



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**FÁTIMA MARIA CAVALCANTE BORGES**

**EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA  
SOBRE DENTINA HUMANA INFECTADA POR BACTÉRIAS  
CARIOGÊNICAS: ESTUDO *IN VITRO* E *IN SITU***

**FORTALEZA**

**2009**

FÁTIMA MARIA CAVALCANTE BORGES

EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA SOBRE  
DENTINA HUMANA INFECTADA POR BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS: ESTUDO  
*IN VITRO E IN SITU*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Co-orientadora: Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin .

FORTALEZA  
2009

Ficha catalográfica

B731e Borges, Fátima Maria Cavalcante

Eficácia antimicrobiana do digluconato de clorexidina sobre dentina humana infectada por bactérias cariogênicas: estudo *in vitro* e *in situ* / Fátima Maria Cavalcante Borges. – Fortaleza, 2009.

54 f.

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Agentes Antibacterianos 2. Cárie Dentária 3. *Streptococcus mutans* I. Rodrigues, Lidiany Karla Azevedo (orient.) II. Título.

CDD 617.67

**FÁTIMA MARIA CAVALCANTE BORGES**

**EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA SOBRE  
DENTINA HUMANA INFECTADA POR BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS: ESTUDO  
*IN VITRO* E *IN SITU***

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da  
Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de  
Mestre em Odontologia.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Juliano Sartori Mendonça  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

***Dedico este trabalho:***

*Ao **Roberto**, meu marido, incentivador, companheiro e colega, por estar sempre ao meu lado colaborando e participando intensamente de todos os momentos da minha vida. Seu apoio me conforta e fortalece na busca da realização dos meus ideais. Agradeço a Deus por tê-lo, colocado em meu caminho, seu amor me estimula a seguir sempre em frente. Obrigada por existir em minha vida.*

*Aos meus tesouros: **Priscila, Augusto e Robertinho**, filhos maravilhosos, amáveis e compreensivos, motivos de tantas alegrias..., a participação e compreensão de vocês é essencial à harmonia do nosso lar. Vocês são a luz da minha vida, amo-os infinitamente.*

*Aos meus pais **Eli e Alice**, exemplos de fortaleza e dedicação à família, pelo carinho e amor com que me acolhem e pelos valores éticos e morais que me transmitiram.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A **Deus**, pelas bênçãos que derrama em abundância sobre mim e todos que me cercam. Senhor, eu Vos agradeço e Vos peço: ajuda-me a ser merecedora da vossa imensa bondade!

À **Profa. Dra. Lidianny Karla Azevedo Rodrigues**, professora do Curso de Odontologia da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, minha dedicada orientadora, por me despertar para o mundo da pesquisa científica e pela forma compromissada com que acompanhou o desenvolvimento desta e de outras pesquisas. Muito obrigada Professora, não só pela orientação dos trabalhos, mas também pela oportunidade de conviver com essa jovem mulher, forte, guerreira, devotada ao ensino e à pesquisa, que equilibra com sabedoria, os conhecimentos, a experiência e a simplicidade.

À **Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin**, Co-orientadora deste trabalho pela valiosa transmissão dos ensinamentos, especialmente de microbiologia, incentivo e dedicação no acompanhamento dos experimentos laboratoriais.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, na pessoa do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Jesualdo Pereira Farias**.

À Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem, na pessoa da sua diretora, **Profa. Dra. Neiva Francenely Cunha Vieira**.

Ao Curso de Odontologia, na pessoa de sua coordenadora, **Profa. Dra. Maria Eneide Leitão de Almeida** e do Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia, **Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago**.

Ao **Grupo de Professores** do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará pelo empenho em favor do crescimento e reconhecimento do Programa.

Ao Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, na pessoa de sua Coordenadora, **Profa. Dra. Iriana Carla Junqueira Zanin**, pela disponibilização do Laboratório de Microbiologia, essencial ao desenvolvimento desta pesquisa.

Às colegas **Juliana Paiva Marques Lima** e **Mary Anne Sampaio de Melo**, pela amizade e companheirismo durante nosso curso de mestrado. Que os laços criados nunca se desfaçam.

Às colegas, **Rosane Pontes de Sousa** e **Suyane Maria Luna Cruz de Vasconcelos**, que nos antecederam nas pesquisas e repassaram com generosidade a experiência adquirida no desenvolvimento de seus projetos.

À colega **Alrieta Henrique Teixeira**, pela participação nesta pesquisa, e gentil acolhida às colegas Juliana e Mary Anne, em sua residência, para a realização de experimentos na cidade de Sobral- CE.

Aos bolsistas de pesquisa **Diego Martins de Paula** e **João Paulo Saraiva Wenceslau**, pela colaboração e participação no desenvolvimento das pesquisas.

Às colegas **Daniela Bezerra** e **Denise Moraes**, pela disponibilidade em colaborar com os nossos experimentos.

Aos **Voluntários**, pelo compromisso e seriedade com que participaram deste estudo possibilitando-nos a obtenção dos resultados.

Ao técnico de laboratório do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará – Campus de Sobral, **Ruliglesio Rocha**, pela colaboração nos experimentos de microbiologia.

Aos colegas da turma de mestrado pela convivência e amizade desenvolvida durante o curso.

Aos secretários da Pós-graduação, **Germano Mahlmann Muniz Filho e Lúcia Ribeiro Marques Lustosa**. Obrigada pela gentileza e presteza com que sempre me atenderam.

Aos funcionários das clínicas do Curso de Odontologia da UFC, **Clotildes Ferreira de Souza, Maria Célia do Vale Forte, Sílvia Helena Penha Moraes Rego e Francisco Antonio Nunes da Silva**, pela atenção e alegria com que nos atenderam nas atividades clínicas do mestrado.

À jovem **Rebeca Pompeu Gurjão** pelas criações gráficas das apresentações dos trabalhos.

À **Profa. Simone Cristina Barros Viana**, pela revisão de Língua Portuguesa desta dissertação.

À Bibliotecária do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, **Rosane Maria Costa**, pela normatização e catalogação desta dissertação.

À **Dra. Andrea Borges Monteiro Pires**, companheira de trabalho, que tantas vezes me socorreu, suprimindo minha ausência nas atividades clínicas do consultório.

Aos meus **Irmãos, Familiares e Amigos** que torcem e se alegram com as minhas conquistas.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.



*“Viver!  
E não ter a vergonha  
De ser feliz,  
Cantar e cantar e cantar  
A beleza de ser  
Um eterno aprendiz...”*

**Gonzaguinha**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO .....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>

## RESUMO

A cárie dentária inicia-se com a desmineralização do esmalte. Sua progressão origina as lesões de cárie com dentina infectada por bactérias, que poderão permanecer na estrutura dentária, após os preparos cavitários. Várias abordagens tem sido descritas para eliminar ou reduzir bactérias sob restaurações, desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in situ* os efeitos de um agente de limpeza cavitária a base de digluconato de clorexidina a 2% (CHX), na desinfecção de dentina cariada, bem como determinar a redução de contagem de diferentes tipos de microrganismos por este agente antimicrobiano. Setenta blocos de dentina humana, foram submetidos a desafio cariogênico, por método microbiológico *in vitro* (n=15), e *in situ* (n=20). No estudo *in vitro*, 30 blocos de dentina foram imersos por 5 dias, em caldo BHI inoculado com *Streptococcus mutans* CTT 3440, para indução de cárie. No estudo *in situ*, 20 voluntários usaram dispositivos palatinos contendo dois blocos de dentina que foram gotejados com solução de sacarose 40%, 10 vezes ao dia, durante 14 dias. Ao final de cada período experimental, os blocos de dentina foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Controle (solução de NaCl a 0,9%) e CHX. Amostras de dentina infectada foram coletadas antes e 5 min após cada tratamento, em seguida, as bactérias foram cultivadas e os microrganismos contados. *In vitro* foram avaliados estreptococos mutans, e *in situ*, estreptococos totais, estreptococos mutans, microrganismos viáveis totais e lactobacilos. A redução microbiana promovida por cada tratamento foi calculada e comparada entre os grupos pelo teste t, a susceptibilidade dos microrganismos isolados *in situ* foi comparada pela análise de variância ANOVA ( $\alpha= 5\%$ ). A redução microbiana promovida pela CHX, foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle para todos os microrganismos avaliados, tanto *in vitro* quanto *in situ*. No entanto, não houve diferença na redução de contagem dos vários microrganismos avaliados. Desta forma, a CHX foi capaz de reduzir a população microbiana em dentina infectada, sugerindo que esta abordagem pode ser uma ferramenta auxiliar para desinfecção de dentina cariada residual, suprimindo o crescimento de microrganismos associados ao desenvolvimento de cárie.

**Palavras-chave:** Agentes anti-bacterianos, Cárie dentária, *Streptococcus mutans*.

## ABSTRACT

Dental caries begins with enamel demineralization. Caries progression leads to dentinal lesions with dentin infected by bacteria, which may remain in tooth structures, after the cavity preparations. Several approaches have been described to reduce or eliminate microorganisms underneath the restorations. Thus, the aim of the present study was to verify the antibacterial efficacy of 2% chlorhexidine-gluconate-based cavity disinfectant (CHX) on caries lesions produced *in vitro* and *in situ* as well as to determine the susceptibility of different species against this antimicrobial agent. Seventy slabs of human dentin were randomly allocated and subjected to cariogenic challenge by an *in vitro* microbial model (n=15), as well as an *in situ* model (n=20). In the *in vitro* study, 30 dentin slabs were immersed during 5 days in BHI broth inoculated with *Streptococcus mutans* CTT 3440, for caries induction. In the *in situ* study, 20 volunteers wore palatal appliances with two slabs, which were dropped with a 40% sucrose solution, 10 times/day, during 14 days. At the end of each experimental period, the dentin slabs were randomly distributed into two groups, as follows: Control (0.9% NaCl solution) and CHX. Samples of infected dentin were harvested before and 5 min after each treatment, afterwards, bacteria were plated and the microorganisms counted. The following microorganisms were evaluated: *S. mutans in vitro* and *in situ*, total streptococci, total viable microorganisms and lactobacilli. Microbial reduction was obtained for each treatment and compared between the groups by t test, the susceptibility from *in situ* isolated microorganisms was compared by analysis of variance ANOVA ( $\alpha=5\%$ ). The microbial reduction promoted by CHX was statistically significant when compared to control group for all microorganisms evaluated both *in vitro* and *in situ*. However, statistically significant differences were not found for susceptibility of the several evaluated microorganisms to CHX. Therefore, CHX was able of reducing microbial population in infected dentin, suggesting that this approach may be an auxiliary tool for treating residual carious dentin suppressing the growth of microorganisms related to dental caries development.

