

LARISSA TAVARES SAMPAIO SILVA

**Desenvolvimento de partículas de fosfato dicálcico dihidratado carregadas
com clorexidina**

São Paulo

2022

LARISSA TAVARES SAMPAIO SILVA

**Desenvolvimento de partículas de fosfato dicálcico dihidratado carregadas
com clorexidina**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biomateriais.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Guimarães Roscoe

São Paulo

2022

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Silva, Larissa Tavares Sampaio.

Desenvolvimento de partículas de fosfato dicálcico dihidratado carregadas com clorexidina / Larissa Tavares Sampaio Silva; orientadora Marina Guimarães Roscoe -- São Paulo, 2022.

77 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biomateriais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Fosfato de Cálcio. 2. Clorexidina. 3. Materiais dentários. 4. Agentes antimicrobianos. 5. Remineralização dentária. I. Roscoe, Marina Guimarães. II. Título.

Silva LTS. Desenvolvimento de partículas de fosfato dicálcico dihidratado carregadas com clorexidina. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 12 / 01 / 2023

Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Letícia Cristina Cidreira Boaro

Instituição: Universidade Santo Amaro Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Marcela Charantola Rodrigues

Instituição: Universidade Municipal de São Caetano do Sul Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho à Deus, Virgem Maria e minha família como um gesto de agradecimento por serem meu acalento e refúgio em dias difíceis e por caminharem comigo em cada passo desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço com todo meu coração à minha família que é o meu alicerce, especialmente à minha mãe, Sra. Socorro Tavares Sampaio, por ser o maior exemplo de honestidade e coragem que eu possa ter. Falar dela é discorrer sobre amor, fé e força; e falar com ela é como escutar a voz de Deus, porque parece que ela sempre sabe o que dizer e no momento certo. É um orgulho chamar de mãe essa mulher com caráter irretocável, que é o meu primeiro amor e a pessoa que eu mais admiro na vida.

À minha madrinha, Sra. Cícera Tavares Sampaio, minha mãe do coração que acompanha meu crescimento e vibra com minhas vitórias como se fosse sua filha. Sou feliz por encontrar nela um colo que acalenta tanto quanto o da minha mãe.

Ao meu noivo e grande incentivador Lucas Romenique, que partilhou comigo os cuidados com a Mel, os problemas e as inúmeras alegrias da maneira mais amável, gentil, compreensiva e respeitosa que existe.

E ao meu avô, Joaquim Sampaio Tavares, um homem forte que nas marcas das mãos traduz a vida de um nordestino que lutou muito para educar suas filhas. Eu agradeço por tanto me ensinar sobre a vida, principalmente durante esses anos de mestrado, onde foi diagnosticado com Linfoma de Hodgkin e me mostrou que os ventos fortes servem apenas para mostrar como nossa base é inabalável.

Agradeço também àqueles que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho, Rafael Trinca, Handially dos Santos Vilela e Marcela Charantola Rodrigues.

À Profa. Dra. Letícia C. C. Boaro, que numa rara demonstração de generosidade me cedeu ajuda com o desenvolvimento deste projeto. Obrigada por me direcionar nos primeiros passos da iniciação científica e permitir que nossa relação aluna-professora se estreitasse para uma amizade e por representar em minha vida um real exemplo de profissional competente que sabe encorajar seus alunos e pacientes e fazer do laboratório, sala de aula ou do consultório um ambiente muito mais agradável com sua alegria. Você é especial!

Ao Prof. Dr. Roberto R. Braga, agradeço por ser o primeiro a me acolher nesta universidade e contribuir com meu desenvolvimento acadêmico antes mesmo do processo de seleção para o mestrado e por ter me apresentado à Profa. Marina.

Obrigado por prontamente corrigir as várias versões do projeto de pesquisa, sanar minhas dúvidas e contribuir de forma tão significativa com este trabalho.

À Profa. Dra. Marina G. Roscoe, minha orientadora, que comigo “abraçou” o grande desafio que foi realizar esta pesquisa à distância. Agradeço por todo esforço em corrigir cuidadosamente cada tópico aqui apresentado, pela paciência, compreensão e acima de tudo por todo conhecimento que adquiri contigo ao longo destes anos, por sempre apontar a melhor estratégia para que pudéssemos contribuir para o avanço da ciência da maneira mais ética e responsável. Obrigado por tudo!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

E, finalmente, ao departamento de Biomateriais e Biologia Oral bem como a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e todas as pessoas que compõem brilhantemente a equipe de funcionários, sempre dispostos a tornar nossa experiência com a pós-graduação a melhor possível.

*“Deus não nos dá um fardo maior do que aquele que possamos
carregar”*

(1 Coríntios 10:13)

RESUMO

Silva LTS. Desenvolvimento de partículas de fosfato dicálcico dihidratado carregadas com clorexidina [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Os objetivos do presente estudo foram sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* de partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) carregadas com diacetato de clorexidina (CHX). Para isso, foram sintetizados três grupos de partículas: DCPD: Partículas de DCPD sem a adição de CHX, DCPD/CHX-1: Partículas de DCPD carregadas com 1% de CHX, e DCPD/CHX-5: Partículas de DCPD carregadas com 5% de CHX. Na primeira etapa, as partículas sintetizadas foram caracterizadas para confirmar a composição da fase de fosfato de cálcio formada, o teor de clorexidina incorporado à partícula, bem como a morfologia e as dimensões. Para isso, foram realizadas análises por espectrofotometria UV/Visível (UV/Vis), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise elementar, espalhamento de luz laser, e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na segunda etapa, as partículas foram avaliadas quanto à atividade antibacteriana, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Dunnett, com nível de significância de 5%. A presença da CHX nas partículas DCPD/CHX foi confirmada quimicamente pelo método de FTIR e pela análise elementar e quantificada por espectrofotometria UV/Vis. A análise elementar demonstrou presença de maior teor de carbono (5,48 %) para o DCPD/CHX-1, seguido pelo grupo DCPD/CHX-5 (3,50%). O DCPD sem CHX não apresentou porcentagem significativa de carbono. Com a espectrofotometria UV/Vis, foi possível quantificar apenas o grupo DCPD/CHX-1, o qual apresenta 0,12 g de CHX a cada 1 g de DCPD. Através do espalhamento de luz laser (D_{50}) foram detectadas partículas com 11 μm de diâmetro em DCPD, 14 μm em DCPD/CHX-1 e 12 μm em DCPD/CHX-5. Nesta análise também foram mensuradas as áreas superficiais: 0,73 , 0,57 e 0,63 m^2/g , respectivamente. A análise em MEV revelou a presença de partículas menores com formato arredondado (clorexidina) adsorvidas sobre a superfície da placa (DCPD) em DCPD/CHX-1. Apenas as partículas DCPD/CHX-1 apresentaram efetiva atividade

antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, mesmo em baixas concentrações (CIM: 0,0038 mg/mL). Com base no êxito obtido na síntese de partículas DPCD/CHX, foi possível concluir que apenas as partículas de DCPD carregadas com 1% de CHX exibiram efetiva atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* e, portanto, apresentam potencial para serem incorporadas à materiais odontológicos e fornecer concomitante atividade antibacteriana e propriedade remineralizante.

Palavras-chave: Fosfato de Cálcio. Clorexidina. Materiais dentários. Agentes antimicrobianos. Remineralização.

ABSTRACT

Silva LTS. Development of chlorhexidine-loaded calcium phosphate dihydrate particles [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

This study aimed to synthesize, characterize, and evaluate the antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of calcium phosphate dihydrate particles (DCPD) loaded with chlorhexidine diacetate (CHX). Three groups of particles were synthesized: DCPD: DCPD particles without the addition of CHX, DCPD/CHX-1: DCPD particles loaded with 1% CHX, and DCPD/CHX-5: DCPD particles loaded with 5% CHX. The synthesized particles were characterized to confirm the calcium phosphate phase, the chlorhexidine content incorporated, as well as the morphology and dimensions. Therefore, analyzes were carried out by UV/Visible spectrophotometry (UV/Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), elemental analysis, laser light scattering, and scanning electron microscopy (SEM). After characterization, the antibacterial activity was evaluated, by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test, with a significance level of 5%. The presence of CHX in the DCPD/CHX particles was chemically confirmed by the FTIR method and by elemental analysis and quantified by UV/Vis spectrophotometry. The elemental analysis showed the presence of a higher carbon content (5.48%) for the DCPD/CHX-1, followed by the DCPD/CHX-5 group (3.50%). The DCPD with no incorporation of CHX did not show a significant percentage of carbon. With UV/Vis spectrophotometry, it was possible to quantify only the DCPD/CHX-1 group, which presents 0.12 g of CHX for 1 g of DCPD. Through laser light scattering (D_{50}), particle sizes were detected: 11 μm diameter in DCPD, 14 μm in DCPD/CHX-1, and 12 μm in DCPD/CHX-5. In this analysis, the surface area was also measured: 0.73, 0.57, and 0.63 m^2/g , respectively. The SEM analysis revealed the presence of smaller particles with spherical shape (chlorhexidine) adsorbed on the surface of the plates (DCPD) in DCPD/CHX-1. Only DCPD/CHX-1 particle showed effective antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, even at low concentrations (MIC: 0.0038 mg/mL). Based on these results, it was possible to conclude that the only DCPD particles loaded

with 1% CHX exhibited effective antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and, therefore, have the potential to be incorporated into dental materials and provide concomitant antibacterial activity and remineralizing properties.

Keywords: Calcium phosphate. Chlorhexidine. Dental materials. Antimicrobial agents. Remineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.1 - Esquema do preenchimento da placa com o meio de cultura Mueller Hinton e as partículas.....47
- Figura 4.2 - Esquema da diluição seriada do meio de cultura com as partículas e o preenchimento com o inóculo47
- Figura 5.1 - Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier do DCPD40
- Figura 5.2 - Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier das partículas DCDP/CHX-150
- Figura 5.3 - Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier das partículas DCDP/CHX-5.....51
- Figura 5.4 - Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier das três amostras51
- Figura 5.5 - Distribuições de tamanho das partículas por espalhamento de luz laser53
- Figura 5.6 - Imagens das partículas obtidas através do microscópio eletrônico de varredura em aumentos de 1000 vezes, 5000 vezes, 10000 vezes e 20000 vezes55
- Figura 5.7 - Imagem exemplificando a análise dos resultados do ensaio de CIM...56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μm	micrômetro
Ag	prata
CO_2	dióxido de carbono
Ca/P	razão entre os átomos de cálcio e fosfato
CaP	fosfato de cálcio
CPP-ACP	fosfato de cálcio amorfo estabilizado pelo fosfopeptídeo da caseína
CHX	clorexidina
CIM	concentração inibitória mínima
DCPD	fosfato dicálcico dihidratado
FTIR	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
g	gramas
HA	hidroxiapatita
h	horas
kV	quilovolt
m^2/g	metro quadrado dividido por grama
mg/mL	miligrama dividido por mililitro
mL	mililitro
mL/min	mililitro dividido por minuto
$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	milimol dividido por litro
mol/L	mol dividido por litro
MEV	microscopia eletrônica de varredura
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
nHA	nanohidroxiapatita sintética
NPs	nanopartículas
PO_4	ortofosfato
pH	potencial de hidrogênio
rpm	rotações por minuto
<i>S. Mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
UV/Vis	espectrofotometria UV/Visível
ZnO	óxido de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
X	vezes de aumento
α	alfa
β	beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	GENERALIDADES SOBRE FOSFATO DE CÁLCIO	27
2.2	GENERALIDADES SOBRE CLOREXIDINA	29
2.3	ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	30
2.4	ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS COM POTENCIAL REMINERALIZADOR.....	33
2.5	ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS QUE COMBINAM O POTENCIAL REMINERALIZADOR E ANTIMICROBIANO	36
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
4.2	SÍNTESE DAS PARTÍCULAS	41
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	42
4.3.1	Espectrofotometria uv/vis	42
4.3.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)	44
4.3.3	Análise elementar	44
4.3.4	Espalhamento de luz laser	45
4.3.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	46
4.4.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	46
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS	49
5.1	ESPECTROFOTOMETRIA UV/Vis	49
5.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	49
5.3	ANÁLISE ELEMENTAR	52

5.4	ESPALHAMENTO DE LUZ LASER	52
5.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	54
5.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) .	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária ainda representa um desafio global de saúde pública (1). Atingindo mais de 2,8 bilhões de pessoas, a cárie tornou-se, dentre as doenças crônicas, a mais prevalente do mundo (2). É considerada uma doença evitável e multifatorial, mediada pela presença do biofilme (3), com composição bacteriana diversa (4), sendo o coco Gram positivo *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) a bactéria de maior importância neste processo (5). A produção de ácidos, por meio da metabolização de nutrientes pelas bactérias do biofilme e consequente diminuição do pH, constitui fator responsável pela desmineralização do tecido dentário que pode resultar na formação de lesões cariosas.

