresentar atividade antibacteriana frente a bactérias cariogênicas, mas dependendo da concentração, um declínio nas propriedades mecânicas dos materiais pode ser identificado (HOSZEK *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 1991; JEDRYCHOWSKI *et al.*, 1983). Concentrações elevadas, 1, 25% a 2,5% de CLX resultaram em efeitos duradouros, acompanhados por uma maior deterioração do material (RIBEIRO, *et al.*, 1991; TÜRKÜN *et al.*, 2008).

A adição de digluconato ou diacetato de clorexidina ao ionômero de vidro resultou em propriedades antibacterianas a longo prazo contra *S. mutans* e *L. acidophilus* sem danos às propriedades físicas do material. As propriedades antibacterianas, físicas e de ligação ideais foram obtidas com a incorporação de diacetato de clorexidina a 1% (TÜRKÜN *et al.*, 2008). As propriedades antibacterianas desta formulação também foram confirmadas com um ensaio *in vivo* (FRENCKEN *et al.*, 2007; MATHEW *et al.*, 2013), e concentrações de 2% de digluconato de clorexidina podem apresentar menor resistência a compressão do material (TÜZÜNER; ULUSU, 2012). Uma concentração de 0,5% de digluconato de CLX resultou em aumento da atividade antibacteriana sem redução nas propriedades mecânicas (MARTI *et al.*, 2014). Atividade antibacteriana contra *S. mutans* tem sido identificada em cimentos de ionômero de vidro convencionais incorporados com CLX quando comparados aos cimentos de ionômero de vidro sozinhos em estudos *in vitro* (MARTI *et al.*, 2014; KABIL; BADRAN; WASSEL, 2016; LEWINSTEIN *et al.*, 2012; DEEPALAKSHMI *et al.*, 2010), bem como em estudos *in vivo* (DU *et al.*, 2012; KABIL; DE CASTILHO *et al.*, 2013; BADRAN; WASSEL, 2016).

Em relação à biocompatibilidade dos cimentos incorporados, verificou-se que a concentração de 18% de CLX mostrou ter um efeito tóxico, enquanto, a concentração de 10% foi adequada para o contato tecidual em estudo *in vivo* em animais (LACERDA-SANTOS *et al.*, 2016).

Outros estudos têm sido descritos na literatura envolvendo a adição de CLX em materiais resinosos conferindo-lhes também uma atividade antibacteriana (JEDRYCHOWSKI *et al.*, 1983; LEUNG *et al.*, 2005; KOWN *et al.*, 2010; CHENG *et al.*, 2012). No entanto, pouco se tem pesquisado a respeito da incorporação de CLX em selantes resinosos (SHANMUGAAVEL *et al.*, 2015), principalmente quando se compara sua atividade anticárie que aquela obtida por selantes ionoméricos incorporados. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito anticárie da adição de digluconato de CLX a 0,5% a um selante ionomérico e um selante resinoso frente a biofilme monoespécie de *S. mutans*, principal agente microbiano relacionado a cárie dentária.

### **3OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da inclusão de digluconato de clorexidina a 0,5% em selante resinoso e selante ionomérico quimicamente ativado na inibição de biofilme cariogênico de *S. mutans* e lesões de cáries artificiais em esmalte bovino ao redor dos materiais.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar o efeito da adição de digluconato de clorexidina a 0,5% em biofilme formado sobre os espécimes contendo os materiais, através da contagem de micro-organismos viáveis, peso seco e análise de microscopia confocal do biofilme;
- Analisar a desmineralização ao redor de cavidades preenchidas com materiais seladores, através da dureza em corte longitudinal do esmalte;
- Aferir o efeito da incorporação de digluconato de clorexidina na rugosidade de superfície dos materiais seladores antes e após sua exposição a biofilme cariogênico de *S. mutans* através de perfilometria mecânica.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de Estudo**

Trata-se de um estudo quantitativo, do tipo investigação experimental em laboratório ou *in vitro*. Os procedimentos laboratoriais foram executados nos Laboratórios de Pesquisa e Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará e no Laboratório de Patógenos Emergentes e Re-emergentes (LAPERRE) do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará.

### **4.2 Delineamento experimental**

Foram utilizados 36 dentes bovinos para obtenção de 36 blocos de esmalte, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo utilizadas três unidades amostrais em cada grupo por triplicata de experimento microbiológico. Os grupos estudados estão descritos na Tabela 1. Na Tabela 2, estão descritas as especificações dos materiais testados.

O estudo *in vitro* foi conduzido de acordo com um delineamento em blocos onde os fatores em estudo foram: tipo de material em dois níveis, selante resinoso e selante ionomérico, bem como a incorporação do digluconato de clorexidina também em dois

níveis: sem incorporação e com incorporação direta; resultando em 4 grupos experimentais.

**Tabela 1.** Descrição dos grupos

GRUPOS	DESCRIÇÃO
<b>SR</b>	Selante resinoso
<b>SI</b>	Selante de ionômero de vidro
<b>SRDC</b>	Selante resinoso com incorporação de 0,5% de digluconato de clorexidina
<b>SIDC</b>	Selante de ionômero de vidro com incorporação de 0,5% de digluconato de clorexidina

**Tabela 2.** Descrição dos materiais utilizados

MATERIAL	FABRICANTE	COMPOSIÇÃO
<b>RIVA PROTECT CAPSULAS IONÔMERO DE VIDRO PARA FISSURAS E PROTETOR DENTAL</b>	SDI BRASIL INDÚSTRIAS E COMÉRCIO LTDA. SÃO PAULO- SP, BRASIL	Pó: Fluoreto de silicato de alumínio e ácido poliacrílico Líquido: Ácido poliacrílico, ácido tartárico
<b>SELANTE BIOSEAL</b>	BIODINÂMICA. CURITIBA-PR, BRASIL	Bisfenol A glicidilmetacrilato (35,60%); Grupos dimetacrilatos, B.H.T, dióxido de silício, fluoreto de sódio, fluoreto de cálcio e catalisador
<b>DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA</b>	PANREAC, BARCELONA, ESPANHA	20% em solução aquosa

### 4.3 Obtenção das amostras

#### ***4.3.1 Seleção dos dentes e obtenção dos espécimes***

Foram incluídos no estudo apenas incisivos bovinos hígidos, ficando excluídos dentes que apresentassem coroas com áreas hipoplásicas ou quaisquer defeitos no esmalte; dentes com presença de trincas ou fraturas e dentes que não foram devidamente conservados em timol. Os dentes foram raspados manualmente com cureta periodontal (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para remoção dos restos teciduais e outros detritos e, então, armazenados em solução de timol a 0,1% sob refrigeração (4°C) e utilizados por um período não superior a seis meses.

Os dentes incisivos bovinos foram fixados com cera pegajosa (Kota Ind. E Com. Ltda, São Paulo, SP) no centro de uma placa de acrílico (40 x 40 x 5mm) e seccionados transversalmente na junção amelocementária para separar as coroas das raízes, com o emprego de disco diamantado dupla face (Modelo 12205, Extec®, Enfield, CT, EUA), montado em uma cortadeira metalográfica (Isomet®, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA), sob baixa rotação e irrigação abundante. Nas faces vestibulares dos dentes, foram realizados cortes seriados para a obtenção de blocos de esmalte (8 x 8 x 4 mm).

#### ***4.3.2 Preparo das cavidades***

Para a realização do preparo cavitário, os blocos de esmalte foram fixados em lâminas de cera utilidade, com a face vestibular voltada para cima. Todos os preparos em forma cilíndrica foram realizados com pontas diamantadas cilíndricas nº 2294 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo) para padronização da profundidade de aproximadamente 1,5 mm e pontas diamantadas nº 3053 (KG Sorensen, Barueri, São Paulo) para padronização do diâmetro de 4 mm. As pontas diamantadas foram trocadas a cada cinco preparos, visando manter o mesmo poder de desgaste, evitar um maior aquecimento da estrutura dentária e impedir a perda da padronização do diâmetro das cavidades. As cavidades foram realizadas com turbina de alta rotação (Kavo do Brasil, Joinville, Brasil) sob irrigação com água e aqueles espécimes que apresentavam trincas ou imperfeições devido à confecção das cavidades foram descartados.

#### ***4.3.3 Preparo dos materiais e restauração dos blocos***

Os blocos foram esterilizados em tubos para microcentrífuga abertos contendo 500 µL de solução salina (NaCl 0,89%) e esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 min. Em uma câmara de fluxo laminar (Filtracom, Valinhos, SP), as cavidades presentes nos blocos de esmalte foram preenchidas com os materiais, seguindo as instruções fornecidas pelos fabricantes de acordo com o grupo de tratamento.

Os selantes utilizados no estudo foram um selante resino (®Bioseal; Biodinâmica/Curitiba/Brasil) e um selante ionomérico (™Riva Protect; SDI/São Paulo/Brasil) (Tabela 2). Os selantes experimentais testados neste estudo foram preparados por meio da incorporação de digluconato de clorexidina a 20% no selante resinoso ou ionomérico, para obter formulações finais contendo 0,5% de digluconato de clorexidina (DC). Os ensaios foram realizados em uma temperatura ambiente ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa de  $50 \pm 10\%$ , tal como recomendado pela ISO 9917-1: 2003.

Nos grupos experimentais, a incorporação de DC foi realizada através da pré-pesagem, de acordo com cálculos estabelecidos, dos materiais estudados. Foram acrescentados 7,5 µL do antimicrobiano em 0,3 g de selante ionomérico e 5,77 µL em 0,230 g de selante resinoso. Após acrescentado o DC, o selanteresinoso foi espatulado manualmente eo selante ionomérico, com apresentação em cápsulas, foi manipulado inicialmente em amalgamador Ultramat (SDI/São Paulo/Brasil) durante 6 s e, em seguida, espatulado manualmente por 4 s após acrescentar o DC totalizando os 10 s recomendados pelo fabricante.

#### **4.4 Modelo Microbiológico**

##### ***4.4.1 Formação de biofilme in vitro e indução de cárie***

Para a indução de cárie em esmalte, utilizou-se um modelo microbiológico de formação de biofilme durante cinco dias e, por se tratar de um experimento microbiológico, o mesmo modelo foi feito em triplicata. Cultura de *S. mutans* UA 159 foi utilizada como inóculo, a fim de proporcionar desafio cariogênico aos blocos de esmalte. O inóculo inicial de *S. mutans* foi obtido através do crescimento do micro-organismo em caldo triptona de soja (TSB) suplementado com glicose 10% durante 18 h em estufa bacteriológica com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA). Após esse período, foi feita a inoculação de 100 µL de cultura de *S. mutans* crescidos *overnight*, previamente ajustados utilizando uma escala de McFarland, obtendo uma turvação correspondente a  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Os blocos de

esmalte restaurados foram imersos em TSB contendo extrato de levedura e sacarose a 10% (p/v) em placas de 24 poços (Biofil TCP011024, Guangdong, Mainland, China), sendo distribuídos 2mL de meio em cada poço.

A inoculação das placas de 24 poços foi realizada uma única vez, no primeiro dia do experimento e foram incubados em estufa bacteriológica com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e mantidos em repouso durante 24 h para permitir a formação de biofilme inicial. Após esse período, os espécimes eram lavados uma vez ao dia, por imersão, três vezes em uma placa contendo solução de NaCl a 0,89%, objetivando remover o biofilme fracamente aderido; em seguida, eram transferidos com pinça esterilizada para novas placas de 24 poços com meio TSB estéril. Esse processo de troca foi realizado durante cinco dias seguidos (DUARTE *et al.*, 2006).

Figura 3. Modelo microbiológico de formação de biofilme



#### 4.4.2 Coleta do biofilme/Contagem das UFC

Ao final dos cinco dias de crescimento, os biofilmes formados sobre os blocos foram coletados com espátula Hollembach 3S estéril, como observado na Figura 3, e transferidos para microtubos tipo eppendorf pré-pesados e, após obtenção do peso úmido do biofilme, foi calculada a quantidade de solução salina NaCl 0,89% a ser acrescentada (1µL/mg de biofilme) e submetidos à ação de um sonificador de alta potência (Branson Ultrasonics 250, Danbury, Connecticut, EUA) durante 45 s, com intervalos de 15 s sob refrigeração, com a finalidade de obter suspensões contendo células simples. Em seguida, a suspensão foi diluída em série (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>), e alíquotas de 10 µL foram semeadas em triplicata em meio *Brain Heart Infusion* (BHI ágar) para contagem de *S. mutans*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C em uma pressão parcial de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h. Após a incubação, a viabilidade celular bacteriana foi mensurada pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), e os valores finais foram expressos em (UFC/mL/mm<sup>2</sup>).