**Keywords:** Anti-infective agents, Dental caries, Mutans streptococci.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cárie dentária tem seu início a partir da desmineralização do esmalte e se estabelece com a destruição localizada e progressiva dos tecidos duros do dente. A lesão poderá progredir em direção à dentina, inicialmente caracterizando-se por uma área de dentina amplamente desmineralizada, localizada sob uma zona parcialmente desmineralizada e infectada com bactérias (KIDD; JOYSTON-BECHAL, 2000). Com os inúmeros avanços ocorridos no sentido do diagnóstico precoce e tratamento das sequelas da doença cárie, uma nova abordagem à saúde oral, que engloba a prevenção, com enfoque na remineralização do esmalte e dentina parcialmente desmineralizada, vem sendo desenvolvida (MOUNT, 2007).

Nas últimas décadas, a remineralização dos tecidos duros dos dentes tem sido objeto de numerosos estudos que embasam os procedimentos operatórios atuais, orientados pelo princípio da máxima preservação da estrutura dentária e permitem a escavação apenas da dentina cariada presente na camada mais externa da lesão, infectada por bactérias, mantendo-se preservada a camada mais interna, teoricamente passível de remineralização (TEN CATE, 2001).

Clinicamente, para que os tratamentos restauradores sejam mais conservativos e menos complexos, o ideal é que durante o preparo cavitário, ocorra apenas a remoção da dentina contaminada necrótica, não passível de remineralização (KIDD; JOYSTON-BECHAL, 2000). No entanto, a diferenciação entre as zonas de cárie é extremamente crítica, de maneira que pode ocorrer ou a permanência de dentina infectada ou a remoção de grande quantidade de tecido remineralizável (MALIK *et al.*, 1990; BURNS *et al.*, 1994). Desta forma, o uso de corantes tem sido recomendado para auxiliar a evidenciação das bactérias presentes na dentina e facilitar a remoção clínica somente de dentina infectada. Entretanto, alguns estudos relatam que os corantes não diferenciam de maneira precisa, os tecidos infectados por bactérias daqueles apenas desmineralizados e afetados pelo processo carioso (YIP *et al.*, 1994; BOSTON; LIAO, 2004). Conseqüentemente, seu uso de maneira indiscriminada pode levar a uma remoção desnecessária de dentina, substrato essencial à manutenção da vitalidade do dente.

Assim, o diagnóstico e a remoção de lesões ativas de cárie, estão sujeitos a critérios subjetivos que resultam de percepções variadas dos profissionais, quanto à

quantidade e qualidade de tecido cariado a ser removido (BANERJEE *et al.*, 2000). Por conseguinte, o desenvolvimento de métodos que assegurem superfícies livres de bactérias sem extensivo preparo cavitário, seria de grande valia no campo da Odontologia. Desta forma, tem-se pesquisado o uso de soluções antimicrobianas na limpeza da cavidade o que pode possibilitar a eliminação de bactérias *in vivo*, diminuindo a quantidade de tecido dentário a ser removido durante o preparo cavitário (BURNS *et al.*, 1994; BURNS *et al.*, 1995).

Dentre as substâncias pesquisadas, o digluconato de clorexidina (CHX) tem-se apresentado como um agente antimicrobiano promissor, por sua capacidade de reduzir de forma significativa, os níveis bucais de microrganismos relacionados à cárie dentária em saliva e placa bacteriana (EMILSON, 1981; ARAÚJO *et al.*, 2002; VAN STRIJP *et al.*, 2008). No entanto, estudos que elucidem a real eficácia deste agente antimicrobiano em substrato dentinário são escassos, tendo sido realizados com o uso da clorexidina associado a restaurações de ionômero ou resina (WICHT *et al.*, 2004; ERSIN *et al.*, 2006) o que, pelo próprio selamento promovido pela restauração e ação antimicrobiana do flúor, pode reduzir bactérias (ERSIN *et al.*, 2006; MERTZ-FAIRHURST *et al.*, 1986, 1995, 1998). Desta forma, ainda existe a necessidade de comprovação da eficácia isolada e imediata da CHX em lesões de cárie.

Adicionalmente, estudos sobre os efeitos da CHX empregada usualmente como solução desinfetante de preparos cavitários (DE CASTRO *et al.*, 2003) revelam que a mesma apresenta função antiproteolítica, inibindo de forma inespecífica a ação de metaloproteinasas (GEDRON *et al.*, 1999; PASHLEY *et al.*, 2004; HEBLING *et al.*, 2005). Essas enzimas presentes na saliva e na matriz extracelular de células humanas, apresentam atividade metabólica de remodelação e degradação de vários tipos de colágeno (BOURD-BOITTIN *et al.*, 2005). Em função do processo de mineralização da dentina, essas enzimas ficam retidas na matriz extracelular em estado latente (TJÄDERHANE *et al.*, 1998), mas podem ser ativadas se a dentina for desmineralizada (FUKAE *et al.*, 1991), podendo acarretar falhas na interface adesiva. Desta forma, o emprego do digluconato de clorexidina a 2%, previamente ao procedimento restaurador, além de proporcionar mais segurança na eliminação de microrganismos remanescentes no preparo cavitário, poderia também retardar a degradação da interface dente/restauração, representando um importante passo na Odontologia Restauradora.

Diante destas considerações, as hipóteses do presente estudo são de duas ordens: a primeira hipótese nula foi de que, a curto prazo, não há diferença no efeito de desinfecção do digluconato de clorexidina a 2% e solução de NaCl a 0,9%, sobre dentina humana contaminada com bactérias cariogênicas em modelo microbiológico *in vitro* e *in situ*, avaliada pela contagem microbiológica e a segunda, que não há diferença na susceptibilidade das diferentes espécies de microrganismos encontradas em lesões dentinárias *in situ*, a esse agente a base de clorexidina.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Os objetivos do presente estudo foram:

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito antimicrobiano do digluconato de clorexidina a 2 %, em dentina humana submetida a desafio cariogênico *in vitro* e *in situ*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar, o efeito antimicrobiano do digluconato de clorexidina a 2%, sobre *S. mutans* CTT 3440, inoculados em dentina humana, submetida a desafio cariogênico *in vitro*.

Avaliar, o efeito antimicrobiano do digluconato de clorexidina a 2% sobre microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos mutans e lactobacilos, presentes em dentina humana submetida a desafio cariogênico *in situ*;

Comparar a redução na contagem microbiana determinada pela CHX, nos modelos *in situ* e *in vitro*, para desafio cariogênico;

Avaliar, através de microscopia de força atômica, possíveis alterações morfológicas do *S. mutans* CTT 3440, submetido ao tratamento com digluconato de clorexidina a 2%.

Verificar, através de microscopia de força atômica, a presença do *S. mutans* CTT 3440, na dentina submetida ao desafio cariogênico, após a remoção do biofilme produzido pelo modelo microbiológico *in vitro*,

### 3 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato (Anexo A). Por se tratarem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob protocolo nº 185/08. (Anexo B). Os voluntários receberam informações e orientações, por escrito, sobre o desenvolvimento da pesquisa e para formalizar sua participação, assinaram termos de consentimento livre e esclarecido, (Apêndices A, B e C). Assim sendo, esta dissertação de mestrado é composta de um capítulo que contém um artigo a ser submetido para a publicação no periódico “Caries Research”.

Antimicrobial efficacy of 2% chlorhexidine digluconate against cariogenic bacteria in human dentine: an *in vitro* and *in situ* study.

Borges FMC, de-Melo MAS, Lima JPM, Teixeira AH, Zanin ICJ, Rodrigues LKA.



**Antimicrobial efficacy of 2% chlorhexidine digluconate against cariogenic bacteria in human dentine: an in vitro and in situ study.**

Borges FMC<sup>1</sup>, de-Melo MAS<sup>1</sup>, Lima JPM<sup>1</sup>, Teixeira AH<sup>1</sup>, Zanin ICJ<sup>2</sup>, Rodrigues LKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ce, Brazil

<sup>2</sup>Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

**Running Title** – Antimicrobial effects of chlorhexidine on carious dentine

**Keywords:** Anti-bacterial agents, Dental caries, *Streptococcus mutans*.

**Full address of the author to whom correspondence should be sent:**

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

Rua Cap. Francisco Pedro S/N -

Bairro- Rodolfo Teófilo - CEP 60430-170

Phone- #558533668410

Fax- #558533668232

Fortaleza-CE-Brazil

E-mail: lidianykarla@yahoo.com

**Declaration of interests**

The authors declare that there is no potential conflict of interest because none of the authors has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgment.

**Abstract**

The aim of the present study was to verify the antibacterial efficacy of a 2% chlorhexidine-digluconate-based cavity disinfectant on dentine contaminated by cariogenic bacteria in vitro and in situ. Seventy occlusal human dentine slabs were randomly allocated to the studies and divided into two groups: Control (0.9% NaCl solution) and CHX (2% chlorhexidine-digluconate-based cavity disinfectant). In the in vitro study, for each group fifteen slabs were immersed for 5 days in BHI broth inoculated with *Streptococcus mutans* for caries induction. In the in situ study, for 14 days, 20 volunteers wore intra-oral palatal devices containing two slabs that received a 40% sucrose solution, 10 times a day. At the end of the experimental periods, contaminated dentine samples were collected and bacteria cultured, for microorganism counts. The antimicrobial effect of CHX was evaluated with regard to mutans streptococci for the in vitro and in situ studies and to the total viable microorganisms, total streptococci and lactobacilli for the in situ study. The t-test was used to compare differences in microbial reductions between Control and CHX groups. Analysis of variance was applied to determine the susceptibility of different species against the antimicrobial agent. The groups treated with CHX, in vitro and in situ, presented significant decreases in the viability of all studied microorganisms in comparison to the respective control groups. However, no differences were found for the susceptibility of the species to CHX. Based on these results, CHX can reduce microbial population in contaminated dentin, suggesting that this approach may be an adjunct tool to disinfect residual carious dentin in tooth preparations.

## **Introduction**

The development of a method to ensure bacterial-free substrates without extensive tooth preparation would be highly useful to the field of Operative Dentistry, since there is no currently available effective method for killing residual bacteria in dentinal tissue. Consequently, a new approach to oral health, which includes prevention and early diagnosis of caries lesions with focus on the remineralization of partially demineralized enamel and dentine, has been developed [Mount, 2007]. These procedures are guided by the principle of maximum preservation of tooth structure allowing, in dentinal caries, the preservation of the innermost layer, in theory, susceptible to remineralization [ten Cate, 2001].

The diagnosis of active lesions and removal of caries frequently depends on subjective criteria resulted from the professionals' knowledge. This way, there are several perceptions about the quantity and quality of carious tissue to be removed [Banerjee et al., 2000]. Dentine caries occurs in different layers of the tooth, in which the outer layer is highly infected with bacteria that dissolve the mineralized tissue of dentine and damages the collagen matrix, resulting in an impossibility of remineralization. This layer must be completely removed during caries excavation. Nevertheless, the inner layer is less frequently contaminated with bacteria and although bacteria may dissolve the mineralized tissue, the cross-banded ultra structure of the collagen matrix will remain. Accordingly, the dentine of this carious layer can be preserved and remineralized if these bacteria are removed or killed [Ogushi and Fusayama, 1975; Zavgorodniy et al., 2008].