Nos casos em que o procedimento restaurador direto está indicado, os compósitos resinosos são considerados os materiais de primeira escolha dos cirurgiões dentistas para restaurar a perda estrutural provocada pela lesão (6). No entanto, devido ao acúmulo de biofilme em regiões próximas à interface dente-restauração, a formação de lesões de cáries adjacentes a restaurações (“cárie secundária”) pode ocorrer (7).

Lesões de cárie adjacentes a restaurações ainda representam a principal causa para a falha e substituição de restaurações em compósitos (8-11). Cerca de 50% requerem intervenção adicional durante um período de 10 anos (12), e um aumento na proporção de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* em um modelo de estudo *in situ* que comparou espécimes restaurados com compósito a não restaurados foi reportado (13). O desenvolvimento de lesões adjacentes a restaurações constitui processo complexo, multifatorial, que entrelaça a mesma etiologia da cárie primária com características do preparo cavitário e do material restaurador (7). Esse conjunto de fatores torna o diagnóstico difícil, exigindo maior atenção para distinguir a presença de fendas micrométricas com infiltração da presença de descolorações marginais (14).

A desmineralização causada por microrganismos patogênicos na interface dente-restauração pode ser favorecida pela falta de atividade antimicrobiana e/ou propriedade remineralizante da maioria dos materiais restauradores (7). Embora outros fatores de risco (tais como dieta cariogênica e má higiene oral) estejam

fortemente associados ao desenvolvimento das lesões de cárie adjacentes a restaurações, a ausência de atividade antibacteriana ou remineralizante dos compósitos resinosos parece, de fato, desempenhar papel importante para este processo (14). Diante deste relevante problema clínico, na última década diversas abordagens foram propostas para desenvolver materiais com atividade antibacteriana ou propriedade remineralizante, e resultados positivos têm sido descritos (11, 15, 16).

De maneira geral, a literatura apresenta três possíveis métodos para evitar a formação de lesões de cárie adjacentes a restaurações. O primeiro método está relacionado à incorporação de compostos com atividade antimicrobiana em materiais odontológicos para reduzir o crescimento do biofilme (17-20). A segunda estratégia apoia-se no uso de compostos capazes de promover ganho mineral nos tecidos adjacentes ou aumentar a resistência à desmineralização (21-25). Como terceira abordagem, tem-se o desenvolvimento de compósitos experimentais contendo materiais com concomitante atividade antimicrobiana e propriedade remineralizante (26-28).

Entre os compostos capazes de promover atividade antimicrobiana, a clorexidina é considerada o “padrão ouro” em odontologia por seu amplo espectro de ação (29) e variedade de indicações para uso clínico (30-32). Pesquisas envolvendo a incorporação da clorexidina em compósitos resinosos têm apresentado resultados promissores (18, 26, 33). Além disso, sais de amônio quaternário (19), moléculas capazes de repelir a adsorção de proteínas que precedem a colonização bacteriana (17), prata [Ag], óxido de zinco [ZnO] e quitosana (18, 33-39) também são citados na literatura entre as estratégias cujo objetivo é promover ação antimicrobiana.

No que tange a abordagens cujo foco é a remineralização, destacam-se os ortofosfatos de cálcio, considerados alternativa promissora para adição em matrizes resinosas (40), exibindo recuperação mineral em regiões mais profundas quando comparado com materiais liberadores de flúor (41). Como exemplos, tem-se o fosfato de cálcio amorfo estabilizado pelo fosfopeptídeo da caseína (CPP-ACP) (42, 43) e a nanohidroxiapatita sintética (nHA) (23).

Vidros bioativos também já mostraram ser capazes de promover a remineralização (44). Em relação às estratégias que objetivam aumentar a resistência do esmalte à desmineralização ácida, tem-se o uso de fluoretos, cujos resultados já estão consolidados na literatura odontológica (45).

Baseando-se em resultados prévios de estudos envolvendo o desenvolvimento de compósitos restauradores contendo partículas de ortofosfato de cálcio (46-48) bem como de materiais odontológicos que incorporaram a clorexidina (18, 33), parece promissor e vantajoso sintetizar partículas com a combinação de ambos. A literatura apresenta poucos trabalhos envolvendo a síntese dessas partículas (27, 49, 50), sendo o ACP a única fase do fosfato já combinada com a clorexidina. No entanto, o fosfato dicálcico dihidratado, DCPD, (fase escolhida para o presente estudo) apresenta algumas vantagens em relação ao ACP, as quais justificaram a sua escolha. Pelo fato de possuir índice de refração semelhante ao da matriz orgânica (entre 1,54 e 1,55), vislumbra-se a possibilidade de incorporação da partícula sintetizada em material resinoso sem acarretar em problemas na fotoativação (51). Além disso, o DCPD é uma fase mais solúvel e, portanto, espera-se que a liberação de íons seja maior comparada a esta fase. A terceira vantagem na escolha do DCPD apoia-se na facilidade e baixo custo do processo de síntese.

Diante do exposto, o presente estudo propõe um processo de síntese de partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) carregadas com diacetato de clorexidina (CHX) a 1% e 5%. Espera-se que o sucesso na síntese de partículas que forneçam concomitantemente atividade antimicrobiana e propriedade remineralizante contribua para o desenvolvimento de novos materiais bioativos com potencial para reduzir a ocorrência de lesões de cárie adjacentes a restaurações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE FOSFATO DE CÁLCIO

Fosfatos de cálcio (CaP) são amplamente estudados por possuírem propriedades osteocondutivas e bioativas (52), biocompatibilidade e, além disso, por estarem envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos de calcificação; tais como a calcificação fisiológica óssea e dentária, e os processos patológicos, tais como o cálculo dentário, renal, e as lesões ateroscleróticas (53, 54). Podem ser definidos como sais de cálcio derivados do ácido ortofosfórico que possuem estruturas cristalinas estabilizadas por uma rede tetraédrica de PO_4 , o que lhes confere a característica de baixa solubilidade em água (51). Ao entrar em contato com tecidos vivos, o fosfato de cálcio é dissolvido e íons cálcio e fosfato são liberados para o meio. A referida capacidade de dissolução é uma vantagem quando o fosfato é utilizado como carreador de drogas, por possibilitar a liberação de fármacos ou biomoléculas incorporadas (55).

A diversidade de fases em que os fosfatos de cálcio podem se apresentar é mediada pelas diferenças de pH, temperatura, razão Ca/P e solubilidade, onde compostos quimicamente puros possuem razão Ca/P entre 0,5 e 2,0. Em linhas gerais, quanto menor esta proporção mais ácido e solúvel em água é a fase do fosfato de cálcio (53). Dentre as fases, o fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) possui solubilidade intermediária, ocorrendo como fase precursora na formação da hidroxiapatita em processos de biomineralização (56). A Tabela 2.1 apresenta as fases dos ortofosfatos de cálcio com a respectiva razão Ca/P.

Tabela 2.1 – Fases dos ortofosfatos de cálcio ⁵⁷

Fase do ortofosfato de cálcio		Razão Ca/P
Fosfato monocálcico monohidratado	MCPM	0,5
Fosfato monocálcico anidro	MCPA	0,5
Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD	1,0
Fosfato de cálcio anidro	DCPA	1,0
Fosfato octacálcico	OCP	1,33
α - Fosfato tricálcico	α -TCP	1,5
β - Fosfato tricálcico	β -TCP	1,5
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	1,2-2,2
Hidroxiapatita carbonatada	CDHA	1,5-1,67
Hidroxiapatita	HA ou HAP	1,67
Fluorapatita	FA ou FAP	1,67
Oxiapatita	AO	1,67
Fosfato tetracálcico	TTCP	2,0

Fonte: 57 (p.127)

O DCPD, também conhecido na mineralogia como brushita (57), é estudado em odontologia nas formulações combinadas com flúor para reduzir a atividade de cárie em pacientes de alto risco (53, 58), pois a reação desencadeada pelo DCPD com íons fluoreto favorece a formação de fluorapatita (59). Tem aplicação para o desenvolvimento de materiais para enxertia óssea que promove a regeneração tecidual em traumas ou doenças que desencadeiam extensos defeitos ósseos (60), bem como já foi incorporado em compósitos para promover a remineralização ou retardar a ocorrência de novas lesões de cariosas (46-48).

Com relação à liberação de íons, compósitos experimentais com adição de 15% de DCPD, demonstraram, após imersão em uma solução de NaCl tamponada em pH 7, liberação de cálcio/fosfato de aproximadamente 0,10/0,05 mmol.L⁻¹ e 0,04/0,01 mmol.L⁻¹ após 15 e 60 dias, respectivamente (46, 51). A falta de interação entre as partículas de fosfato com a matriz resinosa pode influenciar negativamente a resistência à fratura (48); porém, a funcionalização do DCPD com TEGDMA em

proporções adequadas (10% em volume de DCPD funcionalizado com 14% de TEGDMA) gerou benefícios para as propriedades mecânicas sem prejuízos significativos para a liberação de íons (47). Compósitos experimentais com adição de DCPD demonstraram serem capazes de promover recuperação mineral, bem como de reduzir a profundidade das lesões em esmalte (61). De acordo com os resultados supracitados é possível afirmar que o desenvolvimento de compósitos contendo fosfato de cálcio é promissor.

2.2 GENERALIDADES SOBRE CLOREXIDINA

Consagrada como antimicrobiano “padrão ouro” em odontologia, a clorexidina mostra-se como aliada aos cirurgiões dentistas em diversas situações clínicas. Evidências confirmam que o uso de bochechos com CHX previamente ao atendimento reduz a contaminação pelo aerossol gerado pelos equipamentos rotatórios durante os procedimentos odontológicos (62). Constitui-se como método auxiliar na higienização de próteses e nos cuidados orais para pacientes comprometidos sistemicamente (63). Na endodontia, é indicada como substância química auxiliar ao preparo químico-mecânico e como medicação intra-canal (31) e foi considerada antimicrobiano de primeira escolha quando comparada ao paramonoclorofenol, em virtude da sua eficiência em baixas concentrações frente a microorganismos frequentemente associados a infecções endodônticas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella denticola* e *Prevotella melaninogenica*. Além disso, apresentou valores de concentração inibitória mínima (2,67 a 80 µg/mL) muito inferiores ao paramonoclorofenol (46,67 a 213,33 µg/mL) (64). Em cirurgia, é utilizada para antissepsia extra oral (32) e em dentística pode ser utilizada para retardar o processo de degradação das restaurações adesivas relacionadas à ação de enzimas metaloproteinases (65). Mais recentemente, também tem-se estudado a sua incorporação em compósitos resinosos (18, 26, 33).