Figura 4. Coleta de biofilme sobre a face vestibular do bloco restaurado.



#### **4.4.3 Análise de peso seco do biofilme**

Para a análise do peso seco do biofilme, após a semeadura, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da suspensão de biofilme de cada bloco foram coletadas em microtubos estéreis e pré-pesados. Foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 99,9% previamente armazenado em  $-20^{\circ}\text{C}$ , as suspensões bacterianas obtidas foram também armazenadas em  $-20^{\circ}\text{C}$  pelo período de 24 h e, subsequentemente, vortexadas e centrifugadas durante 10 min em  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 500  $\mu\text{L}$  de álcool etílico a 70% foram novamente adicionados. A nova suspensão foi vortexada e centrifugada por mais 5 min em  $-4^{\circ}\text{C}$ , sendo o sobrenadante descartado. Sequencialmente, os microtubos contendo os precipitados foram armazenados em um dissecador até a remoção total da umidade interna e, em seguida, foram pesados em balança analítica de alta precisão.

#### **4.5 Análise da microdureza em corte longitudinal de esmalte**

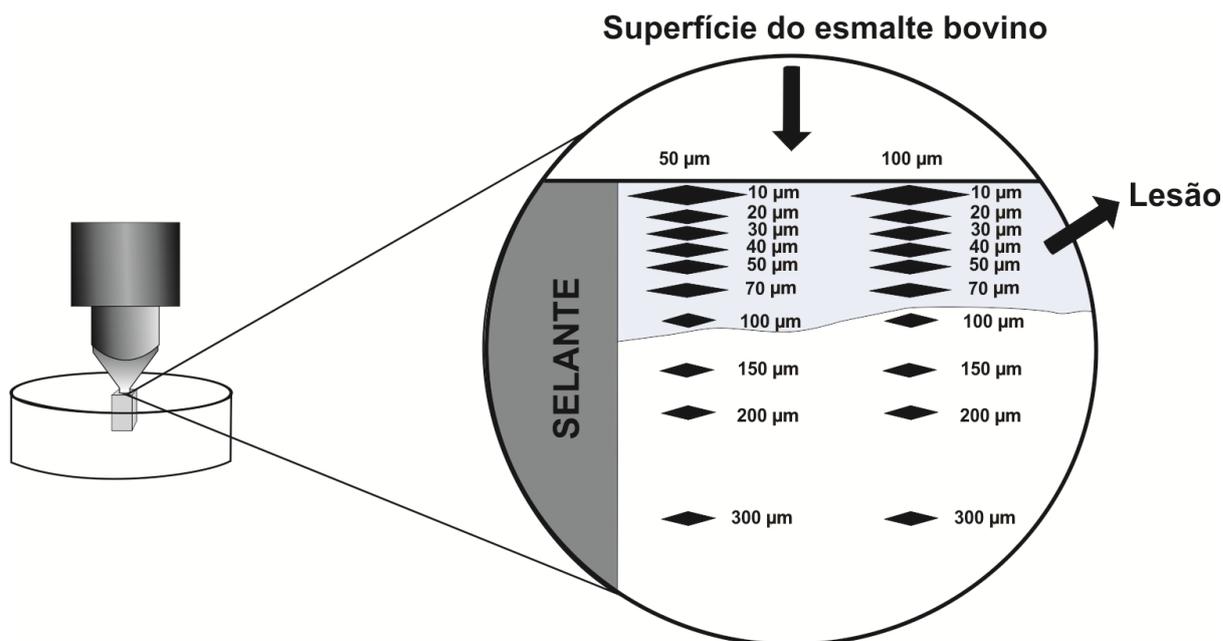
Os blocos submetidos ao modelo microbiológico de indução de cárie foram analisados através do teste de microdureza Knoop em corte longitudinal do esmalte, para determinar desmineralização ao redor das restaurações. Eles foram seccionados longitudinalmente na região central doselante, com disco diamantado acoplado à cortadeira (Isomet® 1000, Buehler, Lake Buff, EUA). Em seguida, foram embutidos em 7 g de resina acrílica incolor termicamente ativada (VipiCril, São Paulo, Brasil) em uma embutidora metalográfica Pre-30 Mi (Arotec S.A. Ind. Com., São Paulo, Brasil). Os ciclos foram padronizados em 6 min de aquecimento sob compressão de  $150 \text{ Kgf/cm}^2$  seguidos por 7 min de resfriamento. Para melhor fixação, foi utilizada uma pequena

quantidade de adesivo à base de cianoacrilato (SuperBonder® - Loctite, São Paulo, Brasil) e cada espécime foi identificado com seus respectivos códigos de identificação.

Após o embutimento, as amostras foram planificadas e polidas em uma Politriz automática Ecomet 250 (Buehler, Lake Buff, EUA), utilizando um dispositivo para uso de seis corpos-de-prova simultâneos, com carga de 25 N sobre cada corpo, em baixa velocidade, sobrefrigeração com água deionizada. Foram utilizadas lixas de carbetto de silício de granulação 320 (2 min), 600 (2 min), 1200 (4 min) (Buehler, Lake Buff, EUA) trocadas a cada ciclo, até a completa exposição das superfícies embutidas. A seguir, o polimento foi realizado com pastas de alumina de 1 $\mu$ m (Extec Corp. Gamma Alum. Perm. Susp. Ref.: 16776) e 0,5  $\mu$ m (Extec Corp. Perm. Susp. Ref.: 16774) e discos de feltro (Buehler, Lake Buff, EUA) autoadesivos correspondentes, durante 5 min, refrigerados com água. Entre as etapas de planificação e polimento, os corpos de prova contendo os espécimes foram imersos em ultrassom com água deionizada por 10 min, para remoção das partículas de lixa e alumina.

As análises foram efetuadas utilizando-se o microdurômetro (Future Tech 9000 FM, Future-Tech Corp., Kanagawa, Japão) acoplado a um software FM-ARS® e penetrador do tipo Knoop, sob carga de 25 g por 5 s. Foram feitas 20 indentações em 10 diferentes profundidades, abaixo da superfície externa do esmalte cariado de cada espécime, a 50  $\mu$ m e 100  $\mu$ m da restauração, formando duas fileiras de indentações longitudinais nas profundidades: 10  $\mu$ m, 20  $\mu$ m, 30  $\mu$ m, 40  $\mu$ m, 50  $\mu$ m, 70  $\mu$ m, 100  $\mu$ m, 150  $\mu$ m, 200  $\mu$ m e 300  $\mu$ m, obtendo-se as médias dos valores de microdureza (KHN-Knoop Hardness Number) em cada profundidade para cada espécime (Figura 5).

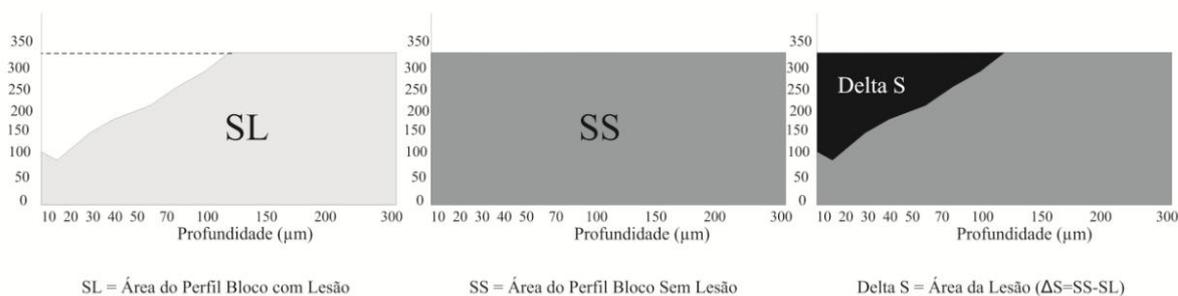
Figura 5. Desenho esquemático das indentações realizadas durante a análise de microdureza em corte longitudinal do esmalte.



Fonte: Autor, 2016

Os dados obtidos foram transportados para planilhas, nas quais foram calculadas as médias dos valores obtidos para, a partir destes dados, calculou-se o parâmetro Delta S ( $\Delta S$ ), correspondente à área de perda de dureza das amostras. O cálculo do Delta S (área da lesão) foi realizado da seguinte maneira: inicialmente, os números de dureza Knoop (NDK) de cada indentação foi plotado em função da sua profundidade obtendo-se um perfil de dureza integrada do esmalte com lesão de cárie. Para profundidades maiores do que 100  $\mu\text{m}$ , a média de NDK (valores em torno de 340) foi utilizada como uma medida do perfil de dureza integrada de esmalte sadio. A área sob a curva obtida com os perfis do esmalte íntegro (SS) e esmalte com lesão de cárie (SL) foi calculada usando-se a regra da aproximação trapezoidal de uma área sob uma curva (Figura 6). A área correspondente à lesão de cárie obtida após o modelo cariogênico ( $\Delta S$ ) é, portanto, o valor da subtração da área de SL do valor da área de SS (SOUSA *et al.*, 2009).

Figura 6. Representação Esquemática do cálculo de perda de dureza ( $\Delta S$ ).



Fonte: Autor, 2016

#### 4.6 Análise da rugosidade de superfície

Cinco espécimes em forma de disco (5 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade) foram preparadas para cada grupo em um molde de silicona. O molde de silicona foi colocado numa placa de vidro com uma matriz de poliéster sobre ele. Os corpos de prova foram analisados quanto ao seu padrão de rugosidade de superfície por meio do rugosímetro Hommel Tester T 1000 (Hommelwerke, GmbH, Alte Tuttinger Strebe 20 D-7730 VS-Schwenningen). A ponta sensora de 1,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro realizou traçados em uma velocidade de 0,100 mm/s, totalizando 2 leituras por corpo de prova. O comprimento da amostragem empregado foi de 2 mm. Antes e após a exposição dos corpos de prova ao modelo de biofilme cariogênico, mensurações foram realizadas através do parâmetro que se baseia em medida vertical ( $R_a/\mu\text{m}$ ). A média das 3 leituras foi utilizada como a média de cada espécime.

#### 4.7 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Após 5 dias de incubação, o biofilme foi avaliado através de microscopia confocal e de fluorescência. Para a análise microscópica confocal, foi utilizada a metodologia descrita por Castelo-Branco *et al.* (2016). Inicialmente, os espécimes foram transferidos para placas de Petri com fundo de vidro e 200  $\mu\text{L}$  do corante fluorescente Live/Dead (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, Califórnia, EUA) foram adicionados. Em seguida, 3 pontos escolhidos na área dos selantes nos blocos de esmalte foram avaliados em três espécimes por grupo com um microscópio confocal Nikon (C2 a 488 nm para a detecção da coloração de ácido nucleico fluorescente-verde SYTO® 9 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), que identifica células bacterianas vivas, e a 561 nm para a detecção do iodeto de propídio, que identifica células bacterianas mortas e com danos de membrana. Imagens Z-stack foram obtidas a

partir de cinco campos para cada um dos espécimes analisados. As imagens foram processadas pelo programa COMSTAT e analisadas em Matlab 5,3 (MathWorks Inc., Natick, Mass., EUA) (HEYDORN *et al.*, 2000). Os parâmetros avaliados foram biomassa total, espessura média da biomassa, a espessura média total do biofilme, coeficiente de homogeneidade do biofilme e relação superfície/volume, enquanto o método de fluorescência foi calculada automaticamente pelo método de Otsu (OTSU, 1979).