The differentiation between the areas of caries is highly critical, it might occur the residence of infected dentine or the removal of large amounts of tissue during tooth preparation [Malik et al., 1990, Burns et al., 1994]. The use of caries detecting dyes has been recommended to facilitate clinical discrimination of carious dentine from sound dentine during caries removal. However, these dyes do not provide a completely objective method for assessment of caries removal since they appear to stain demineralized collagen matrices instead of bacteria [Boston and Graver, 1989]. Therefore, excessive removal of dentine, [Yip et al., 1994] or incomplete removal of bacteria has been reported. Thus, there is also a concern that the routine use of dyes would result in excessive removal of tooth structures. [Banerjee et al., 2003].

Antimicrobial substances may be a potential treatment for dentine disinfection, decreasing the possibility of infected tissue existence after tooth preparation. Thus, the use of antimicrobial solutions for cleaning the cavity after its preparation has been recommended. Chlorhexidine represents a promising antimicrobial agent due to its ability to significantly reduce the levels of oral microorganisms [Leonardo et al., 1999]. Different formulations of chlorhexidine have been used for reducing the number of cariogenic bacteria in saliva [Dasanayake et al., 2002; Petti and Hausen, 2006] and plaque [Emilson, 1981; Araújo et al., 2002; van Strijp et al., 2008]. However, studies of decontamination induced in a particular environment are relevant since drug distribution is dependent on the medium. The very short-term antimicrobial effect of 2% chlorhexidine digluconate has not been evaluated since in the previous *in vivo* studies, chlorhexidine-based agents were analyzed after weeks or months and in combination with subsequent restorations [Wicht et al., 2004].

As the incomplete removal of caries-infected dentine during tooth preparation may result in the production of toxins that diffuse into the pulp, causing pulpal irritation and inflammation [Brännström, 1986] and its complete removal may enlarge the cavity, pre-treatment of the tooth surface with an antibacterial agent may be useful in eliminating the harmful effects caused by either the residual bacteria or by bacterial microleakage.

In view these considerations, the hypothesis of this article are two-fold: the first null hypothesis was that there is no difference in the very short-term *in vitro* and *in situ* effect of 2% chlorhexidine-digluconate-based cavity cleanser and 0,9% NaCl solution on the disinfection of dentine contaminated with cariogenic bacteria as assessed by microbiological counts and the second was there is no difference in the susceptibility of different species found *in situ* in dentinal lesions, against this chlorhexidine-based agent.

## **Material and Methods**

### *Ethical aspects and study population*

This study was performed in conformity with the norms of the Research and Ethics Committee of Federal University of Ceará (Process # 185/08). The teeth used in this investigation were collected from adults living in Fortaleza, Brazil. For the experiments, 85 extracted human third molars that had more than two-thirds of the formed roots, and without any previous lesions, extracted for reasons other than this research, were stored in 0.01% (v/v) thymol solution at 4°C prior to use [Gilmour et al., 1997]. For *in situ*

phase, twenty-eight adult volunteers able to comply with the experimental protocol, were invited to participate. They were not admitted to the study if any of the following conditions were present: active caries lesions, use of any antibiotics within the past 6 months prior to the study, or antimicrobial dentifrice, use of fixed or removable orthodontic devices, insufficient address for follow-up unwillingness to return for follow-up, or residence outside the city of Fortaleza. Eight potential subjects refused to participate, thus 20 volunteers were selected and initiated the in situ study. Consent forms were signed prior to enrollment in the study.

## **Experimental design**

### *In vitro experiment*

Forty-five slabs were randomly allocated to 3 groups, with 15 experimental units per group, according to a computer generated randomization list [Bolliger et al., 2000]. The experimental design was performed in triplicate (n=5) at different time points to minimize the inherent bias related to microbiological procedures. In order to isolate the microorganism ability in dentine caries production, one group was only exposed to a non-inoculated BHI broth. In addition, this study involved 2 set conditions in which carious dentine was exposed to 0.9% NaCl solution (Control) or 2% chlorhexidine digluconate (CHX) for 5 min.

### *In situ experiment*

A double-blind in situ design was conducted in one phase of 14 days, during which 20 volunteers wore palatal devices containing two human dental dentine slabs. At the end of the clinical phase, the slabs were randomly allocated into one of the following treatments: 0.9% NaCl solution (Control) and 2% chlorhexidine digluconate (CHX).

### *Specimen Preparation*

In order to remove the occlusal enamel of the teeth, a polishing device (Arotec, São Paulo, SP, Brazil) was used with silicon carbide waterproof 100 grit paper under abundant irrigation. The surfaces obtained were assessed by microscope examination at 40x magnification to ensure complete enamel removal. Thus, the teeth were fixed in acrylic devices and cut using a water-cooled diamond saw and a cutting machine (IsoMet™ Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) to obtain dentine discs with 2-mm thick and then 85 slabs of coronal dentine (5x5x2 mm<sup>3</sup>) were obtained (Figure 1A). Afterwards, the specimens were polished using three different silicon carbide waterproof papers (300, 600 and 1200 grit) as well as polishing cloths with 1 µm

diamond paste (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). This resulted in a 25 mm<sup>2</sup> dentine surface area that served as a microbial model to produce caries lesions, as assessed by visual examination. The slabs were immersed in sterile distilled water, and then sterilized by autoclaving to 121°C for 15 minutes [Pantera and Schuster, 1990] and stored in 100% humidity until beginning to the experiments. Forty-five dentine slabs were selected for the in vitro study, and so fixed in the lids of glass container vessels with plastic rods, only the occlusal dentine face was used, and the remaining surfaces of the slabs were protected with resin epoxy adhesive Araldite Hobby (Brascola, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil) (Figure 1B). For the in situ study, the other 40 dentine slabs were selected and inserted into the palatal appliances (Figure 1D).

#### *In vitro lesion production*

The microorganism used in this study to infect dentine slabs, was *S. mutans* CTT 3440. To prepare the inoculum, *S. mutans* was first grown in an overnight culture of brain heart infusion (BHI) (Difco Lab. Detroit, MI, USA) in a 10% CO<sub>2</sub> atmosphere (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Bacterial growth was followed by a UV-Vis spectrophotometer, a specific optical density was determined and used for all samples to adjust the inoculum to the same cell number. The dentine slabs previously sterilized were removed from distilled water and immersed in sterile BHI containing 5% sucrose (w/v). All BHI-containing recipients, except the not inoculated group (untreated), were inoculated with 80 µl of 1-2 x 10<sup>8</sup> CFU/ml overnight cultures of *S. mutans* CTT 3440.

Inoculation of each BHI-containing recipient was performed only once on the first day, and the dentine specimens were transferred to a fresh medium every day for 5 days (Figure 1C). In addition, each BHI-containing recipient was streaked onto a new fresh BHI agar media plated and incubated at 37°C in an atmosphere of 10% CO<sub>2</sub> for 24 h to check for purity.

#### *Intraoral phase*

For each volunteer an acrylic palatal device containing two human dental dentine slabs was fabricated. Two cavities (6×6×3 mm) were prepared, one in the left and one in the right side; one slab was attached with wax in each cavity. In order to allow biofilm accumulation and to protect it from mechanical disturbance, a plastic mesh was positioned on the acrylic resin, leaving a 1 mm space from the slab surface [Benelli et al., 1993; Cury et al., 1997, 2000]. During the lead-in period (7 days) and throughout the clinical phase, the volunteers brushed their teeth with a fluoridated dentifrice

(Sorriso Dentes Brancos – calcium carbonate-based dentifrice, 1.500 µg F/g, as MFP, Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brazil). Also, the volunteers received oral and written instructions to wear the appliances at all times, including nights. They were allowed to remove the appliances only during meals or when consuming acidic drinks and performing oral hygiene. When removed, the devices were kept moist in plastic boxes to keep the bacteria biofilm viable [Cury et al., 2000]. The cariogenic challenge was provided by dripping a 40% sucrose solution [Aires et al., 2005] onto all dentine slabs 10 times a day at a pre-determined schedule (8.00, 9.30, 11.00, 12.30, 14.00, 15.30, 17.00, 18.30, 20.00 and 21.30) [Duggal et al., 2001; Ccahuana et al., 2007]. Before replacing the palatal appliance in the mouth, a 5 min waiting time was standardized for sucrose diffusion into the dental biofilm (Figure 1D).

The dentifrice treatment was performed 3 times a day, after mealtimes when volunteers habitually performed their oral hygiene [Sousa et al., 2009]. The appliances were extra-orally brushed, except the slab area, and volunteers were asked to brush carefully over the covering meshes, to avoid disturbing the biofilm. All volunteers consumed fluoridated water (0.70 mg F/l), and no restriction was made with regard to the volunteers' dietary habits. On the 15<sup>th</sup> day, the volunteers stopped wearing the intraoral device and returned it to the researcher.

#### *Treatments and Microbiological Analysis*

At the end of the laboratorial and clinical phases, 6<sup>th</sup> day in vitro and 15<sup>th</sup> day in situ, the slabs were randomly allocated to the two groups: Control group (0.9% NaCl solution) and CHX group (2% chlorhexidine digluconate solution, Cavity Cleanser™ BISCO Schaumburg, IL, EUA), in which carious dentine was exposed to 5 µl of NaCl solution or CHX for 5 minutes.

The biofilm formed over the slabs was removed with a scalpel, blade #15C (Figure 1E), and the carious dentine was exposed. The microbiological analyses of carious dentine were performed immediately before and after performing the treatments. Then, one baseline dentine sample was harvested from one intact half of each slab, using a #5 carbide bur in a low speed drill (Labor dental, São Paulo, SP, Brazil) as described by [Kidd et al., 1995]. The second sample was obtained in the same way after performing the respective treatment (Figure 1F). The dentine samples were analytically weighed using pre-weighed microcentrifuge tubes containing the bur, to which 0.9% NaCl solution was added (1ml.mg<sup>-1</sup> dentine) (Figure 1G). In order to detach the bacterial cells, the tubes were agitated for 1min in a Disrupter Genie Cell Disruptor (Precision



Solutions, Rice Lake, WI, USA) after receiving three sterile glass beads (0.1 mm diameter). Afterwards, the suspension was serially diluted (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 and 1:1000000) in 0.9% NaCl solution. In order to assess microorganism viability, samples were plated in triplicate in mitis salivarius agar (MSA agar) containing 15% sucrose to determine total streptococci; mitis salivarius agar plus 0.2 bacitracin ml<sup>-1</sup> (MSB agar) to determine mutans streptococci (MS) [Gold et al., 1973]; Rogosa agar supplemented with 0.13% glacial acetic acid to assess the number of lactobacilli (LB) [Rogosa et al., 1951]; and blood agar to determine total viable microorganisms (TVM) for in situ study (Figure 1H). The plates were incubated for 48h at 37°C in a partial atmosphere of 10% CO<sub>2</sub>. Rogosa plates were additionally incubated for 24 hours. Representative colonies of MS, TS, LB and TVM were counted using a colony counter, and the results were expressed in CFU.mg<sup>-1</sup> of dentine.