É uma substância indicada apenas para uso tópico. Entretanto, quando inadvertidamente ingerida, apresenta baixa absorção pelo trato gastrointestinal e

baixa incidência de reações adversas, o que lhe confere segurança. Os efeitos adversos mais comuns são xerostomia, alterações de paladar, sensibilidade oral e alterações de cor extrínsecas dos dentes (63).

Possui amplo espectro de ação, pela sua capacidade de agir contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, vírus lipofílicos, leveduras e fungos (29). A referida capacidade de atuação sobre bactérias é explicada por meio do seu mecanismo de ação: A molécula de natureza catiônica da clorexidina pode ser atraída pela carga negativa da superfície bacteriana e, desta forma, ser adsorvida à membrana celular por meio de interações eletrostáticas (especula-se entre ligações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio). Tal adsorção é concentração-dependente e, por esta razão, em concentrações elevadas (acima de 0,1%) a CHX pode desencadear precipitação, coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana. Por outro lado, em concentrações mais baixas (0,02 a 0,06%) observa-se uma alteração na integridade da membrana celular que culmina com o extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (29, 63, 66).

Uma importante propriedade da clorexidina é a substantividade, isto é, a capacidade de permanecer no tecido alvo e ser liberada lentamente. Este efeito foi comprovado por estudo que avaliou a CHX a 2 % (apresentações solução e gel) inserida na dentina radicular de dentes extraídos, no qual foi observada retenção da CHX no canal radicular por até noventa dias (67). Na dentina coronária os resultados também são positivos. Observou-se liberação do diacetato de clorexidina (tanto 0,2% como 2%) em diferentes substratos (dentina mineralizada, parcialmente e totalmente desmineralizada) por até oito semanas (68). No microbioma salivar, o período da atividade antibacteriana é reduzido, visto que o efeito antimicrobiano de um enxaguatório bucal com gluconato de clorexidina a 0,2% é mantido por aproximadamente sete horas (69).

2.3 ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O desenvolvimento de materiais restauradores bioativos que concomitantemente sejam capazes de restaurar a estrutura dental perdida e prevenir

o desenvolvimento de novas lesões cariosas têm sido foco de muitos pesquisadores, devido às falhas comumente apontadas em restaurações com resinas compostas (8-11). A adição de potencial antibacteriano aos compósitos resinosos parece ser uma estratégia promissora, principalmente, por serem considerados os materiais com maior propensão ao acúmulo de biofilme e frequente necessidade de substituições e reparos (70).

Dentre as estratégias antimicrobianas mais promissoras estão aquelas relacionadas com a incorporação de sais de amônio quaternário (19), de moléculas capazes de repelir a adsorção de proteínas que precedem a colonização bacteriana (2-metacrilóxiethyl fosforilcolina [MPC]) (17), ou de agentes antibacterianos (prata [Ag], óxido de zinco [ZnO], quitosana, e clorexidina [CHX]) aos monômeros resinosos (18, 33-39).

A adição de sais de amônio quaternário a um grupo metacrilato (*quaternary ammonium methacrylates*, QAMs) resultou em redução do crescimento de biofilme, manutenção das propriedades do material (resistência à flexão e módulo de elasticidade) (71). O amônio quaternário pode ser encontrado em diversas formas, tais como brometo de 12-metacrilóxiethylpiridínio (MDPB) (72), dimetacrilato de amônio quaternário (QADM) (71), dimetilaminododecil metacrilato (DMAHDM), e dimetilaminohexadecil metacrilato (DMADDM) (73, 74). No que tange ao seu mecanismo de ação, o amônio quaternário é capaz de romper a membrana celular da bactéria por meio do contato entre a célula bacteriana negativa e a carga positiva da amina quaternária (75). A desvantagem desses compósitos é que possuem inibição por contato e, conseqüentemente, a adsorção de proteínas nas superfícies dos compósitos pode reduzir sua efetividade contra as bactérias (76, 77).

O 2-metacrilóxiethylfosforilcolina (MPC) é um dos representantes do grupo de moléculas capazes de repelir a adsorção de proteínas que precedem a colonização bacteriana. Constitui polímero hidrofílico e biocompatível (17, 77) e mostrou-se mais efetivo para redução do biofilme bacteriano quando associado ao dimetilaminohexadecil metacrilato de amônio quaternário (DMAHDM) e incorporado ao compósito. Isto porque o MPC desempenhou a função de repelente de proteínas na superfície do compósito, enquanto o DMAHDM inibiu as bactérias por meio de contato direto. Além de demonstrar atividade antimicrobiana, as propriedades

mecânicas (resistência e módulo de elasticidade) foram semelhantes às do compósito comercial testado (77).

Resultados promissores também já foram descritos para compósitos com incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) e óxido de zinco (ZnONPs), tendo em vista os comprovados efeitos antimicrobianos contra o *Streptococcus mutans*, mesmo em baixas concentrações (34-37). Com relação às nanopartículas de prata, vários mecanismos de ação foram propostos, dentre as quais destaca-se a capacidade de penetrar na parede celular, alterando sua membrana e podendo gerar morte celular (78). Efeitos positivos de sua adição foram comprovados em várias aplicações na Odontologia, tais como em resinas acrílicas para próteses, compósitos restauradores, materiais obturadores endodônticos, e revestimento de titânio em implantes (78). A desvantagem relacionada à sua cor e, conseqüentemente, para as propriedades estéticas foi recentemente abordada e superada por meio do desenvolvimento de AgNPs revestidas por sílica, que demonstraram ser mais estéticas e com eficiente redução de biofilme (37). A quitosana, conhecida por promover ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno e com isso melhorar a integridade estrutural da dentina desmineralizada (20), também foi reconhecida como material com potente atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* (38, 39). Entretanto, a incorporação da quitosana metacrilada em compósitos resinosos na concentração necessária para promover efeito antibacteriano significativo influenciou negativamente as propriedades mecânicas do material (dureza e resistência à flexão) (38). Especula-se que esta redução esteja relacionada ao fato da quitosana ser um material higroscópico e, portanto, o aumento da absorção de água poderia justificar a queda nas propriedades (79).

A clorexidina (CHX), antimicrobiano “padrão ouro” na Odontologia, também vem sendo foco de estudos (18, 26, 33). Sabe-se que sua presença na camada híbrida resulta em inibição das metaloproteinases, o que pode favorecer a longevidade das restaurações adesivas (80). Além disso, a incorporação do diacetato de clorexidina à matriz resinosa, quando associado a partículas de carga de sílica mesoporosa, favoreceu a liberação da CHX de maneira gradual e prolongada, demonstrando atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, sem influenciar negativamente as propriedades mecânicas do compósito experimental (33). Mais recentemente, foi desenvolvido compósito com adição de

partícula de montmorilonita carregada com clorexidina à matriz resinosa, o qual apresentou efetiva atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivallis*, e *Staphylococcus aureus* (18). A montmorilonita (MMT) é uma nanoargila com capacidade de absorver moléculas orgânicas e auxiliar a liberação controlada de fármacos (81). Em baixas concentrações, a MMT não alterou as propriedades mecânicas do material, e atuou como veículo para liberação do fármaco (18). Portanto, especula-se que a associação da clorexidina a algum tipo de carregador seja importante, já que na ausência dessa associação existe queda nas propriedades mecânicas, aumento da rugosidade e liberação rápida, enquanto na presença do carregador estes efeitos negativos não são observados (33).

Com o intuito de controlar a liberação da clorexidina e evitar a liberação excessiva e descontrolada da clorexidina livre na matriz de resina, duas estratégias são propostas na literatura: encapsulamento e nanoparticulação. O encapsulamento refere-se à estratégia em que a clorexidina é encapsulada em um “transportador” e através dele é liberada lentamente, enquanto a nanoparticulação refere-se à síntese de hexametáfosfato de clorexidina que apresenta potencial de liberação a longo prazo (36).

2.4 ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS COM POTENCIAL REMINERALIZADOR

Além das estratégias relacionadas com a incorporação de materiais contendo antimicrobianos em compósitos resinosos para reduzir o biofilme bacteriano supracitadas, a literatura também aborda o uso de partículas para reduzir a desmineralização e favorecer a remineralização como método promissor. A melhor compreensão dos mecanismos físico-químicos da instalação e progressão das lesões de cárie influenciou o desenvolvimento de tecnologias inovadoras de remineralização que vão além do uso de fluoretos (82). Vários compostos sintéticos, tais como fosfato de cálcio amorfo estabilizado pelo fosfopeptídeo da caseína (CPP-ACP) (43), vidros bioativos (44), nanohidroxiapatita sintética (nHA) (83), bem como compósitos

contendo fosfato de cálcio amorfo (ACP) ou fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) (41, 61) já mostraram potencial para remineralizar lesões iniciais de cárie.

O método mais tradicional utilizado para aumentar a resistência do esmalte à desmineralização está relacionado ao uso de fluoretos, disponível em diversas apresentações comerciais e amplamente utilizado (84, 85). É tratado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um recurso importante em saúde pública, que recomenda a fluoretação das águas (86, 87). Essa estratégia somada ao uso diário de dentifrícios fluoretados influenciaram diretamente o declínio da incidência e prevalência de lesões cariosas no Brasil (88). Sua eficiência levou ao desenvolvimento de materiais restauradores com incorporação de fluoretos, dos quais destacam-se ionômeros de vidro convencionais, ionômeros de vidro modificados por resina e os compômeros que, na dependência do tipo e da permeabilidade do material (especialmente dos ionômeros), podem funcionar como reservatórios de flúor (89).

Fosfatos de cálcio são altamente biocompatíveis e em contato com os tecidos vivos sofrem dissolução, disponibilizando íons cálcio e hidrogeno fosfato para o meio. Recentemente, o potencial de compósitos experimentais contendo ACP ou DCPD para remineralizar lesões de cárie de esmalte artificial foi investigado *in vitro* (41, 61), e observou-se que a recuperação mineral em regiões mais profundas foi mais eficiente do que com materiais liberadores de flúor (40, 41). No entanto, a liberação de íons é reduzida ao longo do tempo e a adição destas partículas reduz significativamente as propriedades mecânicas de materiais à base de resina, especialmente quando não são funcionalizados (51). A funcionalização do DCPD com TEGDMA pode ser adotada para conferir ao material aumento nas propriedades mecânicas e no grau de conversão (47). Com relação à taxa de liberação de íons, esta é dependente da fração em volume de partículas (90) e trabalhos iniciais verificaram que a proporção de 40% em massa seria o mínimo para garantir elevada liberação de íons (91, 92). Vale ressaltar que o uso do fosfato de cálcio em odontologia não se restringe apenas aos compósitos. O ACP também demonstrou potencial coadjuvante na redução de manchas brancas em adesivos ortodônticos (93). Além disso, estudo *in vivo* mostra que a aplicação do fosfato de cálcio em géis clareadores a base de peróxido de carbamida 10%, em associação ao nitrato de potássio e flúor, foi capaz de reduzir a sensibilidade dental (94).

Por se tratar de uma fase metaestável, o ACP necessita de um estabilizador para evitar que se converta em hidroxiapatita, e o fosfopeptídeo de caseína (CCP) pode atuar neste contexto (51). O CCP-ACP é capaz de estabilizar o cálcio e fosfato de maneira equivalente as proteínas que contém estaterina e prolina (95). Tal tecnologia demonstrou ser capaz de remineralizar lesões superficiais de esmalte e retardar a progressão da cárie em estudos *in situ* e *in vivo* (96). A incorporação do complexo CCP-ACP em ionômero de vidro modificado resultou em aumento no processo de remineralização, confirmado pela menor redução da microdureza do esmalte após ser submetido ao ciclo de desmineralização. Além disso, o teste de biofilme demonstrou capacidade de inibir o crescimento e a adesão de *S. mutans*. Entretanto, a incorporação levou à queda na resistência ao cisalhamento (97). Embora esta tecnologia seja bastante promissora, seu uso em cremes dentais ainda não é capaz de superar os benefícios oferecidos pelo uso de cremes dentais tradicionais contendo flúor, pois não demonstraram significativa redução na desmineralização de lesões produzidas nos tecidos dentais (98, 99).