#### **4.8 Análise Estatística**

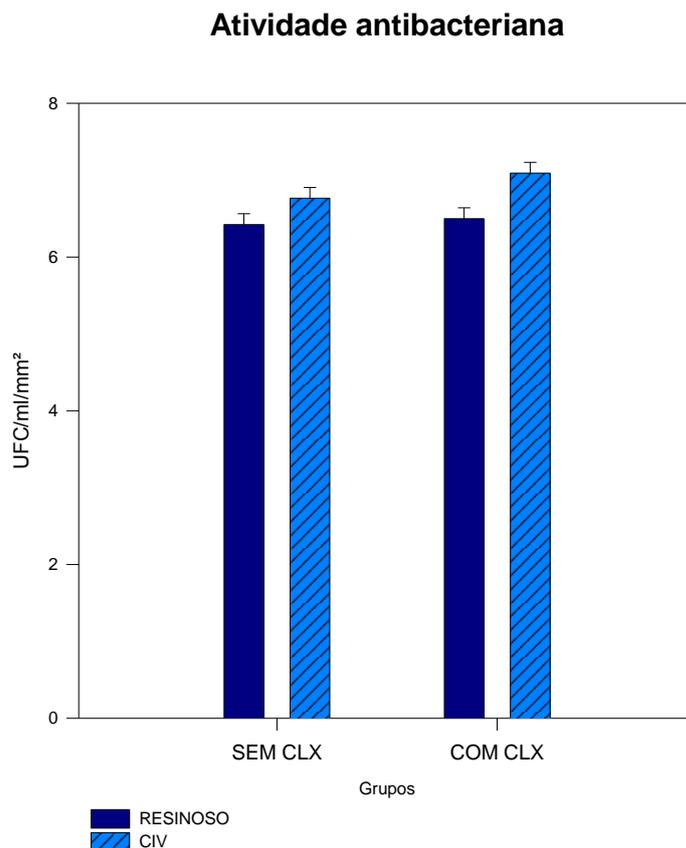
Para todas as variáveis de resposta que atenderam as pressuposições necessárias para a realização de testes paramétricos, a saber: normalidade dos dados (teste Kolmogorov–Smirnov) e igualdade de variâncias (teste SigmaPlot), foram aplicados ANOVA dois critérios e teste de Tukey. Os valores das variáveis de resposta biomassa de células vivas e relação área volume de células mortas foram respectivamente transformados pela raiz quadrada e quadrática, para atender a essas pressuposições e em seguida foram analisados pelos testes paramétricos já citados. Os dados da variável de resposta relação área volume de células mortas não atenderam as pressuposições necessárias para análise no campo paramétrico e foram analisados por Kruskal-Wallis Anova em Ranques e Student–Newman–Keuls. O nível de significância pré-estabelecido foi de 5% e o programa utilizado foi SigmaStart 3.5 (Systat Software Inc., São José, California)

### **5 RESULTADOS**

#### **Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. mutans***

Na análise do efeito antibacteriano, ANOVA mostrou que os selantes resinosos apresentaram menor contagem de UFCs quando comparados aos selantes ionoméricos ( $p = 0,004$ ), não havendo diferença em relação a incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,122$ ) independente do tipo de material. Também não houve interação entre os dois fatores estudados, ou seja, tipo de material e incorporação de clorexidina ( $p = 0,3170$ ), como observado no Gráfico 1.

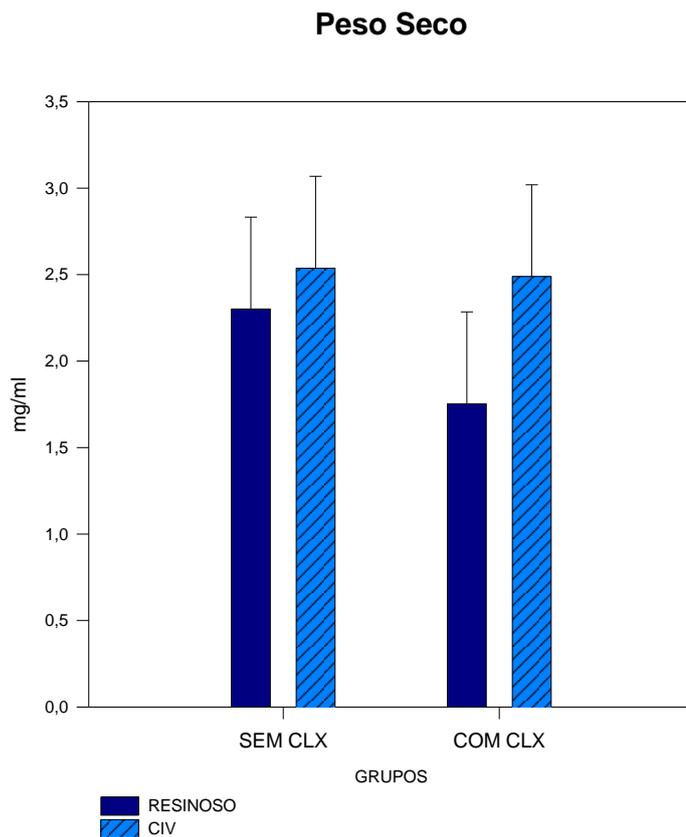
Gráfico 1. Médias e desvios-padrão das unidades formadoras de colônia de *S. mutans* em relação aos diferentes grupos testados. Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p = 0,004$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,122$ ), bem como na interação entre os dois fatores ( $p=0,3170$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).



### **Análise do peso seco de biofilme**

O peso seco de biofilme apresentou menores valores para os selantes resinosos em relação aos ionoméricos ( $p = 0,006$ ), não havendo diferença entre os grupos com clorexidina e sem clorexidina ( $p = 0,215$ ). No entanto, houve interação estatisticamente significativa quanto ao tipo de material e a incorporação de clorexidina no grupo de selantes resinosos ( $p = 0,020$ ) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Média  $\pm$  DP do peso seco ( $\text{mg/ml} \times 10^{-4}$ ) do biofilme acumulado pelos respectivos grupos avaliados. Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p = 0,006$ ), não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,215$ ). Houve interação entre os dois fatores ( $p = 0,020$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).



### Microdureza em corte longitudinal do esmalte

Na análise de dureza à 50  $\mu\text{m}$ , houve uma menor área de desmineralização para o ionomérico quando comparado aos resinosos em relação ao fator material ( $p < 0,001$ ), assim como entre os grupos com e sem clorexidina ( $p = 0,026$ ). No entanto, não houve interação estatisticamente significativa entre o tipo de material utilizado e a incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,259$ ) (Gráfico 3).

Já na análise de dureza à 100  $\mu\text{m}$ , a menor perda de dureza foi mantida para os ionoméricos quando comparados aos resinosos no fator tipo de material ( $p < 0,001$ ), sendo indiferente nos grupos com e sem clorexidina ( $p = 0,097$ ) e no fator interação ( $p = 0,094$ ) (Gráfico 4).

Gráfico 3. Perfil da perda de dureza ( $\Delta S$ ) dos grupos avaliados às distâncias de 50  $\mu\text{m}$  da margem do selante. Resultados significativos foram observados para se o fator tipo de material ( $p < 0,001$ ) e fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,026$ ). Não houve interação entre os dois fatores ( $p = 0,259$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).

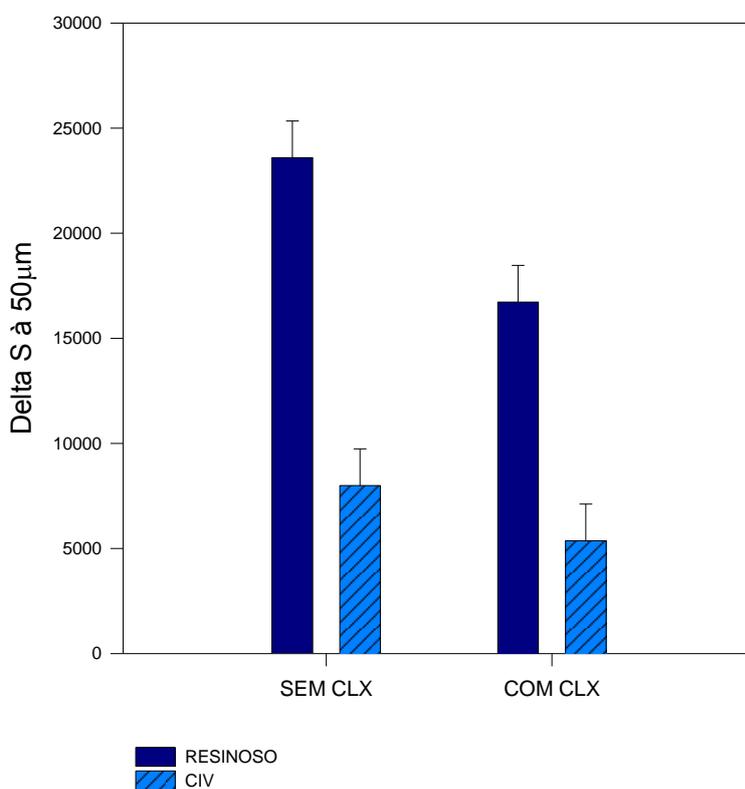
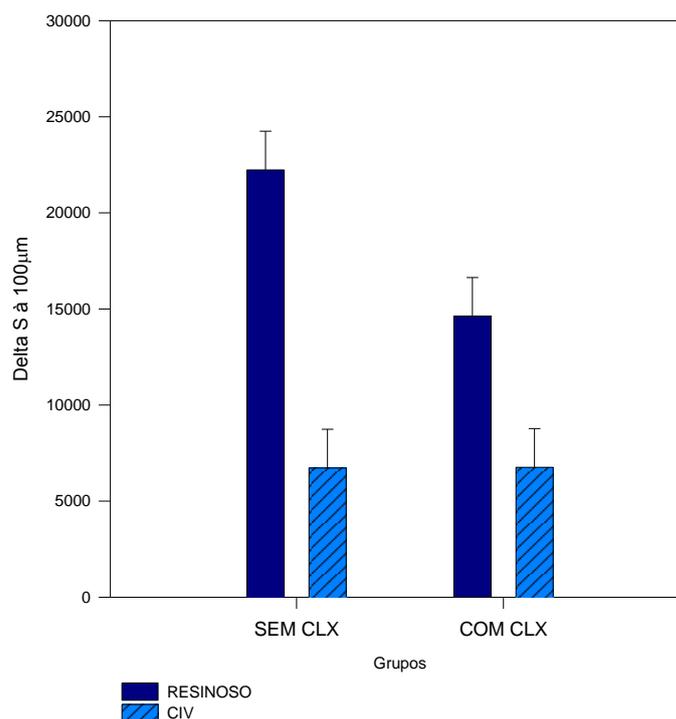


Gráfico 4. Perfil da perda de dureza ( $\Delta S$ ) dos grupos avaliados às distâncias de 100  $\mu\text{m}$  da margem do selante (média  $\pm$  DP). Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,097$ ) e interação entre os dois fatores ( $p = 0,094$ ) (ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).



### Rugosidade de superfície

Antes do desafio cariogênico, a rugosidade de superfície do material apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de selantes resinosos e ionoméricos ( $p = 0,032$ ), sendo maior no grupo de selantes ionoméricos. A incorporação ou não de clorexidina não foi estatisticamente significativa nesta análise ( $p = 0,095$ ), bem como a interação dos dois fatores ( $p = 0,125$ )(Gráfico 5). Após o desafio cariogênico, a rugosidade apresentou mesmo comportamento com diferença estatística quanto ao tipo de material nos grupos de selantes ionoméricos ( $p = <0,001$ ), sendo indiferente a incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,545$ ) e interação dos dois fatores ( $p = 0,723$ )(Gráfico 6).

Gráfico 5. Rugosidade de superfície dos espécimes de materiais seladores (média  $\pm$  DP), expressos em Ra ( $\mu\text{m}$ ). Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p = 0,032$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,095$ ) e interação entre os dois fatores ( $p = 0,125$ )(ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).