#### *Atomic force microscopy (AFM)*

In order to verify changes in the morphology of treated and non-treated bacterial cells, an AFM analysis was utilized in dentine from one sample of each group. Moreover, this analysis aimed to verify the presence of *S. mutans* CTT 3440, inside dentinal tubules and over dentine after biofilm removal, besides microbiological analyses. AFM images of the dentine substrate were obtained from the slabs submitted to in vitro model.

Three slabs were randomly selected and scanned by an atomic force microscope (AFM) in different areas, for taking bacterial images. All images were collected in contact mode using sharpened silicon nitride cantilevers with experimentally determined spring constants of 0.15 Nm<sup>-1</sup> and a tip radius of <20 nm and at a scan rate of 0.5 Hz, using a Nanoscope IIIA Bioscope (Veeco Digital Instruments, Santa Barbara).

#### *Statistical analysis*

In order to assess the effect of the treatments, the dependent variable log reductions was analyzed. The log reduction results were calculated by subtraction of the initial values from the final values of CFU.mg<sup>-1</sup> of dentine after being transformed by Log<sub>10</sub>. In order to compare differences between the treatments (Control and CHX), in the in vitro experiment a t-test for independent samples was applied. For comparing the chlorhexidine efficacy on different microorganisms related to dentinal caries produced in situ, a one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test was used. The normal distribution of errors (Shapiro Wilks test) and the assumptions of equality of variances

(Levene Test) were verified. For SM and TVM, these assumptions were not satisfied, thus a t-test assuming unequal variances (heteroscedastic) was used. The significance level was set at 5%. The software BioStat 2007 Professional (Analyst Soft Robust business solutions company, Vancouver, Canada) was utilized.

## Results

The Log reductions means found for CHX treatment on tested microorganism were higher when compared to Control group either in vitro or in situ conditions, as showed in Figure 2 and 3. In addition, no differences were found in susceptibility of the several microorganisms collected from dentinal caries produced in situ, since very similar log reductions were verified ranging from 3.32 to 3.95 ( $p=0.720$ ). Similarly, no difference was found between susceptibility for *S. mutans* to chlorhexidine in vitro and in situ, which presented log reductions of 3.71 and 3.95 respectively. With regard to atomic force microscopy analysis, data showed no morphological differences for *S. mutans* chains among the tested groups. However, the presence of the bacteria was evidenced over carious dentine as well as inside the dentine tubules (Figures 4A and 4B).

## Discussion

The antibacterial active substance CHX is widely considered to be the most effective agent against dental plaque and gingivitis [Auschill et al., 2005]. Thus, all “new” antibacterial products have been compared with the “gold standard” CHX [Jones, 1997]. There are numerous studies about the effect of chlorhexidine on oral microorganisms, in particular on *S. mutans*, which are associated with the development of caries lesions [Marsh, 1994]. However, in most former methods used, the examined bacteria were not available on/inside dentine substrate. When chlorhexidine-based agents were analyzed as cavity disinfectant, its effect was only evaluated after weeks [Wicht et al., 2004] or months and in combination with atraumatic restorative treatment (ART) [Ersin et al., 2006]; or associated to compomer restorations [Wicht et al., 2004]. This fact may be relevant when one consider that ART is performed with glass ionomer cement (GIC) usage, and it is confirmed that placement of GIC reduced bacteria in tooth preparations, even without any antimicrobial treatment [Ersin et al., 2006]. In addition, [Mertz-Fairhurst et al., 1986, 1995, 1998], there was evidence that arrest of carious lesions can clinically be achieved by leaving infected dentine in the tooth preparation even without antibacterial treatment, if only properly sealed.

The objective of this study was to investigate the effectiveness of CHX antibacterial agent in reducing the microorganisms in carious dentine produced in vitro or in situ. The primary end point was infection of the dentine, quantitatively assessed by microbiological counts and qualitatively showed by AFM images, where *S. mutans* could be observed inside dentinal tubules in vitro. However, data showed no morphological differences for *S. mutans* chains among the tested groups and differences in its quantity were not expected since bacterial cells were present even after death. The laboratory examination of antibacterial substances by means of biofilm-based models (in which one can only imitate the intra-oral situation) is an important step in selecting the agent, which should be used in clinical studies. Similarly to this study, in many previous in vitro studies, CHX vehicles were shown to be effective. They inhibited the development of the biofilm with respect to its maturation as well as to the metabolism of the exposed bacteria [Shapiro et al., 2002; Pratten, et al., 1998; Millward and Wilson, 2001]. Although such in vitro attempts are a more practical and affordable method with which one can assess potentially active substances, they are in many respects insufficient in imitating the clinical situation. Important factors in the oral cavity such as, the turnover rate of saliva [Goodson, 1989] or the ability of antibacterial substances to adhere to the pellicle of the tooth in order to achieve their effects [Cummins and Creeth, 1992] cannot be reproduced in these experiments. In order to confirm in vitro data and better understand the metabolic process or the clinical effects of agents that take place within the dentine it is necessary to choose an examination method in which the caries lesion and biofilm are developed directly in the oral cavity and in which their three-dimensional structure is not manipulated with the examination.

In situ caries model, based on multispecies biofilm accumulation and sucrose exposure, used in this study was previously reported to be a cariogenic model of human dental enamel and dentine [Cury et al., 2000; Aires et al., 2005, 2008]. Most of the former in situ experiments have used a 20% sucrose solution 8 times/day [Ccahuana et al., 2007; Rodrigues et al., 2006; Sousa et al., 2009]. In this study a 40% sucrose solution 10 times/day was used since the demineralisation process seems to be more evident with carbohydrate consumption frequency equal to or higher than 6 times/day [Ccahuana et al., 2007]. This concentration was chosen based on the results from Aires et al. [2005], who demonstrated that this sucrose concentration is effective in producing extracellular polysaccharide on enamel slabs. Besides, this choice can be justified due to the necessity of obtaining a softened and drilled dentine in order to perform appropriate

dentine harvest and microbiological analyses. In addition, fluoride from the toothpaste used by volunteers during all intraoral periods could decrease the progression of dentine caries. The use of fluoride-containing dentifrice was included in this experimental model, since over 95% of all dentifrices sold in the U.S., Brazil and Western Europe contain fluoride [Cury et al., 2004; Mullen, 2005; Zero, 2006]. Accordingly, this in situ model may be considered a proper tool for testing the effect of CHX on microorganisms involved in the dentine caries process. Moreover, the results obtained in vitro for *S. mutans* suppression were confirmed since no statistically significant difference was found between log reductions for CHX in vitro and in situ.

According to our results, the first null hypothesis that stated there is no difference in the very short-term in vitro and in situ effect of 2% chlorhexidine-digluconate-based cavity cleanser on the disinfection of dentine contaminated with cariogenic bacteria was rejected. In addition, the second null hypothesis that stated there is no difference in the susceptibility of different species found in situ in dentinal lesions, against CHX was accepted.

In the present study, the determined efficacy of CHX with respect to dentine disinfection agrees with the data of numerous other studies [Brecx et al. 1990; Netuschil et al., 1995; Arweiler et al., 2001; Shapiro et al., 2002] whereby in these studies its effects were tested in biofilms either grown in a laboratory model or were obtained through scraping of the tooth surface, so that the study design is only conditionally comparable. No other in situ studies have evaluated the antibacterial effects of CHX-based cavity disinfectant on cariogenic bacteria in dentine. According to results, 2% digluconate chlorexidine may be an appropriate disinfecting agent to be used in dentinal caries, since caries is often a localised infection, so the substance may be applied to the lesion. This way, if bacteria within carious lesions could be eradicated by chlorhexidine in vivo, there would be beneficial consequences for dental health. Dentine tissue could be better preserved, thereby making patient treatment easier for the dentist and more comfortable for patients, by enabling lesions to be restored with minimal tissue removal, and improving the long-term prognosis for the repaired tooth [Wilson, 2004]. In addition, researches have recently shown that this substance, usually used as a cavity disinfectant, has an inhibitory effect on the endogenous collagenolytic activity in dentine [Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007]. Such collagenolytic activity is responsible for auto-degradation of dentine collagen fibrils and resin–dentine bond

failure over time [Hashimoto et al., 2003; Gürgan and Kiremitçi, 1999] therefore the structural integrity of hybrid layers, pre-treated with chlorhexidine before bonding, may be preserved for prolonged periods of time [Hebling et al., 2005; Carrilho et al., 2007]. Accordingly, the use of 2% chlorhexidine-digluconate-based cavity disinfectant, before the restorative procedure could delay the degradation of the tooth/restoration interface as well as make the tooth preparation less complex preserving infected dentine.

Log reduction means obtained by CHX treatment for all tested microorganisms were similar suggesting that this antimicrobial agent is so efficient against *S. mutans* as it is against lactobacilli and total viable microorganisms. These results for lactobacilli are in contrast to Ersin et al. [2006], who could not demonstrate a significant superior effect of chlorhexidine on lactobacillus. It should be emphasized that in our study microbiological analysis was performed 5 min after CHX application in contrast to the 6 months period used by the latter authors. In addition, our study utilized a two fold more concentrated CHX solution and Botelho [2000] supplied evidence that lactobacilli are not insensitive to chlorhexidine but inhibition follows a dose-response manner. Accordingly, one should assume that higher levels of the chlorhexidine digluconate directly applied onto tooth surfaces so that significantly reduced counts of lactobacilli in this investigation. Furthermore, the *in vivo* methodology performed by Ersin et al. [2006], against the *in situ* methodology used in the current study should be considered since some species of *Lactobacillus* are more sensitive to chlorhexidine, whereas some of them are less sensitive.

With regard to total viable microorganisms counts, the present results are in contrast to Wicht et al. [2004], who found that the total viable counts were not significantly affected after the application of chlorhexidine varnish as a cavity disinfectant onto the carious dentine. A possible explanation for this might be the different treatment procedures and materials. Furthermore, they suggested that using a larger sample, chlorhexidine would have a significant influence on total viable microorganisms counts.

Another concern is the accuracy of the sampling method. Kidd et al. [1993] emphasized that excellence in sampling performance was required to make valid comparisons between samples. For this reason, training was carried out followed by repeated weight measurements on the samples obtained.

The microbiological results of this study showed that CHX was effective in reducing the cultivable microbiota. Furthermore, although the use of chlorhexidine-digluconate-based cavity disinfectant not completely eliminated the viable microorganisms, it might serve as a suitable additional agent in reducing the residual microbiota. However, further clinical trials are necessary to determine its antibacterial and clinical effects in short and long terms.