A nanohidroxiapatita sintética (nHA) também foi descrita como fonte de íons para promover a remineralização. Ainda não existe consenso sobre o seu mecanismo de ação, dentre os quais são descritos na literatura a deposição de nanopartículas de apatita na lesão cariada, bem como a atuação como reservatório de cálcio (83, 100, 101). Sugere-se que a nHA preencha os microporos do esmalte formados pela desmineralização e permita a precipitação de íons cálcio e fosfato, contribuindo para a remineralização superficial (102). O tamanho da HA também pode influenciar no processo de remineralização. A nanohidroxiapatita (10 a 20 nm de diâmetro) possui maior capacidade para liberação de íons cálcio e fosfato comparada a microhidroxiapatita (0,5 a 2 µm de diâmetro). Embora os autores supõem que o melhor desempenho da nHA esteja relacionado ao seu mecanismo de ação, baixa cristalinidade e, conseqüente, aumento da solubilidade, este estudo também relata maior área superficial para a nHA (86,2 m²/g) em comparação à microhidroxiapatita (12,5 m²/g), o que também constitui fator intimamente relacionado a maior liberação de íons promovida pela partícula (83). A nanohidroxiapatita aplicada como enxaguatório bucal mostrou-se efetiva na remineralização do esmalte (103), entretanto o desempenho foi significativamente melhor na camada superficial do que em regiões mais profundas (83). Ao ser incorporada como carga silanizada em compósito experimental, observou-se que a melhora das propriedades mecânicas

(dureza e sorção de água) foi diretamente proporcional a quantidade de carga presente (23).

2.5 ABORDAGENS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS QUE COMBINAM O POTENCIAL REMINERALIZADOR E ANTIMICROBIANO

O desenvolvimento de materiais com concomitante atividade antibacteriana e capacidade de promover remineralização também foi alvo de estudos recentes (26, 49, 50). Após sintetizar nanopartículas CHX/ACP (98,5 nm) e adicioná-las à um compósito restaurador, os autores avaliaram a atividade antibacteriana, as propriedades mecânicas e remineralizadoras (26). A atividade antibacteriana foi avaliada tanto nas partículas quanto no compósito. Observou-se que a concentração de 50 µg/mL da suspensão de partículas CHX/ACP foi efetiva contra *Streptococcus mutans*. Os espécimes fabricados a partir do compósito experimental também apresentaram atividade antibacteriana mesmo após o envelhecimento em água durante 28 dias. No que tange à remineralização, esta foi mais efetiva em concentrações maiores de partículas CHX/ACP, sendo o grupo com 5% de CHX/ACP em peso o que apresentou resultados mais promissores para liberação de íons e CHX (26). Apesar dos resultados positivos apresentados, a incorporação das nanopartículas resultou em queda do grau de conversão do material experimental. Especula-se que a presença das partículas CHX/ACP no material possam provocar maior espalhamento de luz, o que contribui para a redução na transmissão de luz. Estudo similar, que também realizou a síntese de partículas CHX/ACP, testou duas formas de apresentação da clorexidina: acetato e gluconato. A caracterização comprovou tamanho de partícula inferior a 100 nm, semelhantemente ao estudo supracitado. Enquanto o ACP foi incorporado no intuito de induzir a mineralização de fibrilas colágenas, a clorexidina foi adicionada para atuar na inibição das MMPs. A clorexidina foi capaz de inibir a degradação do colágeno, que foi mais significativa nas primeiras 12 horas. A liberação de íons mostrou-se mais expressiva nos três primeiros dias e tornou-se mais rápida quando o pH 7 foi alterado para pH 4 (49). Outro estudo que desenvolveu compósitos com adição de partículas ACP e CHX apontou para uma liberação de cerca de 2% de CHX em um mês de avaliação, a

qual foi capaz de desencadear efeito antibacteriano expressivo por meio de redução da atividade metabólica das bactérias, da produção de ácido lático e da viabilidade do biofilme. Os autores especulam que o baixo teor liberado é capaz gerar um efeito local, sem acarretar danos sistêmicos, e que a clorexidina remanescente apresente liberação prolongada (50).

Com relação ao mecanismo de interação entre CHX/ACP, especula-se que o ACP adsorva a clorexidina em seus poros através de vesículas à base de surfactante não-iônico (niossomas). A oscilação ultrassônica é capaz de reduzir o tamanho dos niossomas, facilitando o encapsulamento ou a adsorção de drogas hidrofílicas, como a CHX, dentro de sua cavidade interna nas nanopartículas (49, 104). As imagens microestruturais, obtidas por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), caracterizaram as partículas de ACP/CHX como estrutura semelhante a vesícula oca ("*core-shell*"). As nanopartículas *core-shell*, bastante estudadas em aplicações biomédicas, apresentam a possibilidade de liberação controlada de drogas e proteção para cargas sensíveis, como proteínas, passíveis de sofrerem degradação a depender do meio em que estiverem (105, 106). A estrutura "*core-shell*" foi comprovada em imagem que mostra a vesícula em secção transversal, em que se observa uma concha densa na camada mais externa e um núcleo oco na camada interna. Por isso, especula-se que a CHX seria encapsulada pelas nanopartículas de ACP (26).

A vantagem da escolha do DCPD em relação ao ACP está relacionada a maior solubilidade conferida a esta fase (57), bem como aos resultados promissores prévios resultantes da incorporação do DCPD em compósitos resinosos experimentais (46-48). No que se refere à clorexidina, é indiscutível a sua efetividade como antimicrobiano no âmbito odontológico (31, 32, 62, 65, 67, 68), mesmo quando incorporada aos compósitos resinosos (18, 33).

3 PROPOSIÇÃO

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* de partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) carregadas com diacetato de clorexidina (CHX) a 1% e a 5%.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram sintetizados três grupos de partículas: DCPD: Partículas de DCPD sem a adição de diacetato clorexidina, DCPD/CHX-1: Partículas de DCPD carregadas com 1% de diacetato de clorexidina, e DCPD/CHX-5: Partículas de DCPD carregadas com 5% de diacetato de clorexidina.

4.2 SÍNTESE DAS PARTÍCULAS

A síntese das partículas de DCPD foi realizada em temperatura ambiente, em recipiente de polipropileno e sob agitação mecânica (2000-3000 rpm, hélice dispersiva, Fisatom, modelo 713D, São Paulo, Brasil). O volume da solução de fosfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), foi adicionado ao recipiente, sob a qual foi adicionada com o auxílio de uma bomba peristáltica (10 mL/min) a solução de nitrato de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), em mesma concentração (1,25 mol/L). Após a completa mistura dos reagentes, a agitação foi mantida por 15 minutos.

Na etapa de purificação, a dispersão obtida foi filtrada a vácuo em funil de *buchner*, com papel filtro. No intuito de remover sais residuais, o sólido retido no papel filtro recebeu cinco lavagens com 100 mL de água deionizada a cada lavagem. Procedeu-se com três lavagens do material com 50 mL de etanol a cada lavagem. Após a passagem do etanol, o sólido foi mantido no funil por 15 minutos para passagem de ar. A etapa de lavagem com etanol removeu a água presente no sólido, evitando que reações de hidrólise e transformações de fase pudessem ocorrer durante a secagem. Além disso, a passagem de ar removeu a maior parte do etanol. O material estava seco após 4 horas em dissecador sob vácuo.

Concluída a síntese das partículas de DCPD, foi realizada a incorporação com diacetato de clorexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$). Para obter a concentração de 1% de diacetato de clorexidina, 0,6 g de clorexidina (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Alemanha) foram diluídas em 59,4 g de água destilada. Para obter a solução de 5% de clorexidina, 3 g de CHX (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Steinheim, Alemanha) foram diluídas em 57 g de álcool etílico absoluto. Totalizando 60 g para cada solução.

Após as diluições correspondentes, as soluções foram agitadas com auxílio de agitador magnético durante 10 minutos. Decorrido este tempo, 2 g de DCPD foram adicionados aos 50 g de ambas as soluções, as quais foram mantidas sob agitação durante o período de 24 horas. O restante das soluções (10 g de cada solução) foi acondicionado em um tubo Falcon e reservado para caracterização por espectrofotometria no ultravioleta visível (UV/Vis). Decorrido 24 horas, o agitador foi desligado e antes de iniciar as etapas subsequentes foi aguardado 20 minutos para que o sistema decantasse. 10 mL do sobrenadante foi recolhido com auxílio de uma pipeta e filtrado em funil convencional com papel filtro para que posteriormente fosse quantificada, por meio de espectrofotometria UV/Visível (UV/Vis), a concentração de CHX presente na solução com DCPD. O restante da solução foi novamente agitado e filtrado sob vácuo. Posteriormente, o conteúdo foi colocado em placa de petri de vidro envolto por papel filtro e levado ao dissecador acoplado com bomba à vácuo para secagem das partículas até a obtenção de um pó branco.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

4.3.1 Espectrofotometria UV/Vis

A concentração de clorexidina nas partículas de DCPD/CHX foi determinada de forma indireta calculando-se a concentração no sobrenadante coletado após a precipitação, utilizando espectrofotômetro UV-Vis (DU® 800 UV/Visible

Spectrophotometer Beckman Coulter, Estados Unidos). A cubeta utilizada foi a de quartzo, com caminho óptico de 1 cm e dois lados polidos, num volume total de 4 mL. Os espectros foram determinados na faixa de 200 a 300 nm, para posteriormente seleccionar o ponto de 255 nm. Uma curva de calibração foi construída através da leitura de alguns pontos da solução preparada inicialmente (solução de 1% de CHX diluída em água e solução de 5% de CHX diluída em álcool etílico absoluto).

A análise através do espectrofotômetro UV/Vis foi realizada após a diluição das amostras, pois a alta absorção obtida com a leitura inicial superou a sensibilidade do equipamento. A diluição adotada foi 1-400, ou seja, as amostras com 1% de clorexidina foram diluídas com água destilada 400 vezes para possibilitar a realização das leituras.

Os valores de absorbância foram registrados e posteriormente os cálculos para determinar a massa da amostra do sobrenadante foram realizados por meio da equação:

$$y = (a + b) * x$$

Onde: y corresponde ao valor de absorbância encontrado, a e b são as constantes de inclinação da reta construída com a leitura; sendo “a” o ponto zero e “b” a inclinação da reta na região onde foi realizada a diluição da amostra; e x corresponde a massa (%).

Concluídos os cálculos para determinação da massa do sobrenadante, procedeu-se aos cálculos com a fórmula que auxilia na determinação da quantidade de clorexidina presente na partícula (107) .

$$Q_e = \frac{(C_1 - C_2) \cdot V}{m}$$

Onde: Q_e refere-se à fração de CHX incorporada ao DCPD (mg/g), C_1 refere-se à concentração inicial da solução de CHX (mg/g), C_2 à concentração do sobrenadante (mg/g), V foi o volume utilizado, e m a massa de DCPD que foi utilizada (g).

4.3.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR)

A análise por FTIR foi realizada para confirmar a presença de CHX nas partículas de DCPD/CHX, utilizando espectrofotômetro no infravermelho médio com detector DLaTGS (Vertex 70, Bruker Optik GmbH, Alemanha) e com o auxílio de um acessório de reflectância difusa (EasiDiff, Pike Technologies, Inc., Madison, WI, EUA). Os espectros foram obtidos no modo de absorbância entre comprimentos de onda de 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram formados pela co-adição de 16 varreduras.

4.3.3 Análise elementar

Considerando que os átomos de carbono correspondem a 42,24% da massa molar da clorexidina, a análise elementar foi realizada para determinar o teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio das partículas e, a partir da massa de carbono, quantificar a massa de clorexidina contida na amostra.