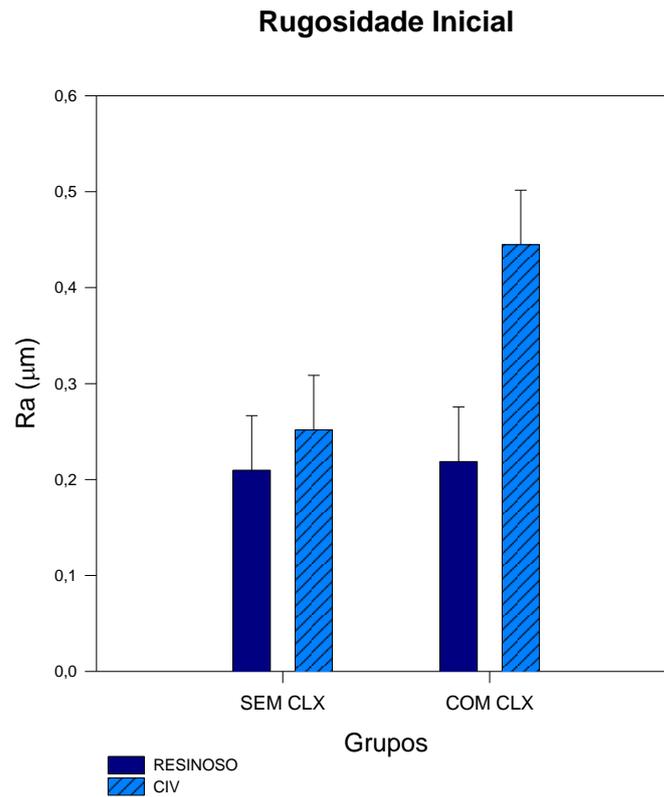
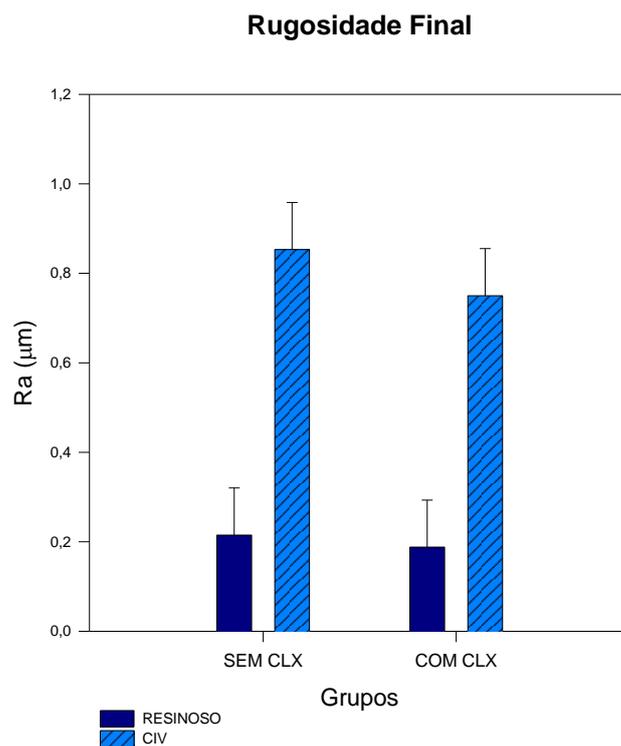


Gráfico 6. Rugosidade de superfície dos espécimes de materiais seladores (média  $\pm$  DP), expressos em Ra ( $\mu\text{m}$ ). Resultados significativos foram observados para o fator tipo de material ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença no fator incorporação ou não de clorexidina ( $p = 0,545$ ) e interação entre os dois fatores ( $p = 0,723$ )(ANOVA dois fatores; nível de significância de 0,05).



### Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

As variáveis respostas da MCVL e a viabilidade celular do biofilme formado sobre os selantes foram avaliadas quanto os fatores tipo de material, incorporação de CLX e interação, através de ANOVA dois fatores, os valores de p para estes fatores para cada variável de resposta estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da ANOVA dois fatores (valores de p) para análise de microscopia confocal do biofilme formado sobre o selante.

Fatores em Estudo	Material		Adição de CHX		Interação Material*CHX	
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
Viabilidade Celular						

<b>Variável de Resposta</b>						
<b>Biomassa total</b>	0,945	0,696	0,544	0,387	0,007	0,009
<b>Espessura média da biomassa</b>	0,011	0,015	0,220	0,298	0,099	0,113
<b>Espessura média total do biofilme</b>	0,261	0,379	0,823	0,841	0,044	0,010
<b>Coefficiente de homogeneidade</b>	0,014	<0,001	0,641	<0,001	0,015	<0,001
<b>Relação superfície de restauração</b>	<0,001*	*	0,831	*	0,168	*

\* variável de resposta analisada pelo teste Kruskal-Wallis;  $p < 0,001$

Na biomassa total houve diferença significativa no fator interação material/adição de CLX, no grupo de selantes resinosos a incorporação de CLX favoreceu a formação de biofilme apresentando uma maior biomassa comparado aos selantes ionoméricos, em células vivas ( $p = 0,007$ ) e mortas ( $p = 0,009$ ). Conseqüentemente, o fator interação material/adição de CLX também foi significativa na espessura média total do biofilme, sendo maior nos selantes resinosos comparados aos ionoméricos, em células vivas ( $p = 0,044$ ) e mortas ( $p = 0,010$ ). No parâmetro espessura média da biomassa, houve diferença significativa em relação ao fator tipo de material, apresentando maior espessura média de biomassa os selantes ionoméricos comparados aos selantes resinosos, em células vivas ( $p = 0,011$ ) e mortas ( $p = 0,015$ ). Em relação ao coeficiente de homogeneidade; no fator tipo de material os selantes ionoméricos foram maior que os selantes resinosos em células vivas ( $p = 0,014$ ), no entanto os selantes resinosos apresentaram maiores valores em células mortas ( $p < 0,001$ ); no fator adição de CLX houve diferença significativa nos selantes ionoméricos e resinosos comparados aos controles ( $p < 0,001$ ); no fator interação material/adição de CLX, o grupo dos selantes ionoméricos foram maiores, em células vivas ( $p = 0,015$ ) e mortas ( $p < 0,001$ ). No parâmetro relação/volume, os selantes resinosos foram maiores aos ionoméricos, em relação ao tipo de material, em células vivas ( $p < 0,001$ ) e mortas ( $p < 0,001$ ); adição de CLX somente células mortas ( $p < 0,001$ ); e fator interação material/adição de CLX em células mortas ( $p < 0,001$ ).

A tabela 4 mostra os dados expressos em forma de média dos parâmetros dos biofilmes de *S. mutans* referente a células vivas, analisados pelo Teste Tukey,  $p < 0,05$ . Na espessura média da biomassa o grupo SI foi significativamente maior em relação aos grupos SR e SRDC, porém semelhante ao SIDC. O maior coeficiente de homogeneidade foi encontrado para o grupo SIDC que foi maior apenas quando comparado ao do grupo SRDC. Em na relação superfície/volume, o grupo SR apresentou o maior valor que diferiu apenas do grupo SI apresentando também significância estatística.

Tabela 4. Análise quantitativa de células vivas em biofilme de *S. mutans* UA 159 crescido por 5 dias.

Condições de crescimento do biofilme	Biomassa total ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	Espessura média da biomassa ( $\mu\text{m}$ )	Espessura média total ( $\mu\text{m}$ )	Coefficiente de homogeneidade	Relação Superfície/Volume ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ )
SR	$0,299 \pm 0,056$ a	$7,884 \pm 4,40$ b	$1,978 \pm 3,12$ a	$1,607 \pm 0,24$ ab	$4,572 \pm 0,03$ a
SRDC	$0,804 \pm 0,053$ a	$8,830 \pm 1,85$ b	$3,769 \pm 1,07$ a	$1,229 \pm 0,15$ b	$4,109 \pm 0,72$ ab
SI	$1,030 \pm 0,045$ a	$17,149 \pm 3,06$ a	$2,939 \pm 2,20$ a	$1,612 \pm 0,23$ ab	$2,197 \pm 0,46$ bc
SIDC	$0,251 \pm 0,039$ a	$11,042 \pm 5,09$ ab	$0,819 \pm 1,08$ a	$1,876 \pm 0,14$ a	$2,825 \pm 0,27$ ab

Dados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão (Teste Tukey,  $*p < 0,05$ ). Letras diferentes denotam significância estatística entre as médias.

Os resultados dos parâmetros em biofilmes referentes a células mortas e danificadas são mostrados na Tabela 5. Em relação a espessura média da biomassa, o grupo SI foi cerca de 2 vezes maior quando comparado ao grupo SR ( $p = 0,015$ ). A integridade de formação do biofilme, representada pelo coeficiente de homogeneidade, foi diferente para todos os grupos sendo o maior valor encontrado para o grupo SR e menor valor para o grupo SRDC ( $p < 0,001$ ). Já na relação área/volume, o grupo SRDC apresentou maior valor que diferiu dos grupos SI e SIDC ( $p < 0,001$ ).

Tabela 5. Análise quantitativa de células mortas em biofilme de *S. mutans* UA 159 crescido por 5 dias.

Condições de crescimento do biofilme	Biomassa total ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ )	Espessura média da biomassa ( $\mu\text{m}$ )	Espessura média total ( $\mu\text{m}$ )	Coefficiente de homogeneidade	Relação / Volume ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ )
SR	0,482 ± 0,13 a	8,457 ± 3,69 b	1,892 ± 0,67 a	4,970 ± 0,01 a	4,970 ± 0,01 a
SRDC	1,199 ± 0,75 a	9,693 ± 1,56 ab	5,942 ± 3,06 a	1,075 ± 0,07 d	5,078 ± 0,40 a
SI	1,661 ± 0,73 a	17,544 ± 3,24 a	4,483 ± 2,55 a	1,396 ± 0,23 c	1,939 ± 0,49 c
SIDC	0,305 ± 0,27 a	11,811 ± 5,46 ab	0,970 ± 1,05 a	1,861 ± 0,14 b	2,989 ± 0,38 b

Dados expressos em média ± desvio-padrão (Teste Tukey, \* $p < 0,05$ ). Letras denotam significância estatística entre as médias.

A Figura 5 mostra o padrão de imagens obtidas pela microscopia em cada um dos grupos avaliados. No detalhe A da figura, pode-se observar que o grupo SR quase não apresenta biofilme na superfície do selante, apresentando poucas células bacterianas e organizadas em “conglomerados celulares dispersos”. Uma maior integridade de formação de biofilme foi observada no grupo SRDC, sendo evidentes células mortas e danificadas (em vermelho) (B).

Nos materiais seladores ionoméricos, o padrão de formação de biofilme foi distinto. O grupo SI apresentou maior volume e homogeneidade na estruturação do biofilme, sendo possível visualizar organização celular em massa, na forma de “cogumelos”, com presença de células vivas (verde) e mortas (vermelho) (C). Enquanto no grupo SRDC, houve desestruturação do biofilme, com dispersão celular, mas ainda sendo possível evidenciar células vivas (verde) e mortas (vermelho) (D) (Figura 7)