### **Acknowledgments**

This project has received financial support (Grant # 477070/2008-6 Edital Universal) from CNPq. We thank the volunteers for their valuable participation. The authors thank João Paulo Saraiva Wenceslau, Diego Martins de Paula and Ruliglesio Rocha for their special assistance during experimental procedures. This paper was based on a thesis submitted by the first author to the Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing of the Federal University of Ceará, in partial fulfilment of the requirements for an MS degree in Dentistry.

## References

Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA: Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res* 2005;40: 28-32.

Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA: Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res* 2008; 42: 380-386.

Araújo AMPG, Naspitz GMCC, Chelotti A, Cai S: Effect of Cervitec® on mutans streptococci in plaque and caries formation on occlusal fissures of erupting permanent molars. *Caries Res* 2002;36:373-376.

Arweiler NB, Reich E, Brex M, Dörner M, Netuschil L: Influence of ethanol on the antibacterial and anti-plaque efficacy of an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse solution. *J Period d'Implantol Orale* 2001;20:331-340.

Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB: Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol* 2005;32:147-152.

Banerjee A, Kidd EA, Watson TF: In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation: *Caries Res* 2000; 34:144-150.

Banerjee A, Kidd EA, Watson TF: In vitro validation of carious dentin removed using different excavation criteria. *Am J Dent* 2003;16:228-230.

Benelli EM, Serra MC, Rodrigues Jr AL, Cury JA: In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res* 1993;27:280-284.

Bolliger CT, Zellweger JP, Danielsson T, van Biljon X, Robidou A, Westin A, Perrucoud AP, Säwe U: Smoking reduction with oral nicotine inhalers: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. *BMJ* 2000;321:329-333.

Boston DW, Graver HT: Histological study of an acid red caries-disclosing dye. *Oper Dent* 1989;14:186-192.

Botelho MG: The minimum inhibitory concentration of oral antibacterial agents against cariogenic organisms. *Microbios* 2000;103:31-41.

Brännström M: The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. *J Endodon* 1986;12:475-481.

Brex M, Netuschil L, Reichert B, Schreil G: Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. *J Clin Periodon* 1990;17:292-297.

Burns T, Wilson M, Pearson GJ: Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. *J Den Res* 1994;22:273-278.

Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D: In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529-533.

Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA: Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res* 2007;41:9-15.

Cummins D, Creeth JE: Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels and mouthwashes. *J Dent Res* 1992;71:1439-1449.

Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA: In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997;31:356-360.

Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP: Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000;34:491-497.



Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF: The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Br Dent J* 2004;15:167-174.

Dasanayake AP, Wiener HW, Li Y, Vermund SV, Caufield PW: Lack of effect of chlorhexidine varnish on *streptococcus mutans* transmission and caries in mothers and children. *Caries Res* 2002;36:288-293.

Duggal MS, Toumba KJ, Amaechi BT, Kowash MB, Higham SM: Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. *J Dent Res* 2001;80:1721-1724.

Emilson CG: Effect of chlorhexidine gel treatment on *streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. *Scand J Dent Res* 1981;89:239-246.

Ersin NK, Uzel A, Aykut A, Candan U: Inhibition of cultivable bacteria by chlorhexidine treatment of dentin lesions treated with the ART technique. *Caries Res* 2006;40:172-177.

Gilmour ASM, Edmunds DH, Newcombe RG: Prevalence and depth of artificial caries-like lesions adjacent to cavities prepared in roots and restored with a glass ionomer or a dentin-bonded composite material. *J Dent Res* 1997;16:1854-1861.

Gold OG, Jordan HV, Van Houte J: A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973;18:1357-1364.

Goodson JM. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J Dent Res* 1989;68:1625-1632.

Gürگان S, Bolay S, Kiremitçi A: Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *J Oral Rehabil* 1999;26:836-840.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H: In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 2003;24:3795-3805.

Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR: Chlorhexidine Arrests Subclinical Degradation of Dentin Hybrid Layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741-746.

Jones CG. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontol* 2000 1997;15:55-62.

Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D: Microbiological validation of assessment of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993;27:402-408.

Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D: Marginal ditching and staining as a predictor of secondary caries around amalgam restorations: A clinical and microbiological study. *J Dent Res* 1995;74:1206-1211.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LAB, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY: In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endodon* 1999;25:167-171.

Malik Z, Hanania J, Nitzan Y: Bactericidal effects of photoactivated porphyrins-an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990;5:281-293.

Marsh PD: Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263-271.

Mertz-Fairhurst EJ, Adair SM, Sams DR, Curtis Jr JW, Ergle JW, Hawkins KI, Mackert Jr JR, O'Dell NL, Richards EE, Rueggeberg F: Cariostatic and ultraconservative sealed restorations: nine-year results among children and adults. *ASDC J Dent Child* 1995;62:97-107.

Mertz-Fairhurst EJ, Curtis Jr JW, Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: Results at year 10. *J Am Dent Assoc* 1998;129:55-66.

Mertz-Fairhurst EJ, Schuster GS, Fairhurst CW: Arresting caries by sealants: results of a clinical study. *J Am Dent Assoc* 1986;112:194-197.

Millward TA, Wilson M: The effect of chlorhexidine on *streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios* 2001;58:155-164.

Mount GJ: A new paradigm for operative dentistry. *Aust Dent J* 2007;52:264-270.

Mullen J: History of water fluoridation. *Br Dent J* 2005; 8: 1-4.

Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M: Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 1995;103:355-361.

Ogushi K, Fusayama T: Electron microscope structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res* 1975;54:1019-1026.

Pantera EA, Schuster GS: Sterilization of extracted human teeth. *J Dent Educ* 1990;54:283-285.

Petti S, Hausen H: Caries-preventive effect of chlorhexidine gel applications among high-risk children. *Caries Res* 2006;40:514-521.

Pratten J, Barnett P, Wilson M: Composition and susceptibility to chlorhexidine of multi species biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3515-3519.

Rodrigues LK, Nobre-Dos-Santos M, Featherstone JD: In situ mineral loss inhibition by CO<sub>2</sub> laser and fluoride. *J Dent Res* 2006;85:617-621.

Rogosa M, Mitchell JA, Wiserman RF: A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactoballi. *J Dent Res* 1951;30:682-689.

Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B: An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 2002;36:93-100.

Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Melo MA, Beltrão HC, Rodrigues LK: In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent* 2009;37:44-51.

ten Cate JM: Remineralization of caries lesions extending into dentin. *J Dent Res* 2001;80:1407-1411.

van Strijp AJP, Gerardu VAM, Buijs MJ, van Loveren C, ten Cate JM: Chlorhexidine efficacy in preventing lesion formation in enamel and dentine: An in situ study. *Caries Res* 2008;42:460-465.

Wicht MJ, Haak R, Schütt-Gerowitt H, Kneist S, Noack MJ: Suppression of caries-related microorganisms in dentine lesions after short-term chlorhexidine or antibiotic treatment. *Caries Res* 2004;38:436-441.

Wilson M: Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infection. *Photoch Photobiol Sci* 2004;3:412-418.

Yip HK, Stevenson AG, Beeley JA: The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. *Br Dent J* 1994;176:417-421.

Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV: Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol* 2008;53:124-132.

Zero DT: Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health* 2006;6:1-13.

## Legends

Fig.1- Schematic diagram illustrating of the study design.

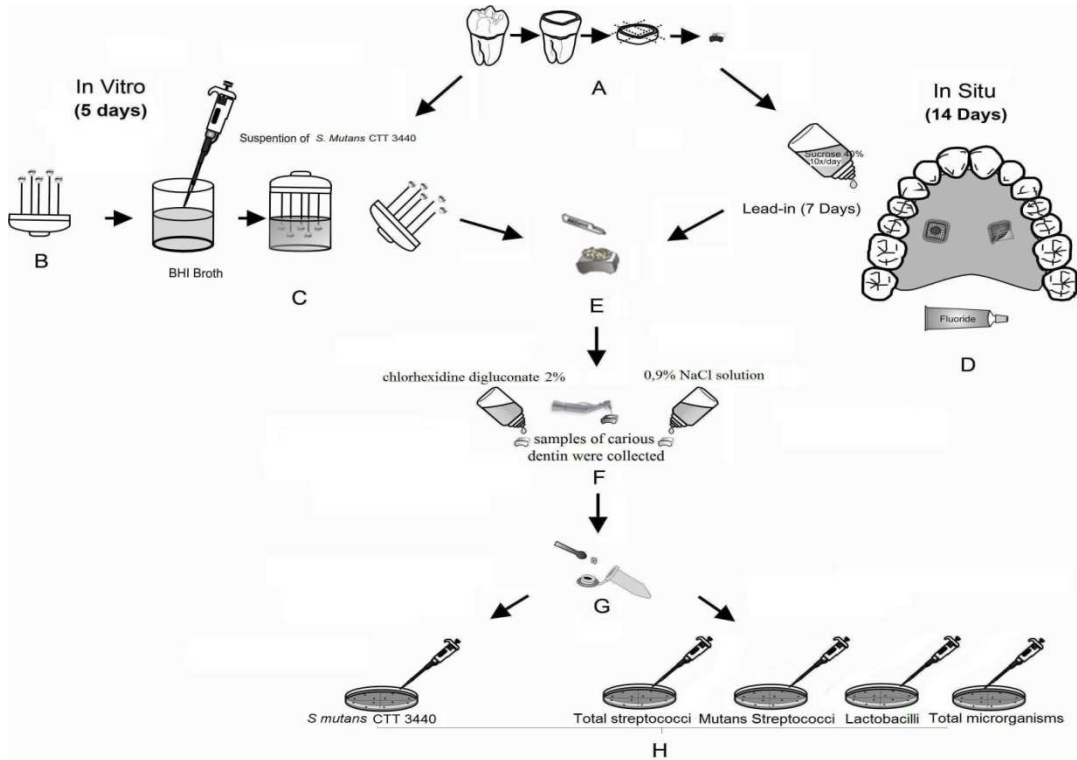


Figure 2. (a) AFM deflection mode images of large area scans of *S. mutans* in dentine slabs . (b) images of small area (scans size=15 nm) of *S. mutans* higher resolution scans.