Utilizando analisador de CHN (Perkin-Elmer, modelo 240), 1 mg de cada partícula foi aquecido até 925 °C em atmosfera de oxigênio puro. Os gases resultantes (dióxido de carbono- CO_2 , água- H_2O e nitrogênio- N_2) foram arrastados por gás hélio, homogeneizados e separados através de colunas específicas, e suas quantidades foram determinadas por um detector de condutividade térmica. A resolução do equipamento foi de 0,3%.

Para os cálculos foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\left(\%CHX = \%Carbono / 0,4224 \right)$$

Onde: %CHX refere-se à quantidade de clorexidina nas amostras, e %Carbono refere-se ao teor de carbono detectado na amostra.

4.3.4 Espalhamento de luz laser

A distribuição de tamanhos das partículas foi estimada por meio de espalhamento de luz laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Para isso, as partículas foram suspensas em isopropanol, mantidas em ultrassom por 10 minutos e introduzidas no equipamento. As distribuições dos tamanhos das partículas foram calculadas a partir da medição da variação angular na intensidade da luz à medida que um feixe de laser interagia com as partículas em suspensão. Partículas maiores dispersam a luz em ângulos pequenos, enquanto partículas pequenas dispersam a luz em ângulos grandes. A intensidade dessas emissões foi utilizada para calcular o tamanho (diâmetro equivalente) das partículas. A partir da curva de distribuição de tamanhos, o valor da mediana foi anotado.

4.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada para caracterização da morfologia das partículas. Previamente à análise, as partículas foram imersas em álcool isopropílico e, após 24 horas, gotas de sobrenadante foram aplicadas com um pincel fino sobre o porta amostra (*stub*) para o MEV-FEG JSM 6701S (JEOL, Tóquio, Japão). A microscopia foi realizada utilizando aceleração de 10 kV e diversos aumentos (1000 X, 5000 X, 10000 X, e 20000 X), visando a geração de imagens que melhor apresentem a morfologia do material.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Este ensaio foi realizado para determinar qual a mínima quantidade necessária para a inibição do crescimento visível do *Streptococcus mutans* (cepa UA 159). O microrganismo foi inicialmente reativado a partir das culturas estoque em meio BHI caldo (KASVI, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) por 18 horas em estufa à 37 °C, 5% CO₂. Após o crescimento microbiano, 300 µL desta solução foram suspendidas em 4,5 mL de NaCl 0,9% estéril. A referida suspensão bacteriana foi homogeneizada (Vórtex Phoenix, AP-56 Araraquara, São Paulo, Brasil) e a partir dela foram removidos 1 mL para acrescentar em nova solução com 9 mL de NaCl 0,9% estéril. A partir de 1 mL da solução anterior o inóculo bacteriano foi preparado com 9 mL de Mueller Hinton (KASVI, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Após homogeneização o inóculo foi ajustado para o valor de absorbância 0,1 a 660 nm em espectrofotômetro (equivalente à $1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

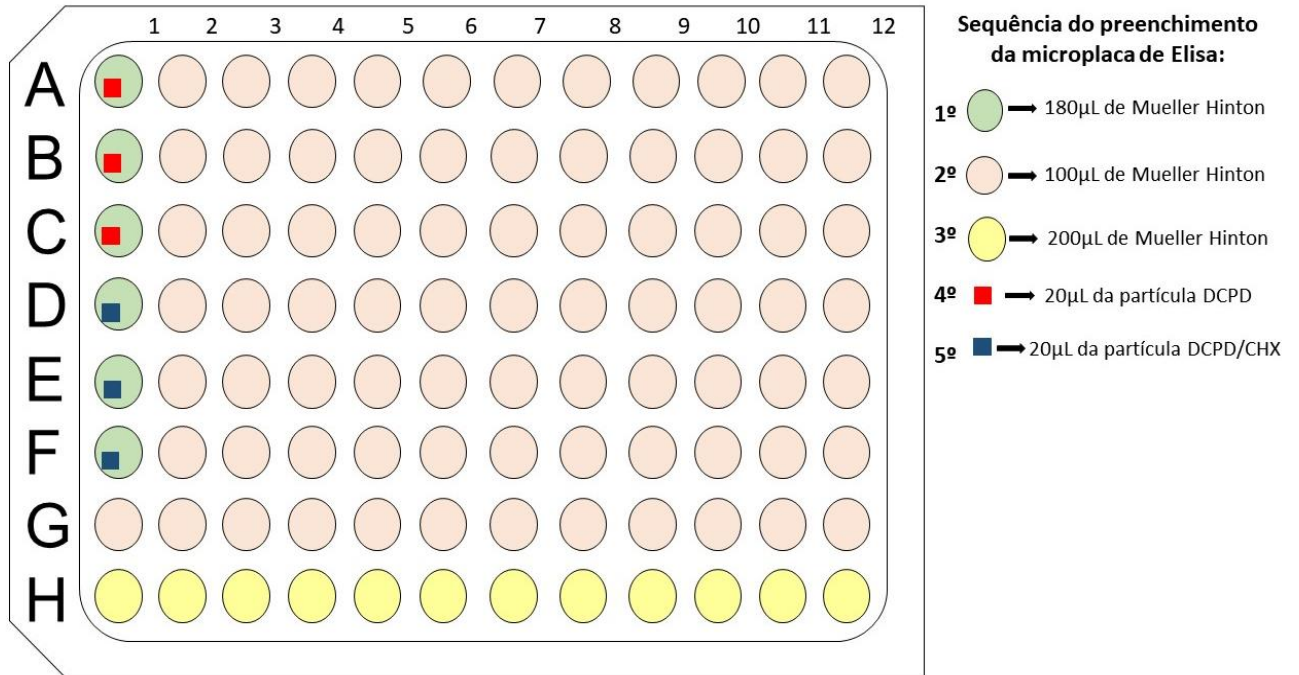
Na etapa seguinte os poços da microplaca foram preenchidos da seguinte forma:

(a) Inicialmente foram transferidos 180 µL de Mueller Hinton estéril em cada um dos poços da coluna 1 nas fileiras A-F (Figura 4.1) e, em seguida os demais poços foram preenchidos com 100 µL do mesmo meio de cultura, com exceção da fileira H, preenchida com 200 µL.

(b) Imediatamente após a etapa descrita, foram adicionados 20 µL da solução com as partículas apenas na coluna 1 das fileiras de A-F (Figura 4.1), de modo que a concentração da partícula após a transferência do inóculo no primeiro poço fosse 2,5%, e após a diluição seriada (transferência de 100µL entre os poços) a concentração reduzisse pela metade a cada poço. A mesma partícula é repetida nas três linhas subsequentes (triplicata) (Figura 4.2).

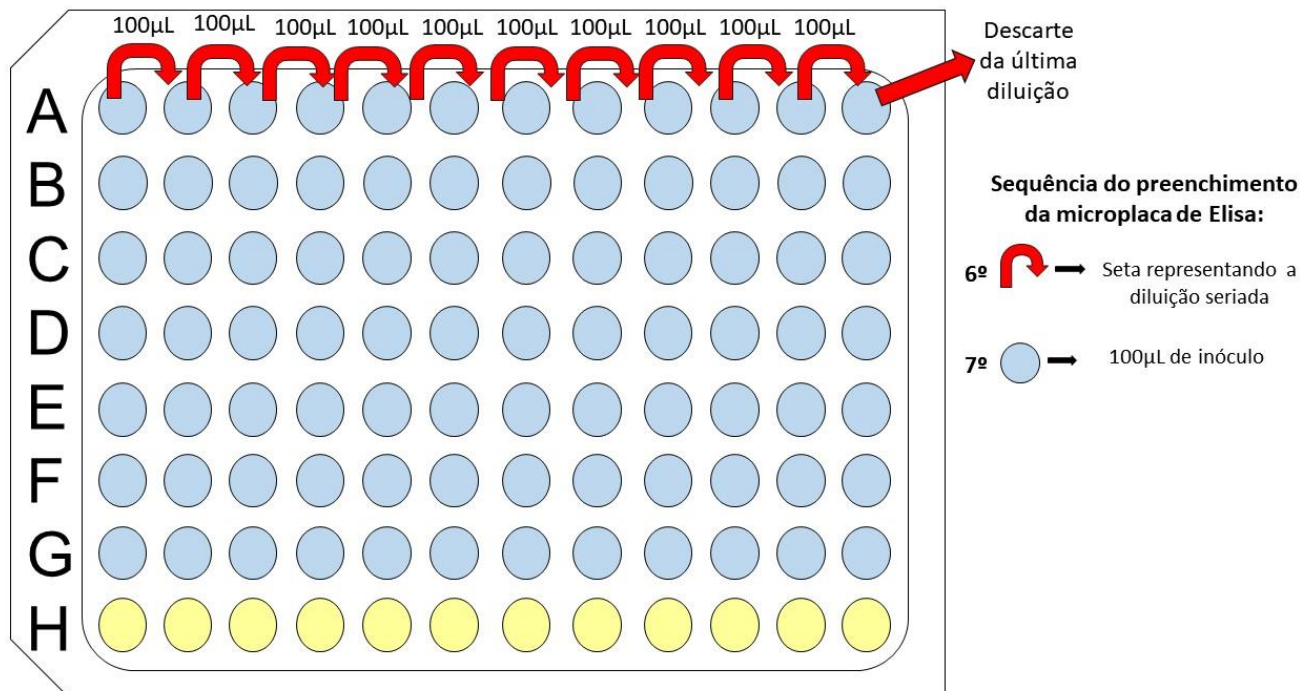
(c) Ao término da diluição seriada, todos os poços, exceto os da linha H, receberam 100 µL do inóculo (Figura 4.2), e a placa foi incubada em estufa à 37°C em ambiente de anaerobiose durante as 24 horas seguintes.

Figura 4.1 - Esquema do preenchimento da placa com o meio de cultura Mueller Hinton e as partículas



Fonte: a autora.

Figura 4.2 - Esquema da diluição seriada do meio de cultura com as partículas e o preenchimento com o inóculo



Fonte: a autora.

Ao término do período de incubação, a microplaca foi removida da estufa e a leitura à 660 nm foi realizada através do leitor de Elisa (Mindray MR-96A, China). Subsequente a leitura, 30 µL de resazurina (Sigma-Alcrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados individualmente em todos os poços e a placa foi incubada mais uma vez em estufa por 2 horas. A resazurina é uma molécula de coloração azulada que, ao entrar em contato com a célula, responde a atividade metabólica com redução em resorufina, mudando sua coloração para rosa. É, portanto, um parâmetro visual que indica inatividade bacteriana ao apresentar coloração azul ou atividade bacteriana ao apresentar coloração rosa. Para controle do experimento, foram realizados dois controles: (a) Controle negativo: meio de cultura inoculado de microrganismos, e (b) Controle positivo: meio de cultura sem inóculo.

Após a leitura no Elisa, os valores de absorbância das partículas são registrados, e calcula-se uma média da triplicata das partículas. O valor obtido com a média de cada poço da placa é comparado ao respectivo poço das linhas controle negativo e positivo. Uma determinada concentração de partículas é considerada inibitória quando o valor de absorbância registrado no poço da placa é estatisticamente igual ao valor da leitura no meio sem bactéria e diferente do meio com inóculo

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do ensaio de mínima concentração inibitória foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 ESPECTOFOTOMETRIA UV/Vis

Para o grupo DCPD/CHX-1, 127,76 mg/g foi equivalente a 11,32% de clorexidina a cada 1 g de DCPD.