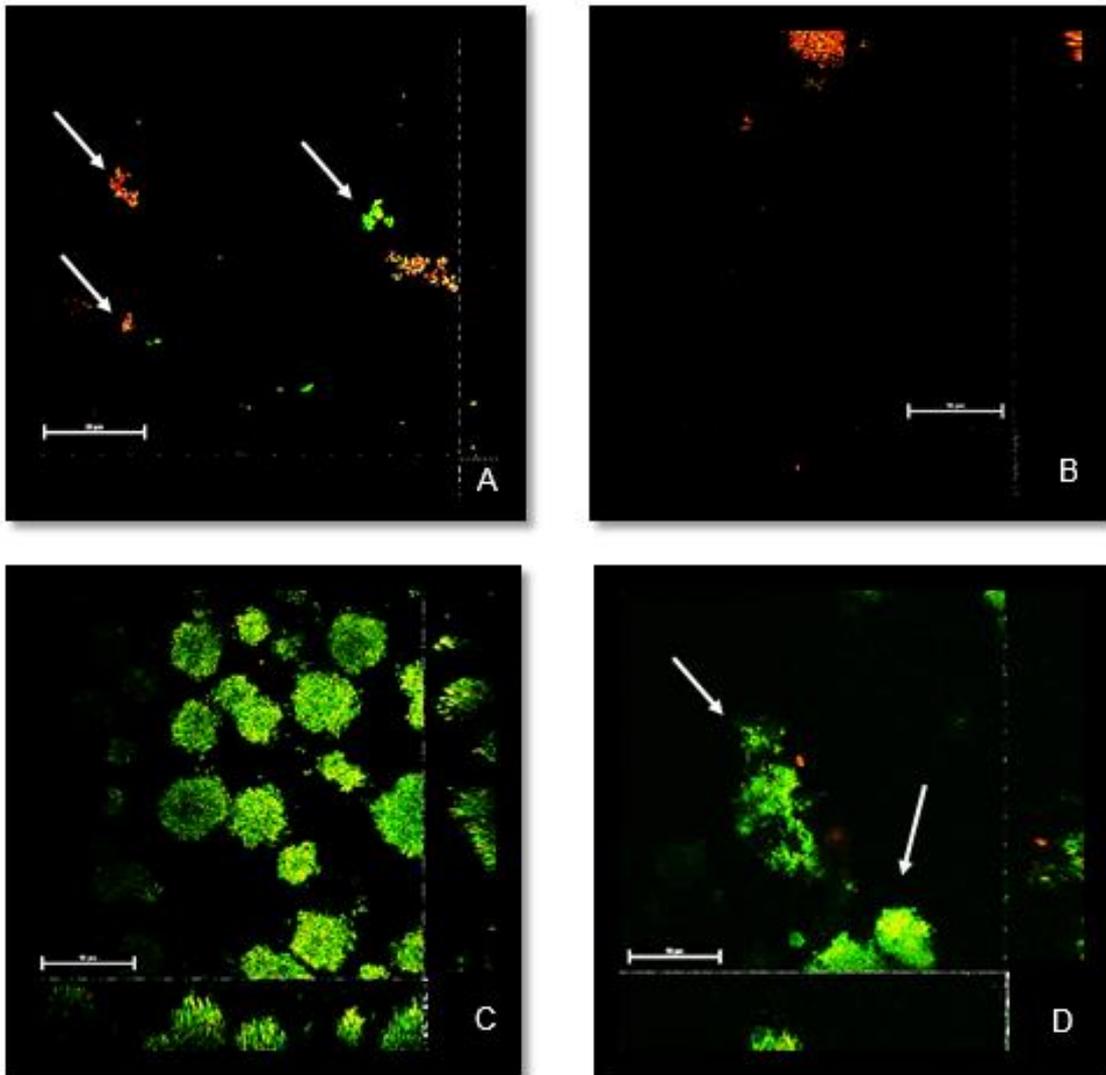


Figura 7. Padrão de formação de biofilmes de *S. mutans* em materiais seladores resinosos e ionoméricos, em fotomicrografias obtidas com MCVL. (A) Grupo SR com pequenos conglomerados celulares (seta), sem biofilme formado. (B) Grupo SRDC apresentando biofilme em formação, com células mortas e danificadas (vermelho). (C) Grupo SI mostra biofilme estruturado, homogêneo, e celulares organizadas em massa. (D) Grupo SIDC com biofilme desestruturado (setas).

## 6 DISCUSSÃO

A clorexidina (CLX) é reconhecida por apresentar atividade antimicrobiana de amplo espectro e baixa citotoxicidade, sendo considerado o “padrão-ouro” dos agentes antimicrobianos em razão da sua eficácia na redução e controle do biofilme oral (BAEHNI; TAKEUCHI, 2003). Assim, uma vez que o biofilme dental é fundamental na instalação e progressão da doença cárie, o presente estudo *in vitro* verificou a incorporação de CLX no efeito antimicrobiano de um selante de ionômero de vidro e em um selante resinoso. O modelo monoespécie de *S. mutans* foi selecionado para este estudo, uma vez que biofilmes de *S. mutans* têm sido amplamente utilizados em vários trabalhos prévios com materiais dentários antibacterianos (BEYTH *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2013; FU *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2012; HIRAIISHI *et al.*, 2010) e há relatos que estes micro-organismos estão fortemente associados à cárie dentária (MOYE *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2013). Além disso, para avaliar adequadamente as propriedades antibacterianas, o estudo de bactérias arranjadas em biofilmes é mais adequado, pois estas apresentam maior resistência à ação de agentes antibacterianos quando comparados ao crescimento planctônico (TEN CATE, 2006).

A atividade antibacteriana da incorporação de clorexidina do presente estudo foi avaliada através de análises da contagem de unidade formadora de colônias (UFC), peso seco do biofilme e microscopia confocal. Os resultados deste estudo demonstraram que selantes resinosos apresentaram uma tendência a um maior efeito antimicrobiano contra *S. mutans*, uma vez que características intrínsecas do material foram significantes para menor formação de UFC nos selantes resinosos. Essa mesma tendência foi observada na análise do peso seco de biofilme, demonstrando coerência entre os resultados. Neste caso, o fator interação material e incorporação de CLX influenciou em um menor peso seco de biofilme nos selantes resinosos.

Um estudo anterior utilizando espécimes de material contendo selantes ionoméricos e resinosos, incorporados com digluconato de clorexidina com uma concentração final de 1%, mostrou aumento significativo da atividade antibacteriana em ambos os selantes (SHANMUGAAVEL *et al.*, 2015). Tais resultados corroboram com os achados do presente estudo em relação aos selantes resinosos. Contudo, cabe ressaltar que o efeito antimicrobiano deste estudo prévio foi verificado somente pelo teste de difusão em ágar frente a *S. mutans* e *L. acidophilus*, o qual não possui uma precisão analítica para análise do efeito antibacteriano como os métodos que foram

utilizados no presente estudo. Além disso, a coleta de biofilme do presente estudo foi realizada sobre todo o bloco de esmalte e, não apenas da região da restauração. A maioria dos estudos que avaliou o potencial antimicrobiano utilizou corpos de prova confeccionados com o material (DO *et al.*, 2012; SHANMUGAAVEL *et al.*, 2015), sendo verificado o efeito da formação do biofilme apenas sobre ou próximo ao material analisado, o que pode levar a uma maior liberação de CLX em todos os planos do espécime. No bloco de dente bovino restaurado como no presente estudo, em que a restauração possuía aproximadamente 4mm de diâmetro, a liberação de clorexidina ocorreu somente em um plano que está em contato direto com o biofilme.

Com relação à inibição de cárie em esmalte, de acordo com os resultados avaliados na microdureza em corte longitudinal, verificou-se que os selantes ionoméricos apresentaram um maior efeito anticárie que os selantes resinosos nas distâncias de 50 e 100  $\mu\text{m}$  do material, sendo este efeito possivelmente justificado pelo fato de que há uma liberação de flúor de 20 a 30 vezes maior em selantes ionoméricos, quando comparado àquela de selantes resinosos (BAYRAK *et al.*, 2010). Cimentos de ionômero de vidro têm efeitos cariostáticos devido à liberação de flúor, que se acredita ajudar a reduzir a desmineralização, aumentar a remineralização, agindo então diretamente na físico-química do processo de cárie (WIEGAND; BUCHALLA; ATTIN, 2007; PRABHAKAR *et al.*, 2013).

Quanto à incorporação de CLX, observou-se diferença estatística na dureza entre os grupos experimentais somente à uma distância de 50  $\mu\text{m}$ . Estudos com Cimento de ionômero de vidro (CIV) adicionados com CLX têm demonstrado uma diminuição da dureza de superfície, sendo proporcional ao aumento da concentração de CLX (BOTELHO, 2003). No estudo de PRABHAKAR *et al.*, 2013, foi verificado que a incorporação de CLX em cimentos de ionômero de vidro convencionais não afetou a liberação de flúor, o que pode justificar a pouca interferência da adição de CLX nos selantes ionoméricos em relação à diminuição de dureza no presente estudo experimental.

A rugosidade de superfície afeta a adesão bacteriana, podendo levar a um acúmulo de micro-organismos, e consequente formação de biofilme com posterior deterioração do material (LOPES *et al.*, 2010; YIP *et al.*, 2001). No presente estudo, a incorporação de CLX a 0,5% não alterou a rugosidade de superfície dos materiais avaliados, corroborando com os achados do estudo de estudo de Marti *et al.* (2014), que mostraram que a utilização de gluconato de CLX a 1% ou 2% também não interferiu na

rugosidade de superfície dos cimentos de ionômero de vidro testados. No entanto, em um estudo prévio, observou-se um aumento significativo na rugosidade do cimento de ionômero quando incorporado com clorexidina (KORKMAZ *et al.*, 2013). A adição de CLX ao CIV pode resultar em mudanças na microestrutura e propriedades mecânicas do material restaurador, como a resistência à compressão e tempo de presa (PALMER *et al.*, 2004). O fator material influenciou na rugosidade de superfície dos materiais testados neste experimento, tendo sido verificado que os selantes resinosos apresentaram uma menor rugosidade de superfície quando comparados aos selantes ionoméricos nas condições experimentais testadas.

A microscopia confocal a laser (MCVL) utilizada neste estudo é uma importante ferramenta para investigar biofilmes orais (BARKHORDA *et al.*, 1989; HENGTRAKOOL; PEARSON; WILSON, 2006). Esta metodologia de visualização não-destrutiva do biofilme foi utilizada para avaliar o efeito antibacteriano dos selantes ionoméricos e resinosos com incorporação de CLX. De forma geral, os dados de MCVL forneceram informações condizentes com a eficácia da incorporação de CLX, favorecendo a atividade antimicrobiana dos selantes resinosos quando comparada aquela dos selantes ionoméricos. Em relação às células vivas, observou-se uma redução no grupo ionomérico com adição de CLX. Tais achados corroboram com estudo de Du *et al.*, (2012) que identificaram uma menor média de bactérias vivas nos cimentos de ionômero de vidro testados com incorporação de clorexidina a 2%. No estudo de Yu *et al.*, (2016), utilizando selantes resinosos incorporados com um agente antimicrobiano MAE-DB (brometo de 2-metacriloxietil dodecil metil amônia), a análise de MCVL mostrou células mortas predominantes nos grupos experimentais semelhante aos nossos achados para o selante resinoso incorporado ao CLX. No entanto, a MCVL de biofilmes crescidos em espécimes bovinos contendo 5 tipos de cimentos de ionômero de vidro em uma concentração de 0,2% não apresentou diferenças, tendo potencial antimicrobiano similar e compatível entre os grupos (KLAI *et al.*, 2014).

Dentro das limitações deste estudo, baseado nos resultados encontrados, pode-se concluir que a incorporação de 0,5% de clorexidina em selantes resinosos pode ser efetiva. Em relação à atividade antimicrobiana, os selantes resinosos foram superiores aos ionoméricos. No entanto, os selantes ionoméricos sozinhos ou incorporados de CLX a 0,5% apresentaram maior atividade anticárie. Além disso, a incorporação de CLX a 0,5% não alterou a rugosidade de superfície em ambos os materiais, e de forma geral, a

adição da clorexidina pode ser considerado uma medida preventiva adicional ao uso de selante

## **7 CONCLUSÃO**

A incorporação de CLX a 0,5% apresentou atividade antimicorbiana efetiva nos selantes resinosos. Os selantes ionoméricos com e sem adição de CLX a 0,5% apresentaram melhor atividade anticárie. Além disso, a incorporação de CLX a 0,5% não alterou a rugosidade de superfície em ambos os materiais, e de forma geral, a adição da clorexidina pode ser considerado uma medida preventiva adicional ao uso de selantes.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 4, p. 1407-1417, 2008.
- ABUCHAIM, C.; LOGUERCIO, A. D.; GRANDE, R. H. M.; REIS, A. Scientific and clinical approach to sealing occlusal and proximal carious lesions. **RGO - Rev Gaúcha Odontol.**, v. 59, n. 1, p.117-123, 2011.
- AGUIAR, A.; SEIXAS, G. F.; SIMÕES, T. C.; FERNANDES, A. B. F.; BUSATO, P. D. M. R.; MOURA, S. K. Avaliação do selamento marginal promovido por sistemas adesivos aplicados em esmalte e dentina. **J Oral Invest**, v. 3, n. 1, p. 4-9, 2014.
- AHOVUO-SALORANTA, A.; FORSS, H.; WALSH, T.; HIIRI, A.; NORDBLAD, A.; MÄKELÄ, M.; WORTHINGTON, H. V. Sealantes for preventing dental decay in the permanent teeth. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 3, p. 1469- 1493, 2013.
- AHOVUO-SALORANTA, A.; HIIRI, A.; NORDBLAD, A.; MÄKELÄ, M.; WORTHINGTON, H. V. Pit and fissure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 8, n. 4, 2008.
- AHOVUO-SALORANTA, A.; HIIRI, A.; NORDBLAD, A.; WORTHINGTON, H. V.; MÄKELÄ, M. Pit and ssure sealants for preventing dental decay in the permanent teeth of children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 3, 2004.
- AJDIĆ, D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIĆ, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETTI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 22, p. 14434-14439, 2002.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control biofilm formation. **J Dent Res**, v. 89, n. 11, p. 1175–1186, 2010.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY: Policy on Early Childhood Caries (ECC): classifications, consequences and preventive strategies. Reference Manual. **Pediatric Dentistry**, v. 36, p. 50-52, 2014.
- ANUSAVICE, K.J.; SHEN, C.; RAWLS, H. R. Compósitos a base resinosa. In: **Materiais Dentários**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, p.275- 306, 2013.