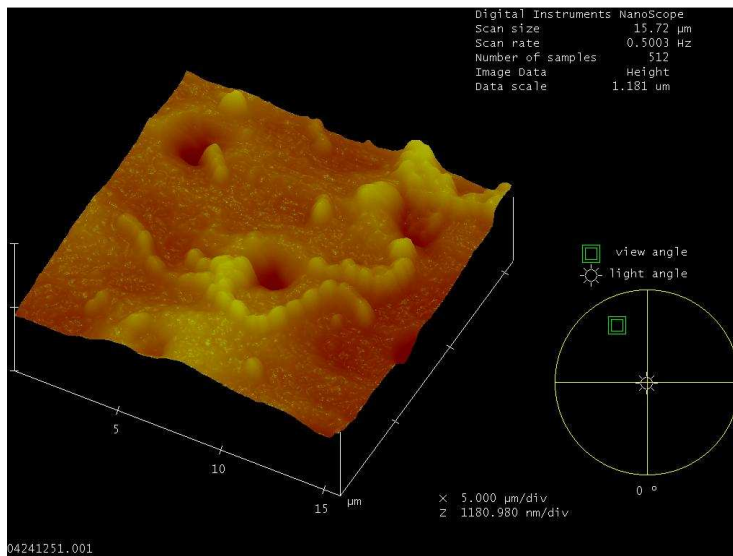


Fig. 2 (a) AFM – dentine slab infected by *S. mutans*

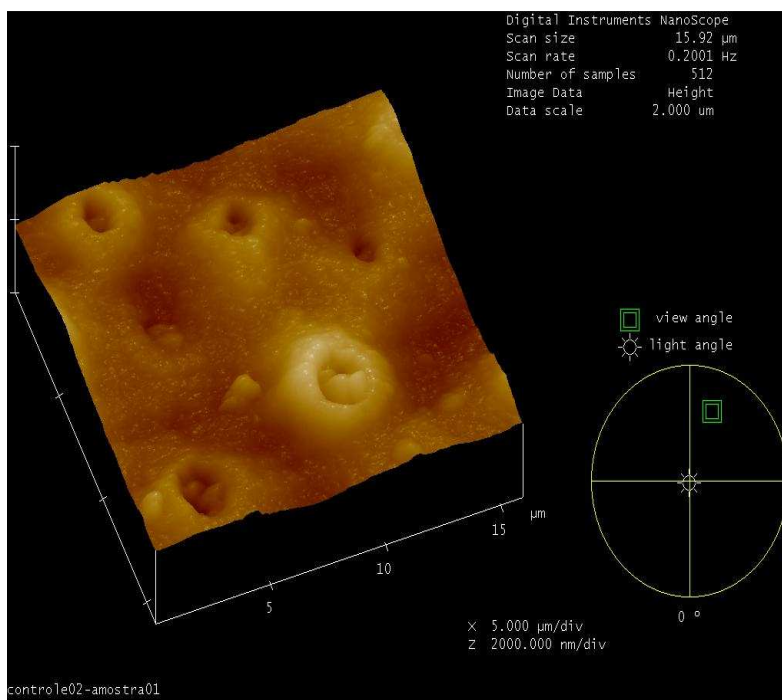


Fig. 2 (b) AFM *S. mutans* inside dentine tubules

Figure 3. Log reductions and standard deviation obtained according to the treatments for in vitro phase.

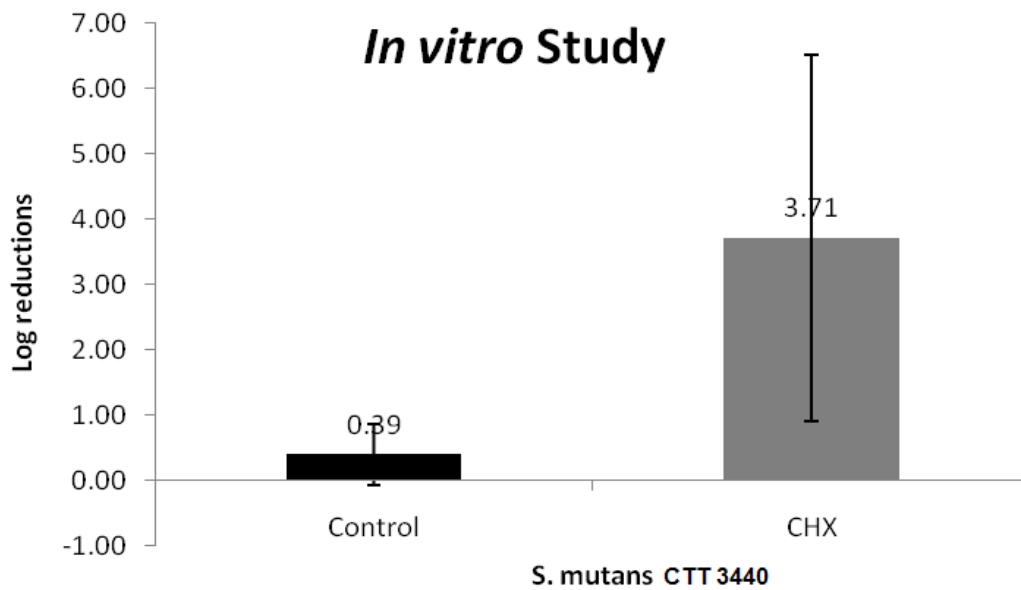
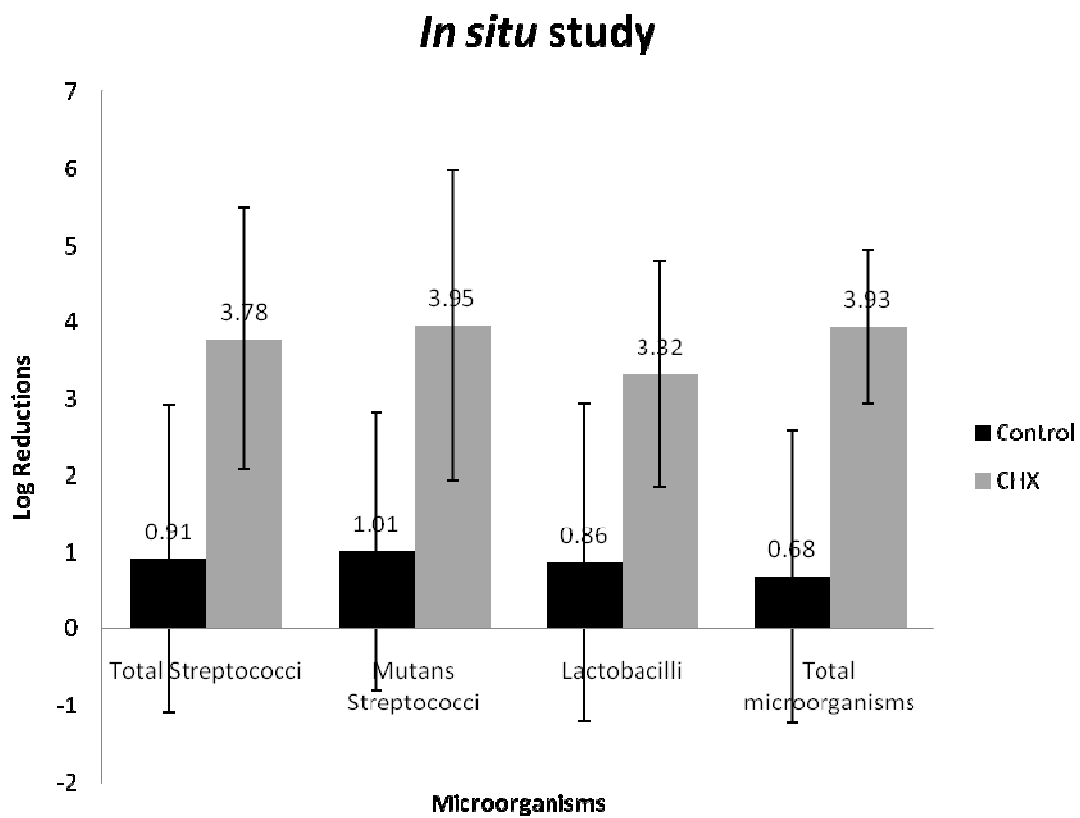


Figure 4. Log reductions and standard deviation obtained according to the treatments for in situ phase.



## 2 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados microbiológicos deste trabalho mostram que a CHX foi efetiva na redução da microbiota cultivada *in vitro* e *in situ* e que todos os microrganismos isolados, foram igualmente susceptíveis a este agente antimicrobiano. Embora a utilização do desinfetante cavitário à base de digluconato de clorexidina não tenha eliminado completamente os microrganismos viáveis, poderia servir como um agente adequado, adicional na redução da microbiota residual. No entanto, mais ensaios clínicos são necessários para determinar os seus efeitos clínicos e antibacterianos a curto e longo prazos.



**REFERÊNCIAS**

AIRES, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M.; KLEIN, M. L.; KOO, H.; DUARTE, S.; CURY, J. A. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Res.**, v. 42, p. 380-386, 2008.

AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. **Caries Res.**, v. 40, p. 28-32, 2005.

ARAUJO, A. M. P. G.; NASPITZ, G. M. C. C.; CHELOTTI, A.; CAI, S. Effect of Cervitec® on mutans streptococci in plaque and caries formation on occlusal fissures of erupting permanent molars. **Caries Res.**, v. 36, p. 373-376, 2002.

ARWEILER, N. B.; REICH, E.; BRECX, M.; DÖRNER, M.; NETUSCHIL, L. Influence of ethanol on the antibacterial and anti-plaque efficacy of an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse solution. **J. Period. d'Implantol. Orale**, v. 20, p. 331-340, 2001b.

AUSCHILL, T. M.; HEIN, N.; HELLWIG, E.; FOLLO, M.; SCULEAN, A.; ARWEILER, N. B. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. **J.Clin. Periodontol.**, v. 32, p. 147-152, 2005.

BANERJEE, A.; KIDD, E. A.; WATSON, T. F. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. **Caries Res.**, v. 34, p. 144-150, 2000.

BANERJEE, A.; KIDD, E. A.; WATSON, T. F. In vitro validation of carious dentin removed using different excavation criteria. **Am. J. Dent.**, v. 16, p. 228-230, 2003.

BENELLI, E. M.; SERRA, M. C.; RODRIGUES JR, A. L.; CURY, J. A. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res.**, v. 27, p. 280-284, 1993.

BOLLIGER, C. T.; ZELLWEGER, J. P.; DANIELSSON, T.; VAN BILJON, X.; ROBIDOU, A.; WESTIN, A.; PERRUCOUD, A. P.; SÄWE, U. Smoking reduction with oral nicotine inhalers: double blind, randomized clinical trial on efficacy and safety. **BMJ**, v. 321, p. 329-333, 2000.

BOSTON, D. W.; GRAVER, H. T. Histological study of an acid red caries-disclosing dye. **Oper. Dent.**, v. 14, p. 186-192, 1989.

BOSTON, D. W.; LIAO, J. Staining of non-carious human coronal dentin by caries dyes. **Oper. Dent.**, v. 29, p. 280-286, 2004.

BOTELHO, M. G. The minimum inhibitory concentration of oral antibacterial agents against cariogenic organisms. **Microbios**, v. 103, p. 31-41, 2000.

BOURD-BOITTIN, K.; FRIDMAN, R.; FANCHON, S.; SEPTIER, D.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. **Exp. Cell Res.**, v. 304, p. 493-505, 2005.

BRÄNNSTRÖM, M. The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. **J. Endodon.**, v. 12, p. 475-481, 1986.