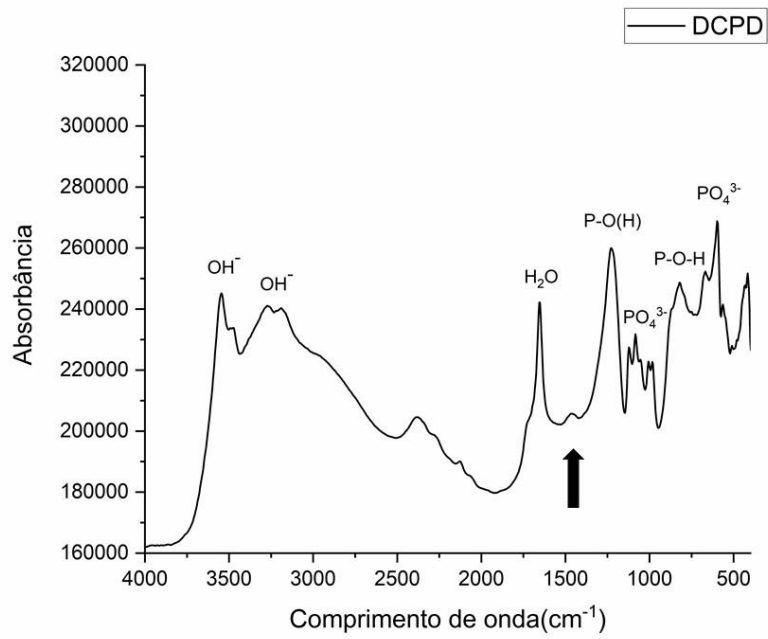
Não foi possível determinar a quantidade de clorexidina presente na partícula do grupo DCPD/CHX-5, pois a curva formada após a leitura do sobrenadante mostrou-se mais concentrada do que a da solução inicial, impedindo a conclusão da análise através do espectrofotômetro UV/Vis.

5.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A Figura 5.1 apresenta os espectros obtidos para as partículas de DCPD, nos quais observam-se bandas de absorção e respectivas ligações características do fosfato dicálcico dihidratado, a saber: OH⁻ em 3533 e 3221 cm⁻¹, H₂O em 1651 cm⁻¹, P-O(H) em 1211 cm⁻¹, PO₄³⁻ em 1080 e 602 cm⁻¹ e P-O-H em 802 cm⁻¹.

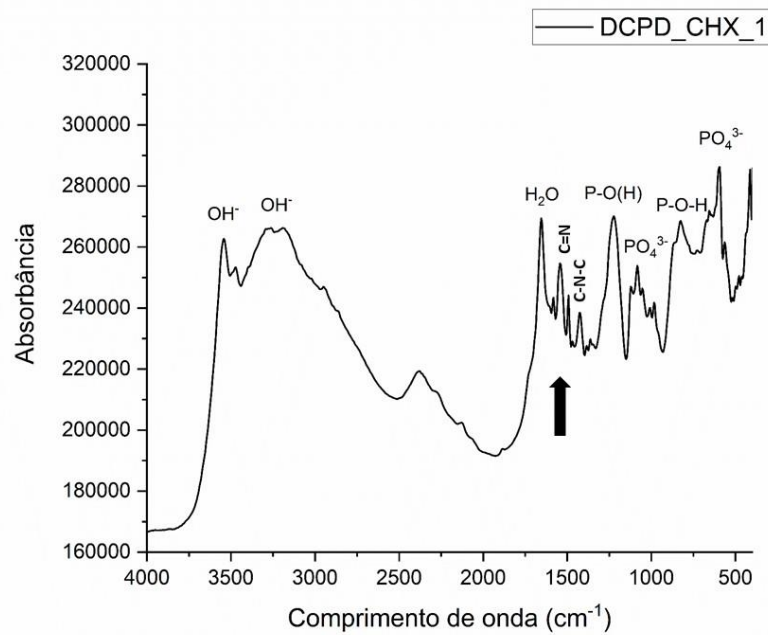
A Figura 5.2 apresenta os espectros para o grupo DCPD/CHX-1 e a Figura 5.3 para DCPD/CHX-5. Em ambas as figuras, observa-se, além das ligações supracitadas, o aparecimento de novas bandas de absorção em 1551 cm⁻¹ e 1497 cm⁻¹, em que os valores de picos podem ser atribuídos às ligações C=N ou C-N-C, e referem-se à incorporação da clorexidina nessas partículas. A Figura 5.4 evidencia comparativamente os espectros das três amostras.

Figura 5.1 – Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier do DCPD



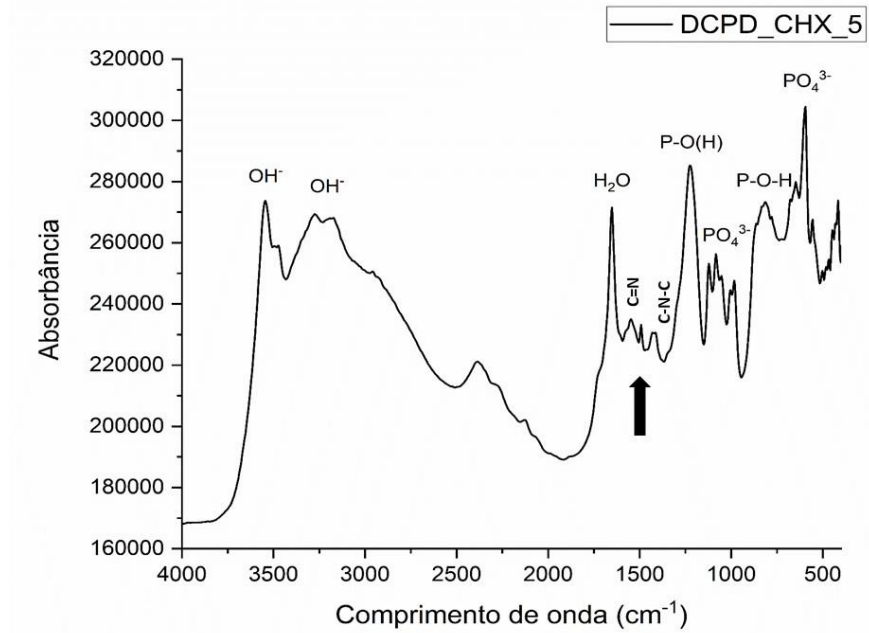
Fonte: a autora.

Figura 5.2 – Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier das partículas DCPD/CHX-1



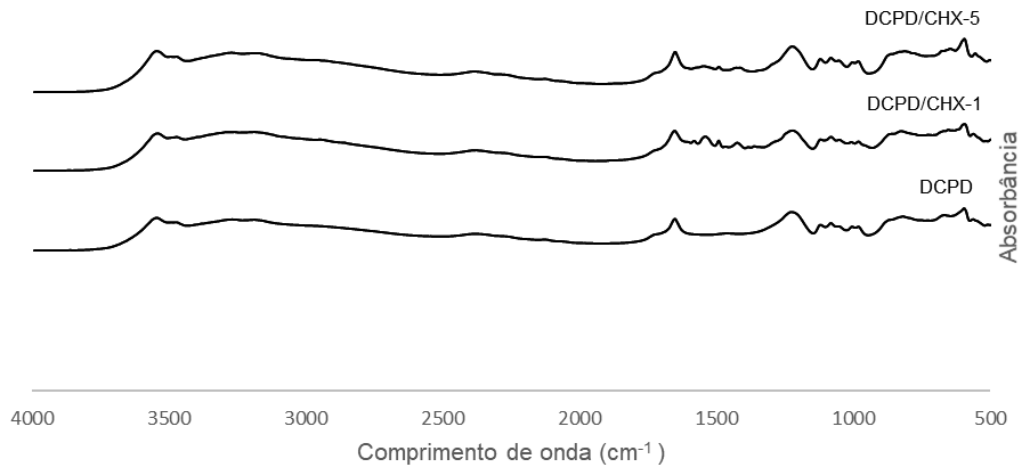
Fonte: a autora.

Figura 5.3 – Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier das partículas DCPD/CHX-5



Fonte: a autora.

Figura 5.4 - Espectro no infravermelho médio por transformada de Fourier das três amostras



Fonte: a autora.

5.3 ANÁLISE ELEMENTAR

O percentual de carbono observado nas partículas de DCPD foi correspondente a 0,08%. Esse valor é inferior à resolução do equipamento (0,3%) e, portanto, é possível concluir que não há quantidades significativas de carbono nessas partículas. Por outro lado, no grupo DCPC/CHX-1 foi detectado o percentual de 5,48% e, considerando que os átomos de carbono correspondem a 42,24% da massa molar da clorexidina, a porcentagem de CHX neste grupo foi correspondente a 13,0 %. Para o grupo DCPD/CHX-5 foi detectado o percentual de 3,50%, o que representa 8,3 % de CHX. Os demais elementos detectados estão descritos a seguir na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio detectado nas amostras pela análise elementar

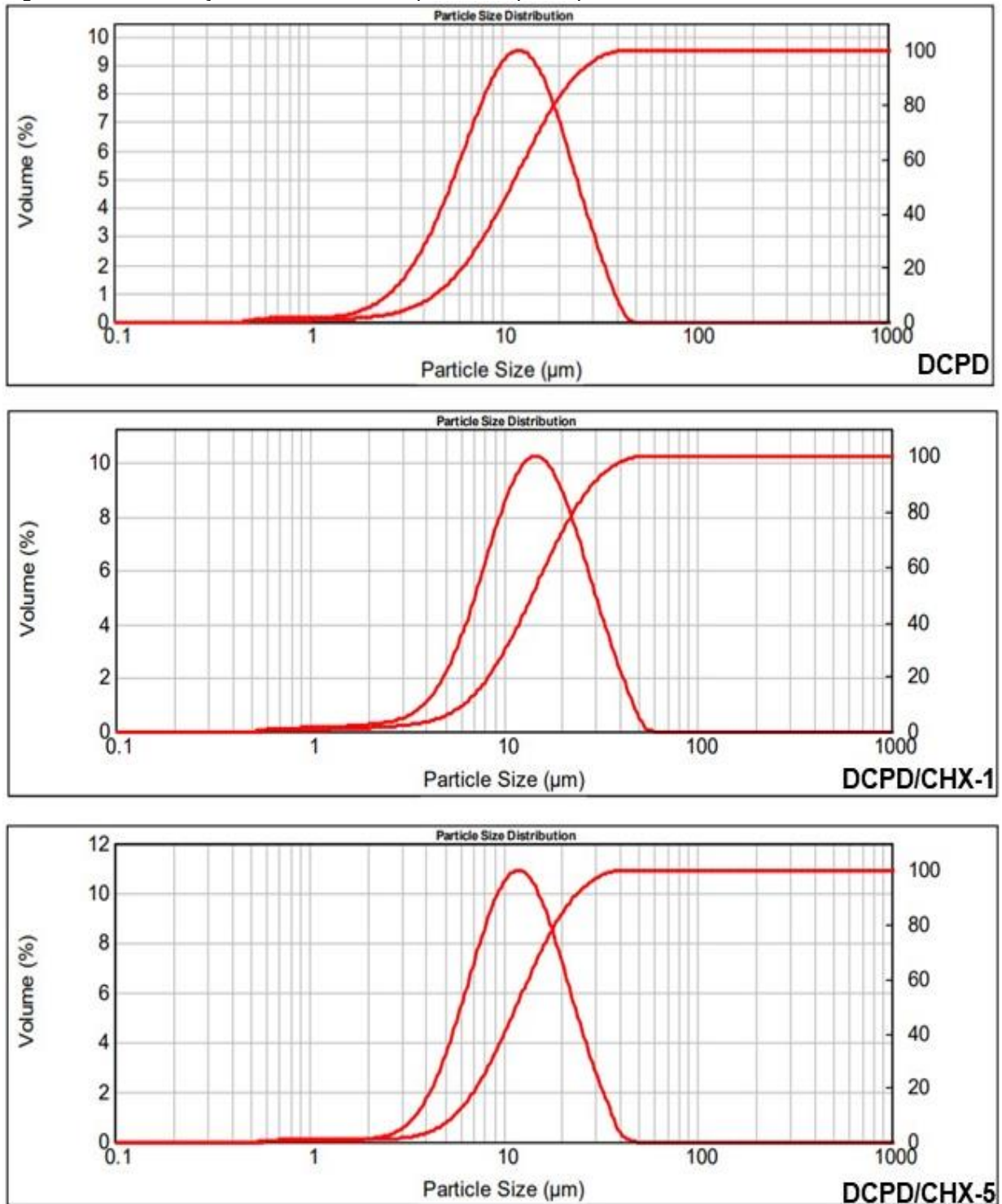
Grupo experimental	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
DCPD	0,08	2,83	0,11
DCPD/CHX-1	5,48	3,30	2,62
DCPD/CHX-5	3,50	3,04	1,13

Fonte: a autora.