ARAÚJO, I. D. T.; CUNHA, M. M. F.; VASCONCELOS, M. G.; VASCONCELOS, R. G. Sealants: an effective technique in the prevention of caries. **Ciências Saúde**, v. 24, n. 3, p. 259-266, 2014.

ARROW, P. Oral hygiene in the control of occlusal caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 26, n. 5, p. 324-330, 1998.

ASSELIN, M. E.; FORTIN, D.; SITBON, Y.; ROMPRÉ, P. H. Marginal microleakage of a sealant applied to permanent enamel: evaluation of 3 application protocols. **Pediatr Dent**, v. 30, n. 1, p. 29-33, 2008.

AYDIN, S. B.; HANLEY, L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 94, n. 1, p. 22-31, 2010.

AZARPAZHOOH, A.; MAIN, P. A. Pit and fissure sealants in the prevention of dental caries in children and adolescents: a systematic review. **J Can Dent Assoc**, v. 74, n. 2, p. 171-177, 2008.

BADET, C.; THEBAUD, N. B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. **Open Microbiol J**, v. 2, p. 38-48, 2008.

BAEHNI, P. C.; TAKEUCHI, Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. **Oral Dis**, v. 9, n. 1, p. 23-29, 2003.

BAELUM, V.; FEJERSKOV, O. Diagnóstico da cárie dentária: um momento de reflexão a caminho de uma intervenção?. In: **Cárie Dentaria – a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, p. 101-110, 2005.

BAKRY, A. S.; TAKAHASHI, H.; OTSUKI, M.; TAGAMI, J. Evaluation of new treatment for incipient enamel demineralization using 45S5 bioglass. **Dent Mater**, v. 30, n. 3, p. 314-320, 2014.

BASEGGIO, W.; NAUFEL, F. S.; DAVIDOFF, D. C.; NAHSAN, F. P.; FLURY, S.; RODRIGUES, J. A. Caries-preventive efficacy and retention of a resin-modified glass ionomer cement and a resin-based fissure sealant: a 3-year split-mouth randomised clinical trial. **Oral Health Prev Dent**, v. 8, n. 3, p. 261-268, 2010.

BAUSELLS, J.; BENFATTI, S. V.; CAYETANO, M. H. Selantes de fossas e fissuras. In: **Interação odontopediátrica: uma visão multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2011.

BAYRAK, S.; TUNC, E. S.; AKSOY, A.; ERTAS, E.; GUVENC, D.; OZER, S. Fluoride release and recharge from different materials used as fissure sealants. **Eur J Dent**, v. 4, n. 3, p. 245-250, 2010.

BEAUCHAMP, J.; CAUFIELD, P. W.; CRALL, J. J.; DONLY, K.; FEIGAL, R.; GOOCH, B.; ISMAIL, A.; KOHN, W.; SIEGAL, M.; SIMONSEN, R. Evidence-based clinical recommendations for the use of pit-and-fissure sealants: a report of the

American Dental Association Council on Scientific Affairs. **J Am Dent Assoc**, v. 139, n. 3, p. 257-268, 2008.

BEAUCHAMP, J.; CAUFIELD, P. W.; CRALL, J. J.; DONLY, K.; FEIGAL, R.; GOOCH, B.; ISMAIL, A.; KOHN, W.; SIEGAL, M.; SIMONSEN, R. Evidence-based clinical recommendations for the use of pit-and-fissure sealants: a report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. **Dent Clin North Am**, v. 53, n. 1, 2009; 131-147, 2009.

BECKER, M. R.; PASTER, B. J.; LEYS, E. J.; MOESCHBERGER, M. L.; KENYON, S. G.; GALVIN, J. L.; BOCHES, S. K.; DEWHIRST, F. E.; GRIFFEN, A. L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 1001-1009, 2002.

BEIRUTI, N.; FRENCKEN, J. E.; VAN 'T HOF, M. A.; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W. H. Caries-preventive effect of resin-based and glass ionomer sealants over time: a systematic review. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 34, n. 6, p. 403-409, 2006.

BERALDO, D. Z.; PEREIRA, K. F. S.; ZAFALON, E. J.; YOSHINARI, F. M. S. Comparative analysis between resin sealant and ionomer by scanning electron microscope. **Rev Odontol UNESP**, v. 44, n. 4, p. 239-243, 2015.

BERCHIER, C. E.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. **J Clin Periodontol**, v. 37, n. 9, p. 829-839, 2010.

BERGER, S.; GODDON, I.; CHEN, C. M.; SENKEL, H.; HICKEL, R.; STÖSSER, L.; KÜHNISCH, J. Are pit and fissure sealants needed in children with a higher caries risk? **Clin Oral Investig**, v. 14, n. 5, p. 613-620, 2010.

BERG J.H.; CROLL T. P. Glass ionomer restorative cement systems: an update. **Pediatr Dent**, v. 37, n. 2, p. 116-24, 2015.

BERKOWITZ, R. J. Acquisition and transmission of mutans streptococci. **CDA**, v. 31, n. 2, p. 135-138, 2003.

BOTELHO, M. G. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. **Caries Res**, v. 37(2), p. 108-14, 2003.

BHAT, P. K.; KONDE, S.; RAJ, S. N.; KUMAR, N. C. Moisture-tolerant resin-based sealant: A boon. **Contemp Clin Dent**, v. 4, n. 3, p. 343-348, 2013.

BROUWERS, M. C.; KERKVLIT, K.; SPITHOFF, K. The AGREE Reporting Checklist: a tool to improve reporting of clinical practice guidelines. **BMJ**, v. 352, 2016.

CABRAL CT, FERNANDES MH. In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the longterm proliferation and functional activity of humanalveolar bone cells. **Clin Oral Investig**, v.11, p.155-164, 2007.

CARVALHO, J. C.; EKSTRAND, K. R.; THYLSTRUP, A. Results after 1 year of non-operative occlusal caries treatment of erupting permanent first molars. **CommunityDent Oral Epidemiol**, v. 19, n. 1, p. 23-28, 1991.

CARVALHO, J. C. Caries process on occlusal surfaces: evolving evidence and understanding. **Caries Res**, v. 48, n. 4, p. 339-346, 2014.

CASTELO-BRANCO, D. S.; RIELLO, G. B.; VASCONCELOS, D. C.; GUEDES, G. M.; SERPA, R.; BANDEIRA, T. J.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F.; SIDRIM, J. J.; BRILHANTE, R. S. Farnesol increases the susceptibility of *Burkholderia pseudomallei* biofilm to antimicrobials used to treat melioidosis. **J Appl Microbiol**, v. 120, n. 3, p. 600-606, 2016.

CATÃO, M. H.; RODRIGUES, J.; SILVA, A. D. Importância do selamento de fósulas e fissuras na prevenção da cárie dental: revisão de literatura. **HU Rev**, v. 38, n. 1, 2012.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.A.; CURY, J. A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Braz Oral Res**, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2010.

CHANG YC, HUANG FM, TAI KW, CHOU MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** v. 92, p. 446-450, 2001.

CHENG, L.; WEIR, M. D.; XU, H. H.; KRAIGSLY, A. M.; LIN, N. J.; LIN-GIBSON, S.; ZHOU, X. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. **Dent Mater**, v. 28, n. 5, p. 573-583, 2012.

CHEN, X.; DU, M. Q.; FAN, M. W.; MULDER, J.; HUYSMANS, M. C.; FRENCKEN, J. E. Caries-preventive effect of sealants produced with altered glass-ionomer materials, after 2 years. **Dent Mater**, v. 28, n. 5, p. 554-60, 2012.

CUETO, E. I.; BUONOCORE, M. G. Sealing of pits and fissures with an adhesive resin. Its use in caries prevention. **J Am Dent Assoc**, v. 75, n. 1, p. 121-128, 1967.

CURY, J. A.; DE OLIVEIRA, B. H.; DOS SANTOS, A. P.; TENUTA, L. M. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? **Dent Mater**, v. 32, n. 3, p. 323-333, 2016.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Braz Oral Res**, v. 23, n. 1, p. 23-30, 2009.

DAVIES, G. E.; FRANCIS, J.; MARTIN, A. R.; ROSE, F. L.; SWAIN, G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 9, n. 2, p. 192-196, 1954.

DEEPALAKSHMI, M.; POORNI, S.; MIGLANI, R.; RAJAMANI, I.; RAMACHANDRAN, S. Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass

- ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: an in-vitro study. **Indian J Dent Res**, v. 21, n. 4, p. 552-556, 2010.
- DELANY, G. M.; PATTERSON, S. S.; MILLER, C.H.; NEWTON, C. W. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 53, n. 5, p. 518-523, 1982.
- DEWHIRST, F. E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B. J.; TANNER, A. C.; YU, W. H.; LAKSHMANAN, A.; WADE, W. G. The human oral microbiome. **J Bacteriol**, v. 192, p. 5002-5017, 2010.
- DEWHIRST, F. E. The Oral Microbiome: Critical for Understanding Oral Health and Disease. **Journal of the California Dental Association**, v. 44, n. 7, p. 409, 2016.
- EDEN, E. Antimicrobials in Caries Prevention. In: **Evidence-Based Caries Prevention**. Springer International Publishing, p. 71-85, 2016.
- EKSTRAND, K. R.; RICKETTS, D. N.; KIDD, E. A. Occlusal caries: pathology, diagnosis and logical management. **Dent Update**, v. 28, n. 8, p. 380-387, 2001.
- EKSTRAND, K. R.; CHRISTIANSEN, M. E. Outcomes of a non-operative caries treatment programme for children and adolescents. **Caries Res**, v. 39, n. 6, p. 455-467, 2005.
- EKSTRAND, K. R., KUZMINA, I.; BJØRNDAL, L.; THYLSTRUP, A. Relationship between external and histologic features of progressive stages of caries in the occlusal fossa. **Caries Res**, v. 29, n. 4, p. 243-250, 1995.
- FARRUGIA, C.; CAMILLERI, J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review. **Dent Mater**, v.31, n. 4, p.89-99, 2015.
- FEATHERSTONE, J. D. Delivery challenges for fluoride chlorhexidine and xylitol. **BHC Oral Health**, v. 6, 2006.
- FEATHERSTONE, J. D.; DOMEJEAN-ORLIAGUET, S.; JENSON, L.; WOLFF, M.; YOUNG, D. A. Caries risk assessment in practice for age 6 through adult. **JCalif Dent Assoc**, v. 35, n. 10, p. 703-707, 2007.
- FEIGAL, R. J. The use of pit and fissure sealants. **Pediatr Dent**, v. 24, n. 5, p. 415-422, 2002.
- FERJESKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 182-91, 2004.
- FERJESKOV, O.; KIDD, E. **Dental caries:the disease and its clinical management**. Second Ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 2.ed. São Paulo: Santos, 2011.

FERRETTI, J. J.; MCSHAN, W. M.; AJDIC, D.; SAVIC, D. J.; SAVIC, G.; LYON, K.; PRIMEAUX, C.; SEZATE, S.; SUVOROV, A. N.; KENTON, S.; LAI, H. S.; LIN, S. P.; QIAN, Y.; JIA, H. G.; NAJAR, F. Z.; REN, Q.; ZHU, H.; SONG, L.; WHITE, J.; YUAN, X.; CLIFTON, S. W.; ROE, B. A.; MCLAUGHLIN, R. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 8, p. 4658-4663, 2001.

FLEISCH, A. F.; SHEFFIELD, P. E.; CHINN, C.; EDELSTEIN, B. L.; LANDRIGAN, P. J. Bisphenol A and related compounds in dental materials. **Pediatrics**, v. 126, n. 4, p. 760-768, 2010.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FORRY, S. P.; MADONNA, M. C.; LÓPEZ-PÉREZ, D.; LIN, N. J.; PASCO, M. D. Automation of antimicrobial activity screening. **AMB Express**, v. 6, n. 20, p. 1-10, 2016.