BREX, M.; NETUSCHIL, L.; REICHERT, B.; SCHREIL, G. Efficacy of Listerine, Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis and plaque bacteria vitality. **J. Clin. Periodon.**, v. 17, p. 292-297, 1990.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. **J. Dent.**, v. 22, n. 5, p. 273-278, Oct. 1994.

BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v. 29, n. 3, p. 192-197, 1995.

CARRILHO, M. R. O.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJÄDERHANE, A. F.; REIS, J. *et al.* In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J. Dent. Res.**, v. 86, p. 529-533, 2007.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; TABCHOURY, C. P.; TENUTA, L. M.; DEL BEL CURY, A. A.; VALE, G. C.; CURY, J. A. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. **Caries Res.**, v. 41, p. 9-15, 2007.

CUMMINS, D.; CREETH, J. E. Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels and mouthwashes. **J. Dent. Res.**, v. 71, p. 1439-1449, 1992.

CURY, J. A.; REBELLO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.**, v. 31, p. 356-360, 1997.

CURY, J. A.; REBELLO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T.; TABCHOURY, C. P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, v. 34, p. 491-497, 2000.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M.; RIBEIRO, C. C.; PAES LEME, A. F. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. **Braz. Dent. J.**, v. 15, p. 167-174, 2004.

DASANAYAKE, A. P.; WIENER, H. W.; LI, Y.; VERMUND, S. V.; CAUFIELD, P. W. Lack of effect of chlorhexidine varnish on streptococcus mutans transmission and caries in mothers and children. **Caries Res.**, v. 36, p. 288-293, 2002.

DE CASTRO, F. L.; DE ANDRADE, M. F.; DUARTE JR, S. L.; VAZ, L. G.; AHID, F. J. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. **J. Adhes. Dent.**, v. 5, p. 129-138, 2003.

DUGGAL, M. S.; TOUMBA, K. J.; AMAECHI, B. T.; KOWASH, M. B.; HIGHAM, S. M. Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. **J. Dent. Res.**, v. 80, p. 1721-1724, 2001.

EMILSON, C. G. Effect of chlorhexidine gel treatment on streptococcus mutans population in human saliva and dental plaque. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 89, p. 239-246, 1981.

ERSIN, N. K.; UZEL, A.; AYKUT, A.; CANDAN, U. Inhibition of Cultivable Bacteria by Chlorhexidine Treatment of Dentin Lesions Treated with the ART Technique. **Caries Res.**, v. 40, p. 172-177, 2006.

FUKAE, M.; KANECO, I.; TANABE, T.; SHIMUZU, M. Metalloproteinases in the mineralized compartments of porcine dentine as detected by substrate-gel electrophoresis. **Arch. Oral Biol.**, v. 36, p. 567-573, 1991.

GEDRON, R.; GRENIER, D.; SORSA, T.; MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8 and 9 by chlorhexidine. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, p. 437-439, 1999.

GILMOUR, A. S. M.; EDMUNDS, D. H.; NEWCOMBE, R. G. Prevalence and depth of artificial caries-like lesions adjacent to cavities prepared in roots and restored with a glass ionomer or a dentin-bonded composite material. **J. Dent. Res.**, v. 16, p. 1854-1861, 1997.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for Streptococcus mutans. **Arch. Oral Biol.**, v. 18, p. 1357-1364, 1973.

GOODSON, J. M. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **J. Dent. Res.**, v. 68, p. 1625-1632, 1989.

GÜRGAN, S.; BOLAY, S.; KIREMITÇI, A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. **J. Oral Rehabil.**, v. 26, p. 836-840, 1999.

HASHIMOTO, M.; OHNO, H.; SANO, H.; KAGA, M.; OGUCHI, H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. **Biomaterials**, v. 24, p. 3795-3805, 2003.

HEBLING, J.; PASHLEY, D. H.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F. R. Chlorhexidine Arrests Subclinical Degradation of Dentin Hybrid Layers *in vivo*. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 8, p. 741-746, 2005.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol.** 2000, v. 15, p. 55-62, 1997.

KIDD, E. A.; JOYSTON-BECHAL, S.; BEIGHTON, D. Microbiological validation of assessment of caries activity during cavity preparation. **Caries Res.**, v. 27, p. 402-408, 1993.

KIDD, E. A.; JOYSTON-BECHAL, S.; BEIGHTON, D. Marginal ditching and staining as a predictor of secondary caries around amalgam restorations: A clinical and microbiological study. **J. Dent. Res.**, v.74, p. 1206-1211, 1995.

KIDD, E. A.; JOYSTON-BECHAL, S. **Essentials of dental caries: The disease and its management.** 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

LEONARDO, M. R.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA, L. A. B.; NELSON FILHO, P.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. **J. Endodon.**, v. 25, n. 3, p. 167-171, Mar. 1999.

MALIK, Z.; HANANIA, J.; NITZAN, Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins-an alternative approach to antimicrobial drugs. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 5, p. 281-293, 1990.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, v. 8, p. 263-271, 1994.

MERTZ-FAIRHURST, E. J.; ADAIR, S. M.; SAMS, D. R.; CURTIS, J. W.; ERGLE, J. W.; HAWKINS, K. I. *et al.* Cariostatic and ultraconservative sealed restorations: nine-year results among children and adults. **ASDC Dent. Child**, v. 6, n. 2, p. 97-107, 1995.

MERTZ-FAIRHURST, E. J.; CURTIS, J. W.; ERGLE, J. W.; RUEGGERBERG, F. A.; ADAIR, S. M. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: Results at year 10. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 129, p. 55-66, 1998.

MERTZ-FAIRHURST, E. J.; SCHUSTER, G. S.; FAIRHURST, C. W. Arresting caries by sealants: results of a clinical study. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 112, p. 194-197, 1986.

MILLWARD, T. A.; WILSON, M. The effect of chlorhexidine on streptococcus sanguis biofilms. **Microbios**, v. 58, p. 155-164, 2001.

MOUNT, G. J. A new paradigm for operative dentistry. **Aust. Dental J.**, v. 52, n. 4, p. 264-270, Dec. 2007.

MULLEN, J. History of water fluoridation. **Br. Dent. J.**, v. 199, n. 7, suppl., p. 1-4, Oct. 2005.

NETUSCHIL, L.; WEIGER, R.; PREISLER, R.; BRECX, M. Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 103, p. 355-361, 1995.

OGUSHI, K.; FUSAYAMA, T. Electron microscope structure of the two layers of carious dentin. **J. Dent. Res.**, v. 54, p. 1019-1026, 1975.

PANTERA, E. A.; SCHUSTER, G. S. Sterilization of extracted human teeth. **J. Dent. Educ.**, v. 54, p. 283-285, 1990.

PASHLEY, D. H.; TAY, F. R.; YUI, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R. M.; ITO, S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J. Dent. Res.**, v. 83, p. 216-221, 2004.

PETTI, S.; HAUSEN, H. Caries-preventive effect of chlorhexidine gel applications among high-risk children. **Caries Res.**, v. 40, p. 514-521, 2006.

PRATTEN, J.; BARNETT, P.; WILSON, M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multi species biofilms of oral bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 3515-3519, 1998.

RODRIGUES, L. K.; NOBRE-DOS-SANTOS, M.; FEATHERSTONE, J. D. In situ mineral loss inhibition by CO<sub>2</sub> laser and fluoride. **J. Dent. Res.**, v. 85, p. 617-621, 2006.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISERMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral *lactobacilli*. **J. Dent. Res.**, v. 30, p. 682-689, 1951.

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

SOUSA, R. P.; ZANIN, I. C.; LIMA, J. P.; MELO, M. A.; BELTRÃO, H. C.; RODRIGUES, L. K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **J. Dent.**, v. 37, p. 44-51, 2009.

TEN CATE, J. M. Remineralization of caries lesions extending into dentin. **J. Dent. Res.**, v. 80, p. 1407-1411, 2001.

TJÄDERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J. Dent. Res.**, v. 77, p. 1622-1629, 1998.

VAN STRIJP, A. J. P.; GERARDU, V. A. M.; BUIJS, M. J.; VAN LOVEREN, C.; TEN CATE, J. M. Chlorhexidine efficacy in preventing lesion formation in enamel and dentine: An in situ study. **Caries Res.**, v. 42, p. 460-465, 2008.

WICHT, M. J.; HAAK, R.; SCHÜTT-GEROWITT, H.; KNEIST, S.; NOACK, M. J. Suppression of caries-related microorganisms in dentine lesions after short-term chlorhexidine or antibiotic treatment. **Caries Res.**, v. 38, p. 436-441, 2004.

WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infection. **Photoch. Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 412-418, 2004.

YIP, H. K.; STEVENSON, A. G.; BEELEY, J. A. The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. **Br. Dent. J.**, v. 176, p. 417-421, 1994.

ZAVGORODNIY, A. V.; ROHANIZADEH, R.; SWAIN, M. V. Ultrastructure of dentine carious lesions. **Arch. Oral Biol.**, v. 53, p. 124-132, 2008.

ZERO, D. T. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. **BMC Oral Health**, v. 6, p. 1-13, 2006.

## APÊNDICE A

### INFORMAÇÕES E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA – PARA OS VOLUNTÁRIOS QUE DOARÃO OS DENTES

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Fátima Maria Cavalcante Borges (aluna do curso de Mestrado em Clínica Odontológica - UFC) e Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues (Orientadora), onde você autoriza, por escrito, sua doação de dentes terceiros molares, extraídos por necessidades clínicas, após conhecer os procedimentos que serão realizados tendo liberdade para decidir sem qualquer coação.

Título do trabalho: “Eficácia antimicrobiana do digluconato de clorexidina sobre dentina humana infectada por bactérias cariogênicas: estudos *in vitro* e *in situ*”

Objetivos: Este estudo vai avaliar se a terapia antimicrobiana com digluconato de clorexidina a 2% é capaz de eliminar bactérias presentes na dentina humana submetida ao desafio cariogênico pelo modelo microbiológico.

Justificativa: Muito tem se pesquisado sobre o uso de soluções antimicrobianas na limpeza da cavidade após seu preparo, e sua capacidade de eliminar bactérias *in vivo*, diminuindo a quantidade de tecido dentário a ser removido durante o preparo cavitário. Dentre as substâncias pesquisadas, o digluconato de clorexidina a 2%, apresenta-se como um agente antimicrobiano promissor, por sua capacidade de reduzir, de forma significativa, os níveis bucais de microorganismos, demonstrando que a terapia antimicrobiana é capaz de eliminar bactérias crescidas em laboratório como também no meio bucal. No presente estudo, queremos observar se o mesmo ocorre com as bactérias presentes em amostras de dentina humana contaminadas *in vitro* com a bactéria *streptococcus mutans* cultivada em laboratório.