5.4 ESPALHAMENTO DE LUZ LASER

As distribuições de tamanho das partículas estão apresentadas na Figura 5.5. Por meio desta análise foi possível mensurar os valores de medianas (D_{50}) do diâmetro das partículas sintetizadas. Para o grupo DCPD, obteve-se valor de 11 μm , para o grupo DCPD/CHX-1 valor de 14, μm , e para o grupo DCPD/CHX-5 valor de 12 μm . Também foram mensuradas as áreas superficiais para cada amostra, a saber: 0,73 m^2/g para DCPD, 0,57 m^2/g para DCPD/CHX-1 e 0,63 m^2/g para DCPD/CHX-5.

Figura 5.5 – Distribuições de tamanho das partículas por espalhamento de luz laser

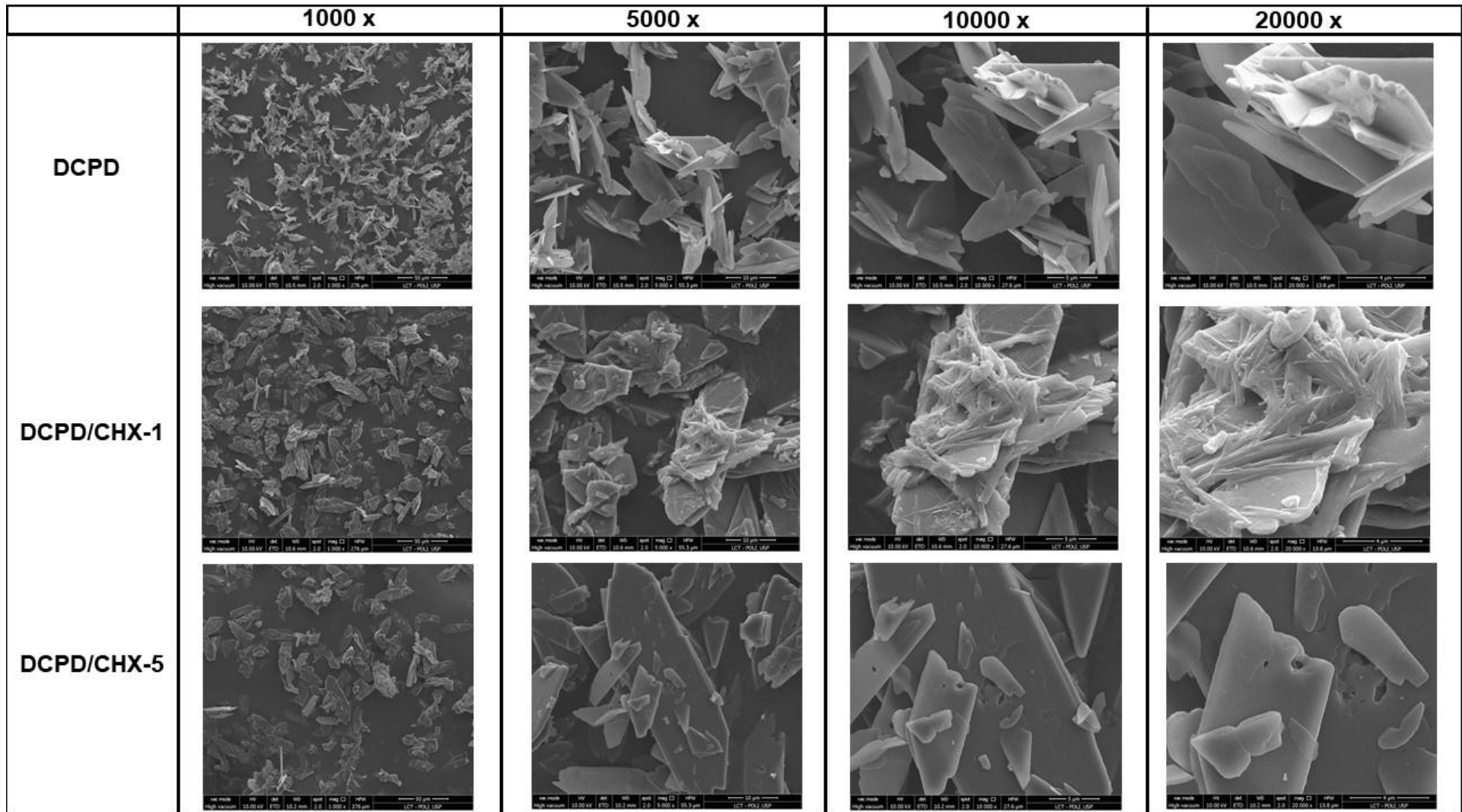


Fonte: a autora.

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A partir das imagens obtidas pela análise por microscopia eletrônica de varredura (Figura 5.6), foi possível observar que os três grupos de partículas sintetizadas apresentam morfologias distintas entre si. Na amostra correspondente ao grupo DCPD observa-se partículas em forma de placas. Na amostra com partículas que foram carregadas com clorexidina a 1% foi possível observar que houve incorporação da CHX ao DCPD, pela presença de partículas de clorexidina em menor tamanho e com formato mais arredondado sobre as placas de DCPD. As imagens obtidas a partir dos aumentos de 10.000X mostram com maior clareza o entrelaçamento das partículas de clorexidina sobre a superfície da placa de DCPD (DCPD/CHX-1). Embora também haja na amostra de partículas carregadas com clorexidina a 5% algumas partículas em menor tamanho adsorvidas sobre à superfície da placa, a morfologia das partículas deste grupo assemelha-se mais com as partículas de DCPD do que DCPD/CHX-1, tendo em vista o predomínio de partículas em forma de placas. O aumento em 10.000X evidencia que as partículas de clorexidina concentram-se majoritariamente na amostra de DCPD/CHX-1. É válido ressaltar que na imagem correspondente ao aumento de 20.000X da amostra DCPD/CHX-5, observa-se presença de orifícios nas placas, os quais podem ser sugestivos de degradação, possivelmente ocasionada pelo álcool etílico absoluto utilizado durante o processo de síntese neste grupo.

Figura 5.6 - Imagens das partículas obtidas através do microscópio eletrônico de varredura em aumentos de 1000 vezes, 5000 vezes, 10000 vezes e 20000 vezes



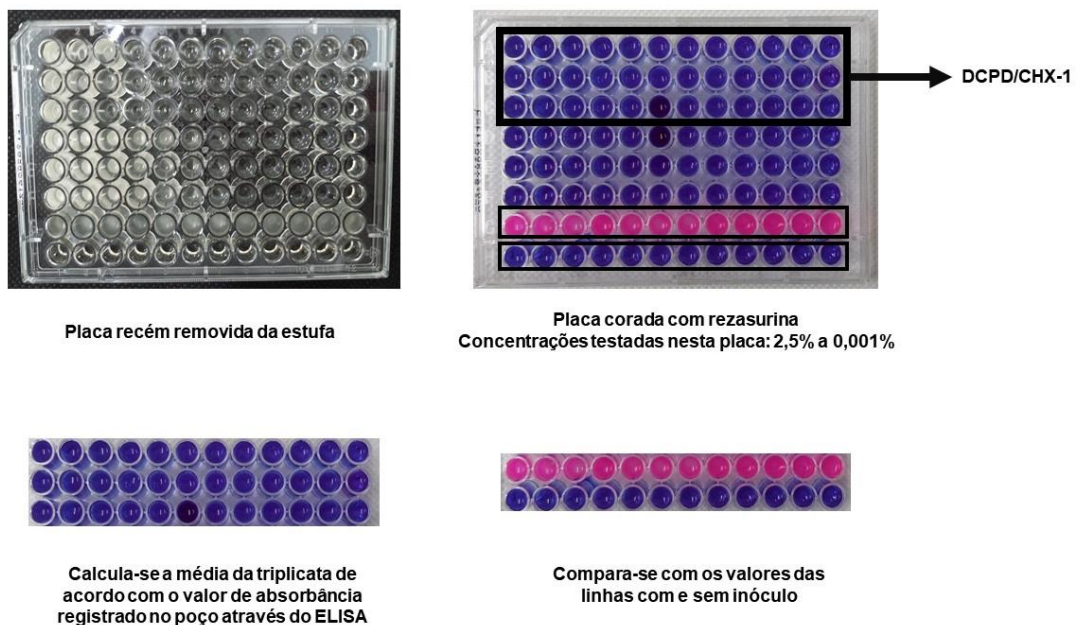
Fonte: a autora.

5.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Neste ensaio, os valores de absorvância das partículas contidas em cada poço foram comparados com os valores de absorvância dos poços das linhas controle positivo e negativo (poços preenchidos apenas com meio de cultura e poços preenchidos com meio e inóculo bacteriano, respectivamente) (Figura 5.7).

Considerando o critério estatístico, o valor de CIM obtido para o grupo experimental DCPD/CHX-1 foi 0,0038 mg/mL. Para DCPD não foi encontrado o valor de CIM, pois, além deste grupo não ter sido capaz de inibir o crescimento da bactéria *S. mutans*, concentrações de partículas iguais e inferiores a 3,90 mg/mL favoreceram o crescimento bacteriano. O grupo DCPD/CHX-5 apresentou resultado inconclusivo, uma vez que até 7,81 mg/mL os resultados das partículas permaneceram diferentes do meio com e sem bactéria, porém a partir de 3,90 mg/mL as linhas com as partículas continuaram diferentes do meio sem bactéria, mas iguais ao meio com *S. mutans*.

Figura 5.7 – Imagem exemplificando a análise dos resultados do ensaio de CIM.



Fonte: a autora.

Quadro 5.1 – Resumo dos resultados

FTIR	Análise Elementar	Espalhamento de luz laser
<p>DCPD/CHX: Apresentou bandas de absorção em 1551 cm^{-1} e 1497 cm^{-1}, características da presença de clorexidina</p>	<p>Apontou para um maior percentual de carbono em DCPD/CHX-1 (5,48%) comparado à DCPD/CHX-5 (3,50%)</p>	<p>A incorporação da CHX não alterou o diâmetro nem a área superficial, porém discreto aumento no tamanho da partícula foi visto em DCPD/CHX-1 ($14\text{ }\mu\text{m}$) comparado ao DCPD/CHX-5 ($12\text{ }\mu\text{m}$)</p>
MEV	CIM	UV-Vis
<p>DCPD: placas DCPD/CHX-1: grande quantidade de partículas arredondadas e em menor tamanho sobre as placas DCPD/CHX-5: Visível semelhança ao grupo DCPD</p>	<p>DCPD: Não inibe o <i>S. mutans</i> DCPD/CHX-1: Inibe mesmo em baixas concentrações $0,0038\text{ mg/mL}$ DCPD/CHX-5: Resultado inconclusivo</p>	<p>DCPD/CHX-1: 11,32% de clorexidina a cada 1 g de DCPD DCPD/CHX-5: Não foi possível quantificar</p>

Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar partículas de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) carregadas com diacetato de clorexidina (CHX, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10} \cdot 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$). Ortofosfatos de cálcio já estão consagrados na literatura científica como alternativa para adição em matrizes resinosas, tendo em vista a comprovada recuperação mineral identificada em regiões mais profundas quando comparado com materiais liberadores de flúor (40, 41). A presente proposta está associada ao desenvolvimento de uma partícula DCPD/CHX que apresente concomitante atividade antimicrobiana e propriedade remineralizadora.