FRANÇA, T. R. T.; SEDYCIAS, M.; DA SILVA, R. J.; BEATRICE, L. C. S.; VICENTE DA SILVA, C. H. Use of Glass Ionomer Cements: A Systematic Review. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 10, n. 2, p. 301-307, 2010.

FRENCKEN, J. E. The state-of-the-art of ART sealants. **Dent Update**, v. 41, n. 2, p. 119-120, 2014.

FRENCKEN, J. E.; WOLKE, J. Clinical and SEM assessment of ART high viscosity glass-ionomer sealants after 8-13 years in 4 teeth. **J Dent**, v. 38, n. 1, p. 59-64, 2010.

GIANNELLI M, CHELLINI F, MARGHERI M, TONELLI P, TANI A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. **Toxicol In Vitro** v. 22, p. 308-317, 2008.

GOMEZ, J.; ZAKIAN, C.; SALSONE, S.; PINTO, S. C.; TAYLOR, A.; PRETTY, I. A.; ELLWOOD, R. In vitro performance of different methods in detecting occlusal caries lesions. **J Dent**, v. 41, n. 2, p. 180-186, 2013.

GOMEZ, J. Detection and diagnosis of the early caries lesion. **BMC Oral Health**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2015.

GOMES, B. P. F. A.; VIANNA, M. E.; SENA, N. T.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; SOUZA FILHO, F. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 4, p. 544-550, 2006.

HALLETT, K. B.; O'ROURKE, P. K. Social and behavioural determinants of early childhood caries. **Aust DentJ**, v. 48, n.1, p. 27-33, 2003.

- HALLETT, K. B.; O'ROURKE, P. K. Pattern and severity of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.34, n. 1, p. 25–35, 2006.
- HANNIG, M.; HANNIG, C. Nanomaterials in preventive dentistry. **Nat Nanotechnol**, v.5, n. 8, p. 565-569. 2010.
- HENNESSEY, T. D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J Periodontal Res Suppl**, v. 12, p. 61-67, 1973.
- HEYDORN, A.; NIELSEN, A. T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBOLL, B. K.; MOLIN, S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 146, p. 2395–2407, 2000.
- HIRSCH, G. B.; EDELSTEIN, B. L.; FROSH, M.; ANSELMO, T. A simulation model for designing effective interventions in early childhood caries. **Prev ChronicDis**, v. 9, p. 1-9, 2012.
- HIRAISHI, N.; YIU, C. K.; KING, N. M.; TAY, F. R. Effect of chlorhexidine incorporation into a self-etching primer on dentine bond strength of a luting cement. **J Dent**, v. 38, n. 6, p. 496-502, 2010.
- HIRAISHI, N.; YIU, C. K.; KING, N. M.; TAY, F. R. Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine-incorporated polymethyl methacrylate-based resin cement. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 94, n. 1, p. 134-140, 2010.
- HULL, P. S. Chemical inhibition of plaque. **J Clin Periodontol**, v. 7, n. 6, p. 431-442, 1980.
- IMAZATO, S.; CHEN, J.; MA, S.; IZUTANI, N.; LI, F. Antibacterial resin monomers based on quaternary ammonium and their benefits in restorative dentistry. **Jpn Dent Sci Rev**, v. 48, n. 2, p. 115-125, 2012.
- JEDRYCHOWSKI, J. R.; CAPUTO, A. A.; KERPER, S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. **J Oral Rehabil**, v. 10, n. 5, p. 373-381, 1983.
- 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**, v. 15, n. 7, p. 415–424, 1988.
- JINGARWAR, M.M.; BAJWA, N.K.; PATHAK, A. Minimal intervention dentistry – a new frontier in clinical dentistry. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 7, p. 4-8, 2014.
- KEIJSER, J.A.; VERKADE, H.; TIMMERMAN, M. F.; VAN DER WEIJDEN, F. A. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. **J Periodontol**, v. 74, n. 2, p. 214-218, 2003.
- KLOUKOS, D.; PANDIS, N.; ELIADES, T. In vivo bisphenol-A release from dental pit and fissure sealants: a systematic review. **J Dent**, v. 41, n. 8, p. 659-667, 2013.

KOÇAK, M. M.; OZCAN, S.; KOÇAK, S.; TOPUZ, O.; ERTEN, H. Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of streptococcus mutans in saliva. **Eur J Dent**, v. 3, n. 1, p. 57-61, 2009.

KOVARIK, R.E.; HAUBENREICH, J.E.; GORE, D. Glass ionomer cements: a review of composition, chemistry, and biocompatibility as a dental and medical implant material. **J Long Term Eff Med Implants**, v. 15, n. 6, p. 655-671, 2005.

KRZYŚCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOŚCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A. The Virulence of Streptococcus Mutans and the Ability to Form Biofilms. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n. 4, p. 499-515, 2014.

LAW, V.; SEOW, W. K.; TOWNSEND, G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. **Aust Dent J**, v. 52, n. 2, p. 93-100, 2007.

LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. A model of efficiency: stress tolerance by Streptococcus mutans. **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3247-3255, 2008.

LIAO, S.; KLEIN, M. I.; HEIM, K. P.; FAN, Y.; BITOUN, J. P.; AHN, S. J.; BURNE, R. A.; KOO, H.; BRADY, L. J.; WEN, Z. T. Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. **J Bacteriol**, v. 196, n. 13, p. 2355-2366, 2014.

LIU, Y.; ZHANG, X.; WANG, Y.; CHEN, F.; YU, Z.; WANG, L.; CHEN, S.; GUO, M. Effect of citrus lemon oil on growth and adherence of Streptococcus mutans. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n.7, p. 1161-1167, 2013.

LLENA-PUY, M. C.; MONTAÑANA-LLORENS, C.; FORNER-NAVARRO, L. Fibronectin levels in stimulated whole-saliva and their relationship with cariogenic oral bacteria. **Int Dent J**, v. 50, n. 1, p. 57-59, 2000.

LLODRA, J. C.; BRAVO, M.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; BACA, P.; GALVEZ, R. Factors influencing the effectiveness of sealants: A meta-analysis. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 21, n. 5, p. 261-268, 1993.

LOESCHE, W.J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol Rev**, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

LOESCHE, W. J.; WALENGA, A.; LOOS, P. Recovery of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis from a dental explorer after clinical examination of single teeth. **Arch Oral Biol**, v. 18, n. 4, p. 571-575, 1973.

LOSSO, E. M.; TAVARES, M. C.; SILVA, J. Y.; URBAN CDE, A. Severe early childhood caries: an integral approach. **J Pediatr (Rio J)**, v. 85, n. 4, p. 295-300, 2009.

MALTZ, M. T. Cárie: fatores relacionados. In: **Pinto, V. G. Saúde Bucal Coletiva**, 4 ed, São Paulo: Santos, p. 319-339, 2000.

- MALTERUD M. I. Minimally invasive dentistry – A biomimetic approach. **Gen Dent**, v. 60, n. 3, p. 186-187, 2012.
- MANTZOURANI, M.; FENLON, M.; BEIGHTON, D. Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 1, p. 32–37, 2009.
- MARCHANT, S.; BRAILSFORD, S. R.; TWOMEY, A. C.; ROBERTS, G. J.; BEIGHTON, D. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res**, v. 35, n. 6, p. 397-406, 2001.
- MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **Int J Dent**, v. 6, n. 4, p. 124-131, 2007.
- MARINHO, V. C. C. Evidence-based effectiveness of topical fluorides. **Adv Dent Res**, v. 20, n. 1, p. 3-7, 2008.
- MARSH, P. D. Dental biofilms in health and disease. In: **Understanding Dental Caries**. Springer International Publishing, p. 41-52, 2016.
- MARSH, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. **Dent Clin NorthAm**, v. 54, n. 3, p. 441-454, 2010.
- MARSH, P. D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **J Dent**, v. 38, n. 11, p. 11-15, 2010.
- MARSH, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community -implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v. 6, n. 14, p. 1-7, 2006.
- MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Car Res**, v. 38, n. 3, p. 204-211, 2004.
- MARSH, P. D.; MARTIN, M. V.; LEWIS, M. A.; WILLIAMS, D. **Oral Microbiology**, Philadelphia: Elsevier Health Sciences, p. 5-17, 2009.
- MARTI, L. M.; BECCI, A. C.; SPOLIDORIO, D. M.; BRIGHENTI, F. L.; GIRO, E. M.; ZUANON, A. C. Incorporation of chlorhexidine gluconate or diacetate into a glass-ionomer cement: porosity, surface roughness, and anti-biofilm activity. **Am J Dent**, v. 27, n. 6, p. 318-322, 2014.
- MELO, M. A.; GUEDES, S. F.; XU, H. H.; RODRIGUES, L. K. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. **Trends Biotechnol**, v. 31, n. 8, p. 459-467, 2013.
- MICKENAUTSCH, S.; YENGOPAL, V. Caries-preventive effect of glass ionomer and resin-based fissure sealants on permanent teeth: An update of systematic review evidence. **BMC Res Notes**, v. 4, n. 1, p. 22, 2011.
- MICKENAUTSCH, S.; YENGOPAL, V. Validity of sealant retention as surrogate for caries prevention--a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 10, 2013.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **Int Endod J**, v. 42, n. 4, p. 288-302, 2009.

MOSHAVERINIA, A.; ROOHPUR, N.; CHEE, W. W. L.; SCHRICKER, S. R. A review of powder modifications in conventional glass-ionomer dental cements. **J Mater Chem**, v. 21, n. 5, p. 1319-1328, 2011.

MULLER-BOLLA, M.; LUPI-PÉGURIER, L.; TARDIEU, C.; VELLY, A. M.; AN TOMARCHI, C. Retention of resin-based pit and fissure sealants: A systematic review. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 34, n. 5, p. 321-336, 2006.

MURREY, J. J.; NUNN, J. H.; STEELE, J. G. **Prevention of Oral Disease**, 4ed, New York, USA: Oxford University Press, 2003.

NASCIMENTO, M. M.; BURNE, R. A. Caries prevention by arginine metabolism in oral biofilms: translating science into clinical success. **Curr Oral Heal Reports**, v. 1, p. 79-85, 2014.

NYVAD, B.; CRIELAARD, W.; MIRA, A.; TAKAHASHI, N.; BEIGHTON, D. Dental caries in a molecular microbiological perspective. **Caries Res**, v. 47, n. 2, p. 89-102, 2013.

NOGOURANI, M. K.; JANGHORBANI, M.; KHADEM, P.; JADIDI, Z.; JALALI, S. A 12-month clinical evaluation of pit-and-fissure sealants placed with and without etch-and-rinse and self-etch adhesive systems in newly erupted teeth. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 3, p. 352-356, 2012.

NOMURA, R.; NAKANO, K.; NEMOTO, H.; FUJITA, K.; INAGAKI, S.; TAKAHASHI, T.; OOSHIMA, T. Isolation and characterization of Streptococcus mutans in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. **J Med Microbiol**, v. 55, n. 8, p. 1135-1140, 2006.

OBATA, J.; TAKESHITA, T.; SHIBATA, Y.; YAMANAKA, W.; UNEMORI, M.; AKAMINE, A.; YAMASHITA, Y. Identification of the microbiota in carious dentin lesions using 16S rRNA gene sequencing. **PLoS One**, v. 9, n. 8, 2014.

OLIVEIRA, L. B.; SHIENAM, A.; BÖNECKER, M. Exploring the association of dental caries with social factors and nutritional status in Brazilian preschool children. **Eur J Oral Sci**, v. 116, n. 1, p. 37-43, 2008.

PALLAN, S.; ARAUJO, M. V. F.; CILLI, R.; PRAKKI, A. Mechanical properties and characteristics of developmental copolymers incorporating catechin or chlorhexidine. **Dent Mater**, v. 28, n. 6, p. 687-694, 2012.

PALMER, C. A.; JR, K. R.; LOO, C. Y.; HUGHES, C. V.; STUTIUS, E.; PRADHAN, N.; DAHLAN, M.; KANASI, E.; AREVALO VASQUEZ, S. S.; TANNER, A. C. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. **J Dent Res**, v. 89, n. 11, p. 1224-1229, 2010.

PALMER, G.; JONES, F. H.; BILLINGTON, R. W.; PEARSON, G. J. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement. **Biomaterials**, v. 25, n. 23, p. 5423-5431, 2004.

PAN, P. C.; HARPER, S.; RICCI-NITTEL, D.; LUX, R.; SHI, W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. **J Dent**, v. 38, n. 1, p. 16-20, 2010.