Procedimento experimental: Para a realização desse estudo, serão selecionados terceiros molares não erupcionados (“o dente do ciso”) que não contenham fraturas ou rachaduras. Os dentes serão cortados em blocos de dentina, medindo 5x5x2 mm com uma cortadeira elétrica, serão lixados e polidos. Após o polimento final, os blocos serão lavados em água corrente esterilizados e mantidos em ambiente úmido até serem inseridos nos dispositivos intra-orais palatinos.

Desconforto ou riscos e benefícios esperados, vinculados à pesquisa: Os voluntários doadores dos dentes não sofrerão nenhum risco porque serão utilizados somente os extraídos segundo razões clínicas indicadas pelo cirurgião dentista do próprio voluntário.

Forma de acompanhamento e assistência: A assistência necessária será dada pelo dentista responsável pela extração dos dentes, não estando vinculada aos pesquisadores.

Métodos alternativos existentes: Os pesquisadores preferiram, nessa pesquisa, utilizar dentes humanos ao invés de dentes bovinos, para simular uma condição, mais próxima daquela existente na cavidade bucal.

Garantia de esclarecimento: O voluntário tem garantia de que receberá resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Além disso, os pesquisadores proporcionarão informação atualizada sobre essa pesquisa. O voluntário tem, também, liberdade para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento. Qualquer dúvida, favor comunicar o mais rápido possível. Tel: 3366-8232 (Mestrado Odontologia) ou 9981-6325 (Fátima Borges).

Retirada do consentimento: O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo de ordem pessoal-profissional com os responsáveis pela pesquisa.

Garantia de sigilo: Os pesquisadores asseguram a privacidade dos voluntários quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Formas de ressarcimento e indenização: Como os pesquisadores não participarão dos procedimentos de decisão e extração dos dentes, não haverá formas de ressarcimento e/ou indenização.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida, quanto aos seus direitos, escreva ou ligue para o Comitê de Ética em pesquisa da UFC. Tel: 3366-83-46

Eu, \_\_\_\_\_, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela aluna Fátima Maria Cavalcante Borges e Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a utilização dos meus dentes, que foram extraídos por razões alheias à vontade dos pesquisadores na pesquisa acima mencionada.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

Nome (por extenso): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



## APÊNDICE B

### INFORMAÇÕES E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA – PARA OS VOLUNTÁRIOS QUE UTILIZARÃO OS DISPOSITIVOS INTRA-ORAIS PALATINOS

Nome do

Voluntário: \_\_\_\_\_

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Fátima Maria Cavalcante Borges (aluna do curso de Mestrado em Clínica Odontológica - UFC) e Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues (Orientadora), onde você autoriza, por escrito, sua participação como voluntário, dessa pesquisa, após conhecer os procedimentos que serão realizados e tendo liberdade para decidir sem qualquer coação.

**Título do trabalho:** “Eficácia antimicrobiana do digluconato de clorexidina sobre dentina humana infectada por bactérias cariogênicas: estudos *in vitro* e *in situ*”

**Objetivos:** Avaliar o efeito do digluconato de clorexidina a 2% na redução de microrganismos presentes na dentina humana, submetida ao desafio cariogênico *in situ*.

**Justificativa:** Muito tem-se pesquisado sobre o uso de soluções antimicrobianas na limpeza da cavidade após seu preparo, e sua capacidade de eliminar bactérias *in vivo*, diminuindo a quantidade de tecido dentário a ser removido durante o preparo cavitário. Dentre as substâncias pesquisadas, o digluconato de clorexidina a 2%, tem-se apresentado como um agente antimicrobiano promissor, por sua capacidade de reduzir, de forma significativa, os níveis bucais de microrganismos. A maioria dos estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano da clorexidina, revela que essa substância adicionalmente, inibe de forma inespecífica a ação de metalo-proteinases, enzimas presentes na saliva e na matriz extracelular de células humanas, o que se comprovado adicionalmente retardaria a degradação das interfaces dente/restauração impedindo a microinfiltração, prolongando o tempo de vida útil das restaurações. Assim o emprego do digluconato de clorexidina a 2%, previamente ao procedimento restaurador, além de proporcionar mais segurança na eliminação de microrganismos remanescentes do preparo cavitário, proporcionaria também maior durabilidade às restaurações adesivas. O que representa um importante passo na Odontologia Restauradora.

**Procedimento experimental:** O período total do estudo *in situ* compreenderá uma etapa de quatorze dias durante a qual 20 (vinte) voluntários utilizarão dispositivos intra-orais palatinos, contendo dois blocos de dentina humana. Durante esse período, os voluntários deverão ingerir água fluoretada do município de Fortaleza e gotejar solução de sacarose a 40% sobre os blocos dentais dez vezes ao dia.

Desconforto ou riscos esperados vinculados à pesquisa: Os voluntários poderão apresentar um pouco de mau hálito durante o período experimental, o que poderá ser controlado com a adequada higiene bucal e a limpeza do dispositivo. O uso da sacarose será apenas como gotas sobre os blocos de dentina presentes nos dispositivos intra-orais, não implicando em qualquer aumento de cárie dental nos voluntários. O dispositivo intra-oral pode causar um leve desconforto que assemelha-se ao causado por um aparelho ortodôntico móvel.

Forma de acompanhamento e assistência: Haverá aconselhamento quanto à melhoria da higiene bucal durante o período experimental. Os pesquisadores, envolvidos na pesquisa, estarão à disposição dos voluntários para qualquer ajuste no dispositivo intra-oral, a fim de minimizar possíveis desconfortos.

Métodos alternativos existentes: Embora existam outros métodos de produção de lesão de cárie, os autores optaram pela utilização do dispositivo intra-oral, a fim de promover a formação de dentina desmineralizada amolecida, de fácil remoção contaminada por microrganismos de forma semelhante ao mecanismo de formação de cárie *in vivo*.

Garantia de esclarecimento: O voluntário tem garantia de que receberá resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Além disso, os pesquisadores proporcionarão informação atualizada sobre a pesquisa. O voluntário terá, também, liberdade para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento. Qualquer dúvida, favor comunicar o mais rápido possível. Tel: 3366 8232 (Mestrado Odontologia) ou 9981 6325 (Fátima Borges).

Retirada do Consentimento: O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo de ordem pessoal-profissional com os responsáveis pela pesquisa.

Garantia de sigilo: Os pesquisadores asseguram a privacidade dos voluntários quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Formas de ressarcimento: Como a remoção dos blocos dentais deve ser feita em jejum, no dia do recolhimento dos dispositivos intra-orais, será oferecido um café da manhã aos voluntários. Além disso, os voluntários serão ressarcidos de eventuais despesas com o transporte nos dias que tiverem de comparecer ao laboratório.

Formas de indenização: Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

**ATENÇÃO:** A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, o voluntário deve escrever ou ligar para o Comitê de Ética em pesquisa da UFC. Tel: 3366-8346.

Eu, \_\_\_\_\_, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela aluna Fátima Maria Cavalcante Borges e Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, autorizo a execução do trabalho de pesquisa exposto em mim.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

Nome (por extenso): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C

### INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Cada voluntário receberá:

- 2 tubos de dentifício Sorriso- Colgate;
- 1 escova dental;
- 7 frascos conta-gotas com solução de sacarose a 40%;
- Isopor 500mg a fim de manter em congelador os frascos com solução de sacarose;
- Estojo de aparelho ortodôntico (acomodação do dispositivo);
- 1 pacote de gaze estéril.

Os voluntários deverão seguir as seguintes instruções:

1. Este estudo consiste de uma etapa de 14 dias.
2. A água ingerida durante este período deverá ser necessariamente de abastecimento público de Fortaleza.
3. Durante o período do experimento, não utilizar nenhum produto com suplemento de flúor, exceto a água e o dentifício.
4. Os dispositivos intra-orais deverão ser utilizados durante todo o dia (inclusive para dormir), exceto durante as refeições e higiene oral. Durante esses períodos, deverão ser colocados na caixa plástica, fornecida pelos pesquisadores, que contém em seu interior um algodão ou gaze umedecida.
5. A escovação habitual deverá ser feita apenas com o dentifício fornecido. Os dispositivos deverão ser higienizados e escovados somente na parte interna do aparelho.
6. Será fornecida aos participantes soluções de sacarose 40% em frasco conta-gota. O voluntário deverá colocar uma gota dessa solução sobre cada bloco de dentina, sendo esse contido no dispositivo intra-oral, esperar cinco minutos e recolocá-lo na boca. Esse procedimento deverá ser feito dez vezes ao dia.

Caso haja necessidade de ingestão de antibióticos, comunicar imediatamente ao pesquisador.

## ANEXO A – Seguimento do Regimento Interno

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

§2º - No caso de não cumprimento do prazo estipulado no §1º, o orientador deverá encaminhar, antes de seu vencimento e ouvido o aluno, solicitação de ampliação do prazo, mediante justificativa e descrição da etapa de desenvolvimento do projeto.

§3º - O aluno que não obtiver aprovação no Exame Geral de Conhecimentos, terá direito à nova oportunidade, desde que respeitados os artigos 4 e 5 das Normas para os Cursos de Pós-Graduação da UFC.

§4º - O aluno só poderá defender a Dissertação após aprovação no Exame Geral de Conhecimentos de que trata este artigo.

**Artigo 46** – As dissertações apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação em formato tradicional ou as sessões gerais do formato alternativo deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no site <http://www.biblioteca.ufc.br/servicos.html#apoio>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o *MANUAL DE NORMALIZAÇÃO PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO E TESE DE DOUTORADO NO FORMATO ALTERNATIVO do PPGO*.

**Artigo 47** – Para cada aluno deverá ser constituída uma banca examinadora, que será formada por 03 (três) professores ou especialistas, com o título de Doutor, como membros efetivos e dois suplentes.

§1º - Os membros da banca examinadora de que trata o *caput* deste artigo constituirão a Comissão Julgadora, cuja presidência caberá ao orientador da Dissertação.

§2º - Dentre os membros efetivos da banca examinadora, 01 (um) deverá ser professor ou especialista de outra Instituição, com título de Doutor, sugerido pelo orientador e homologado pela Coordenação do Programa.

§3º - Dentre os membros suplentes da banca examinadora, 01 (um) deverá ser professor ou especialista de outra Instituição, com título de Doutor, sugerido pelo orientador e homologado pela Coordenação do Programa.

§4º - Quando na orientação da dissertação houver a participação de co-orientador, este não poderá participar da banca examinadora.

**ANEXO B – Protocolo de Aprovação no COMEPE**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 625/08

Fortaleza, 26 de setembro de 2008

**Protocolo COMEPE nº 185/08**

**Pesquisador responsável:** Fátima Maria Cavalcante Borges

**Deptº./Serviço:** Departamento de Odontologia/ UFC

**Título do Projeto:** "Avaliação do efeito do digluconato de clorexidina a 2% na desinfecção de dentina cariada e na resistência de união de um sistema adesivo autocondicionante à dentina hígida e cariada"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de setembro de 2008.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dra. Mirian Parente Monteiro  
Coordenadora Adjunta do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/UFC