PARISOTTO, T. M.; STEINER-OLIVEIRA, C.; SILVA, C. M.; RODRIGUES, L. K.; NOBRE-DOS-SANTOS, M. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. **Oral Health Prev Dent**, v. 8, n. 1, p. 59-70, 2010.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; IMAZATO, S. How to increase the durability of resin-bonded luting agents. **Compend Contin Educ Dent**, v. 32, n. 7, p. 60-64, 2011.

PAULA E SILVA, F. W. G.; QUEIROZ, A. M.; DE FREITAS, A. C.; ASSED, S. Glass Ionomer cement in pediatric dentistry. **Odontol Clín Cient**, v. 10, n. 1, p. 13-17, 2011.

PAVINATO, L.C. B.; IMPARATO, J. C. P. Efetividade do selamento de fossas e fissuras na prevenção da doença cárie: análise crítica da literatura. **Odonto (São Bernardo do Campo)**, v. 20, n. 40, p. 23-30, 2012.

PETERSON, S. N.; SNESRUD, E.; LIU, J.; ONG, A. C.; KILIAN, M.; SCHORK, N. J.; BRETZ, W. The dental plaque microbiome in health and disease. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

PIOVESAN, C.; TOMAZONI, F.; DEL FABRO, J.; BUZZATI, B. C.; MENDES, F. M.; ANTUNES, J. L.; ARDENGHI, T. M. Inequality in dental caries distribution at noncavitated and cavitated thresholds in preschool children. **J Public Health Dent**, v. 74, n. 2, p. 120-126, 2014.

PITTS, N. B. Modern concepts of caries measurement. **J Dent Res**, v. 83, p. 43-47, 2004.

PRABHAKAR, A. R.; PATTANSHETTI, K.; SUGANDHAN, S. A comparative study of color stability and fluoride release from glass ionomer cements combined with chlorhexidine. **Int J Clin Pediatr Dent**, v. 6, n. 1, p. 26-29, 2013.

PROVENZANO, M. G. A.; RIOS, D.; FRACASSO, M. L. C.; MARCHESI, A.; HONÓRIO, H. M. Avaliação clínica dos selantes realizados com cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer®) em molares decíduos. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 10, n. 2, p. 233-240, 2010.

PUIG SILLA, M.; MONTIEL COMPANY, J. M.; ALMERICH SILLA, J. M. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 4, p. 257-260, 2008.

RADFORD, J. R.; BALLANTYNE, H. M.; NUGENT, Z.; BEIGHTON, D.; ROBERTSON, M.; LONGBOTTOM, C.; PITTS, N. B. Caries-associated micro-

organisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. **J Dent**, v. 28, n. 5, p. 307-312, 2000.

RAMOS-GOMEZ, F. J.; WEINTRAUB, J. A.; GANSKY, S. A.; HOOVER, C. I.; FEATHERSTONE, J. D. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. **J Clin Pediatr Dent**, v. 26, n. 2, p. 165-173, 2002.

RATHKE, A.; STAUDE, R.; MUCHE, R.; HALLER, B. Antibacterial activity of a triclosan-containing resin composite matrix against three common oral bacteria. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, n. 11, p. 2971-2977, 2010.

RAWAL, S.; HOFFMAN, H. J.; BAINBRIDGE, K. E.; HUEDO-MEDINA, T. B.; DUFFY, V. B. Prevalence and Risk Factors of Self-Reported Smell and Taste Alterations: Results from the 2011-2012 US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). **Chem Senses**, v. 41, n. 1, p. 69-76, 2016.

RIPA, L.W. Sealants revised: an update of the effectiveness of pit and fissure sealants. **Caries Res**, v. 27, n. 1, p. 77 - 82, 1993.

RODRIGUES, J. A.; LUSSI, A.; SEEMANN, R.; NEUHAUS, K. W. Prevention of crown and root caries in adults. **Periodontol 2000**, v. 55, n. 1, p. 231-249, 2011.

SALAMA, F. S.; AL-HAMMAD, N. S. Marginal seal of sealant and compomer materials with and without enameloplasty. **Int J Pediatr Dent**, v. 12, p. 39-46, 2002.

SANDERS, B. J.; GREGORY, R. L.; MOORE, K.; AVERY, D. R. Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with chlorhexidine. **J Oral Rehabil**, v. 29, n. 6, p. 553-558, 2002.

SATO, Y.; OKAMOTO, K.; KIZAKI, H. gbpC and pac gene mutations detected in *Streptococcus mutans* strain GS-5. **Oral Microbiol Immunol**, v. 17, n. 4, p. 263–266, 2002.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **Lancet**, v. 369, p. 51-59, 2007.

SHAPIRO, S.; GIERTSEN, E.; GUGGENHEIM, B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. **Caries Res**, v. 36, n. 2, p. 93-100, 2002.

SHEMESH, M.; TAM, A.; STEINBERG, D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. **Microbiology**, v. 153, n. 5, p. 1307–1317, 2007.

SHEMESH, M.; AVSHALOM, T.; AHARONI, R.; STEINBERG, D. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. **BMC Microbiol**, v. 10, n. 51, p. 1-10, 2010.

SIMON, L. The role of *Streptococcus mutans* and oral ecology in the formation of dental caries. **Lethbridge Undergraduate Research Journal**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2007.

SIMONSEN, R. J. Pit and fissure sealant: review of the literature. **Pediat Dent**, v. 24, n. 5, p. 393-414, 2002.

SLOT, D. E.; BERCHIER, C. E.; ADDY, M.; VELDEN, U.; WEIJDEN, G. A. The efficacy of chlorhexidine dentifrice or gel on plaque, clinical parameters of gingival inflammation and tooth discoloration: a systematic review. **Int J Dent Hyg**, v. 12, n. 1, p. 25-35, 2014.

SMULLEN, J.; FINNEY, M.; STOREY, D. M.; FOSTER, H. A. Prevention of artificial dental plaque formation in vitro by plant extracts. **J Appl Microbiol**, v. 113, n. 4, p. 964-973, 2012.

SOLEYMANI, A.; BAHROLOLOOMI, Z.; JAVADINEJADI, S.; SALEHI, P. Evaluation of the effects of enameloplasty and air abrasion on sealant micro-leakage. **J Dent (Tehran)**, v. 11, n. 6, p. 639-643, 2014.

SONMEZ, I. S.; OBA, A. A.; ERKMEN, M.; EKICI, S. Effects of different fissure sealant applications on laser fluorescence measurements. **Int J Paediatr Dent**, v. 21, n. 1, p. 29-34, 2011.

SPLIETH, C.; FÖRSTER, M.; MEYER, G. Additional caries protection by sealing permanent first molars compared to fluoride varnish applications in children with low caries prevalence: a 2-year results. **Eur J Paediatr Dent**, v. 2, n. 3, p. 133-137, 2001.

SRIDHAR, L. P.; MOSES, J.; RANGEETH, B. N.; SIVAKUMAR, S. Comparative evaluation of the marginal sealing ability of two commercially available pit and fissure sealants. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 9, p. 1-4, 2016.

STRUZYCKA, I. The oral microbiome in dental caries. **Pol J Microbiol**, v. 63, n.2, p. 127-35, 2014.

SUBRAMANIAM, P.; KONDE, S.; MANDANNA, D. K. Retention of a resin-based sealant and a glass ionomer used as a fissure sealant: a comparative clinical study. **J Indian Soc Pedod Prevent Dent**, v. 26, n. 3, p. 114-120, 2008.

SUTHERLAND, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3-9, 2001.

TAKAHASHI, Y.; IMAZATO, S.; KANESHIRO, A. V.; EBISU, S.; FRENCKEN, J. E.; TAY, F. R. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorexidine for the ART approach. **Dent Mater**, v. 22, n. 7, p. 647-652, 2006.

TANG, X.; SENSAT, M. L.; STOLTENBERG, J. L. The antimicrobial effect of chlorhexidine varnish on mutans streptococci in patients with fixed orthodontic appliances: a systematic review of clinical efficacy. **Int J Dent Hyg**, v. 14, n. 1, p. 53-61, 2016.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process ecological perspectives. **J Dent Res**, v. 90, n. 3, p. 294-303, 2011.

TEN CATE, J. M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. **Odontology**, v. 94, n. 1, p. 1-9, 2006.

TEN CATE, J. M.; DAMEN, J. J.; BUIJS, M. J. Inhibition of dentin demineralization by fluoride in vitro. **Caries Res**, v. 32, n. 2, p. 141–147, 1998.

TENUTA, L.M.A.; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. **Braz Oral Res**, v. 24, n. 1, p.9-17, 2010.

THYLSTRUP, A.; BRUUN, C.; HOLMEN L. In vivo caries models – mechanisms for caries initiation and arrestment. **Adv Dent Res**, v. 8, n. 2, p. 144–157, 1994.

TOMÁS, I.; GARCÍA-CABALLERO, L.; COUSIDO, M. C.; LIMERES, J.; ALVAREZ, M. A.; DIZ, P. Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 428-433, 2009.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na odontologia. **Pós-Grad Rev Fac Odontol**, v. 3, n. 2, p. 43-52, 2000.

TÜRKÜN, L. S.; TÜRKÜN, M.; ERTUGRUL, F.; ATES, M.; BRUGGER, S. Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. **J Esthet Restor Dent**, v. 20, n. 1, p. 29-44, 2008.

VAN NOORT, R. Glass-ionomer cements and resin-modified glass-ionomer cements. **Introduction to dental materials**, Edinburgh, UK, p. 129-130, 2000.

VERKAIK, M. J.; BUSSCHER, H. J.; JAGER, D.; SLOMP, A. M.; ABBAS, F.; VAN DER MEI, H. C. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. **J Dent**, v. 39, p. 218-224, 2011.

VIEIRA, I. M.; LOURO, R. L.; ATTA, M. T.; NAVARRO, M. F. L.; FRANCISCONI, P. A. S. O cimento de ionômero de vidro na odontologia. **Rev Saúde**, v. 2, n. 1, p. 75-84, 2006.

VOLPATO F.C.; JEREMIAS, F.; SPOLIDÓRIO, D. M.; SILVA, S. R.; VALSECKI JUNIOR, A.; ROSELL, F. L. Effects of oral environment stabilization procedures on *Streptococcus mutans* counts in pregnant women. **Braz Dent J**, v. 22, n. 4, p. 280-284, 2011.

WATSON, P.S.; PONTEFRACT, H. A.; DEVINE, D. A.; SHORE, R. C.; NATTRESS, B. R.; KIRKHAM, J.; ROBINSON, C. Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. **J Dent Res.**, v. 84, n. 5, p. 451-5, 2005.

WIEGAND, A.; BUCHALLA, W.; ATTIN, T. Review on fluoride-releasing restorative materials: fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dent Mater**, v. 23, n. 3, p. 343-362, 2007.

WELBURY, R.; RAADAL, M.; LYGIDAKIS, N. A. EAPD guidelines for the use of pit and fissure sealants. **Eur J Paediatr Dent**, v. 5, n. 3, p. 179-184, 2004.

YENGOPAL, V.; MICKENAUTSCH, S. Resin-modified glass-ionomer cements versus resin-based materials as fissure sealants: a meta-analysis of clinical trials. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 11, n. 1, p. 18-25, 2010.

YENGOPAL, V.; MICKENAUTSCH, S.; BEZERRA, A. C.; LEAL, S. C. Caries-preventive effect of glass ionomer and resin-based fissure sealants and permanent teeth: a meta analysis. **J Oral Sci**, v. 51, n. 3, p. 373-382, 2009.

XIAO, J.; KLEIN, M. I.; FALSETTA, M. L.; LU, B.; DELAHUNTY, C. M.; YATES, J. R.; HEYDORN, A.; KOO, H. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3d architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, 2012.

XIE, D.; WENG, Y.; GUO, X.; ZHAO, J.; GREGORY, R. L.; ZHENG, C. Preparation and evaluation of a novel glass-ionomer cement with antibacterial functions. **Dent Mater**, v. 27, n. 5, p. 487-96, 2011.

ZANATTA, F. B.; RÖSING, C. K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZHU, L.; KRETH, J.; CROSS, S. E.; GIMZEWSKI, J. K.; SHI, W.; QI, F. Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 152, n. 8, p. 2395–2404, 2006.