Trabalhos prévios envolvendo a síntese de partículas de ACP/CHX já foram realizados (26, 49) e resultados promissores foram obtidos. O ensaio de liberação de íons cálcio e fosfato expresso em ambos os estudos evidencia o potencial remineralizador encontrado na partícula, através da rápida liberação observada nos primeiros dias que se reduz e estabiliza nas semanas seguintes. A associação da clorexidina em partículas de ACP, além de exibir atividade antibacteriana contra o *S.mutans* (26), foi capaz de inibir a ação das enzimas metaloproteinases (49). A morfologia observada em microscópio eletrônico de transmissão revelou que a clorexidina adsorvida (49) ou encapsulada (26) possui morfologia esférica.

A proposta de associação da CHX ao DCPD foi baseada na vantagem em relação à sua maior solubilidade comparada ao ACP, o que possivelmente acarretaria em uma maior liberação de íons promovida por este material (56). O fato de apresentar índice de refração (1,54-1,55) próximo ao da matriz orgânica de BisGMA/TEGDMA normalmente presente nos compósitos (1,50/1,56) também torna interessante a adição dessa partícula em matrizes resinosas, tendo em vista que a sua presença provavelmente não afetaria a passagem de luz emitida pelos aparelhos fotopolimerizadores (51). O processo de incorporação da clorexidina também difere dos demais estudos já publicados na literatura (26, 49), tendo em vista a incorporação do diacetato clorexidina nas partículas de DCPD nas concentrações de 1% e 5%. A justificativa para o delineamento de ambos os grupos residiu na impossibilidade de diluição em água de quantidades superiores a 1% de CHX, comprovada durante os ensaios experimentais. A escolha do segundo grupo utilizando a concentração de

CHX a 5% foi baseada em informações fornecidas pelo fabricante (Sigma-Aldrich), o qual apontou a possibilidade de diluição máxima de 5% em álcool etílico absoluto.

A clorexidina apresenta excelente potencial antimicrobiano e, devido a sua ação sob as bactérias de importância odontológica, sobretudo o *Streptococcus mutans*, ganhou grande destaque dentre os antimicrobianos disponíveis (18, 26, 33, 50). A sua associação a outras partículas, tais como sílica mesoporosa (33), montmorilonita (18), fluoreto (50) e fosfato de cálcio, possibilita associar este efeito à liberação de cálcio para remineralização (26, 49), e garantir uma liberação mais prolongada e gradual da CHX (33), o que é extremamente desejável em materiais odontológicos.

A presença da CHX nas partículas DCPD/CHX foi confirmada pelo método de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), bem como pela análise elementar. Os resultados obtidos pelo FTIR para as partículas DCPD/CHX-1 e DCPD/CHX-5 mostraram o aparecimento de novas bandas de absorção em 1551 cm^{-1} e 1497 cm^{-1} , em que os valores de picos podem ser atribuídos às ligações C=N ou C-N-C, e referem-se à incorporação da clorexidina nessas partículas. Os resultados do presente estudo corroboram com os achados de Cai e colaboradores, os quais verificaram bandas de absorção na mesma faixa, características das ligações C=N ou C-N-C presentes na clorexidina (49). Essas bandas não foram encontradas nas partículas de DCPD puro, o que confirma a presença da CHX nos grupos DCPD/CHX-1 e DCPD/CHX-5 (Figuras 5.1 a 5.4). Por meio dos resultados da análise elementar, também foi possível identificar a presença da CHX nas partículas sintetizadas, confirmada pelo maior percentual de carbono (5,48% em DCPD/CHX-1, seguido de 3,50% em DCPD/CHX-5).

A partir do método de espalhamento de luz laser, foi possível observar que a incorporação da clorexidina ao DCPD não alterou significativamente o diâmetro das partículas e a área superficial. De maneira geral, embora um discreto aumento tenha sido observado nos valores de medianas do diâmetro nas partículas DCPD/CHX (14 μm e 12 μm) comparado as partículas de DCPD puro (11 μm), as curvas de distribuições (figura 5.5) mostram-se semelhantes. A área superficial mostrou-se ligeiramente maior quanto menor o tamanho de partícula entre os grupos, mas essas pequenas variações não foram consideradas significativas. Sabe-se que a maior área superficial das partículas é uma vantagem, pois favorece a liberação de íons (108, 109). Não é plausível supor que as partículas de DCPD sem adição de clorexidina

poderiam ser mais eficientes, primeiro porque não devemos estimar o potencial remineralizador das partículas carregadas com clorexidina com base nesses achados, e segundo porque o aumento apontado em DCPD não é significativo, tendo em vista que as três amostras apresentaram resultados muito semelhantes.

As partículas DCPD/CHX-1 apresentaram efetiva atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*. A concentração de 0,0038 mg/mL foi determinada como mínima inibitória do crescimento bacteriano. Embora para o grupo DCPD/CHX-5 não tenha sido possível identificar precisamente o valor característico a CIM, observou-se tendência ao crescimento bacteriano a partir da concentração de 7,81 mg/mL. Conforme esperado, as partículas de DCPD puro não exibiram atividade antimicrobiana e concentrações a partir de 3,90 mg/mL favoreceram o crescimento do *S. mutans*. Os dados do presente estudo corroboram com estudos prévios (26, 110, 111) que demonstraram que o DCPD não apresenta potencial para impedir a adesão bacteriana. Quando incorporado a um compósito, o DCPD funcionalizado com TEGDMA pode indiretamente contribuir para a melhoria da rugosidade superficial do material e, conseqüentemente, para a menor adesão bacteriana (110). Entretanto, não existe qualquer mecanismo de ação inerente ao DCPD que favoreça a inatividade e/ou morte bacteriana. Para nanopartículas de ACP carregadas com gluconato de CHX a 20%, a concentração considerada mínima inibitória foi superior (0,0250 mg/mL) (26) à CIM encontrada neste trabalho (0,0038 mg/mL) para o grupo de partículas DCPD carregadas com diacetato de clorexidina a 1%. As diferenças relacionadas aos distintos processos de síntese das partículas limitam a direta comparação entre os resultados; porém, os achados do presente estudo demonstram que a atividade antibacteriana parecer ser mais efetiva para a associação entre DCPD e 13 % em massa de CHX.

As características morfológicas das partículas foram exploradas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). De maneira geral, foi possível identificar em todos os grupos a presença de placas finas características das partículas de DCPD já observadas em estudos anteriores (46, 47, 51). Partículas menores adsorvidas sobre as placas foram observadas de modo mais expressivo no grupo de partículas em que o DCPD foi associado à 1% de CHX. Os resultados qualitativos relacionados à morfologia são coerentes e compatíveis com os achados obtidos pelos demais métodos, os quais apontam uma maior incorporação do antimicrobiano nas partículas DCPD/CHX-1. No entanto, futuras análises por espectroscopia por energia dispersiva

(EDS) poderão confirmar quais elementos químicos estão presentes na amostra e, conseqüentemente, comprovar a ocorrência da adsorção da CHX ao DCPD.

Especula-se que o álcool etílico absoluto utilizado como solvente durante o processo de síntese de partículas DCPD/CHX-5 possa ter dissolvido grande parte da clorexidina, restando menor quantidade de partículas para se ligarem ao DCPD. Em contrapartida, a água parece não ser solvente tão potente quanto o álcool e, dessa forma, permitiu que um maior número de partículas de CHX estivesse disponível para ser incorporado ao DCPD. Esta possivelmente é a razão pela qual a maior adição de clorexidina no álcool etílico absoluto não resultou em maior incorporação à partícula.

A natureza da interação entre DCPD e diacetato de clorexidina ainda não foi investigada e esclarecida. No entanto, estudos prévios já especularam a natureza da interação entre ACP e gluconato clorexidina (49), bem como entre hidroxiapatita (HAp) sintética e gluconato clorexidina (68). Especula-se que em concentrações mais altas (1,0 a 4,5%) exista uma reação química (quimissorção) como sendo a responsável pela interação entre HAp e CHX, enquanto em baixas concentrações (0,2 a 0,45%) haja apenas uma adsorção, o que torna o produto da reação entre CHX e HAp mais solúvel em baixas concentrações, uma vez que em concentrações elevadas há maior retenção (112). Assumindo similaridade entre as interações e extrapolando esses dados para a reação entre diacetato de CHX e DCPD, essa interação seria vantajosa, uma vez que baixas concentrações foram efetivas para inibir o crescimento bacteriano, e uma maior solubilidade da partícula seria benéfica para garantir atividade antibacteriana e capacidade remineralizante. A extrapolação parece ser válida, tendo em vista a similaridade entre diacetato e gluconato de CHX e a capacidade de ambas as apresentações do antimicrobiano exibirem liberação de CHX quando associado ao ACP (49), bem como ao fato do DCPD ser considerado uma boa fonte de íons para a remineralização (56).

O êxito obtido na síntese de partículas DPCD/CHX-1, as quais exibiram efetiva atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* enfatiza o potencial de aplicação clínica deste estudo *in vitro*, e os resultados obtidos com a caracterização nos permitiram maior compreensão sobre o comportamento do complexo DCPD/CHX. O processo de síntese e funcionalização estabelecido constitui um método reprodutível. Análises futuras para avaliar o potencial de liberação de íons das partículas sintetizadas são essenciais para dar seguimento às etapas de avaliação do

efeito da incorporação dessas partículas sobre as propriedades remineralizantes, antibacterianas, físico-químicas e biológicas de *liners* e/ou compósitos restauradores experimentais. Apesar de muito promissores, os estudos que envolvem a liberação de compostos com ação antibacteriana e íons para estimular a precipitação mineral ainda apontam como limitação o curto período de ação e, por essa razão, é vital verificar as taxas de liberação dos compostos no material e, a depender dos resultados, buscar mecanismos que possam prologar o referido efeito.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados foi possível concluir que:

- Partículas DCPD/CHX foram sintetizadas e caracterizadas, e a presença da CHX nas partículas DCPD/CHX foi confirmada quimicamente pelo método de FTIR e pela análise elementar.
- As imagens de MEV obtidas para as amostras do grupo DCPD/CHX-1 sugerem presença de moléculas de clorexidina (visualizadas como partículas em formato esférico) adsorvidas à superfície do DCPD (visualizadas como partículas em formato de placa).
- Apenas as partículas DCPD/CHX-1 apresentaram efetiva atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*.
- Partículas do grupo DCPD/CHX-5, não obtiveram êxito no processo de incorporação da clorexidina.

REFERÊNCIAS¹

1. Wen PYF, Chen MX, Zhong YJ, Dong QQ, Wong HM. Global Burden and inequality of dental caries, 1990 to 2019. *J Dent Res*. 2022 Apr;101(4):392-9. doi: 10.1177/002203452111056247.
2. Pitts NB, Mayne C. A Global Consensus for achieving a dental cavity-free future 2021. [homepage on the Internet]. [citado 22 jan 2022]. Disponível em: https://kclpure.kcl.ac.uk/portal/files/149747521/A_Global_Consensus_for_achieving_a_cavity_free_future.pdf.
3. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 May 25;3:17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.
4. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis*. 2003;9 Suppl 1:16-22. doi: 10.1034/j.1601-0825.9.s1.4.x.
5. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*. 2006 Oct;85(10):878-87. doi: 10.1177/154405910608501002.
6. Nascimento GG, Correa MB, Opdam N, Demarco FF. Do clinical experience time and postgraduate training influence the choice of materials for posterior restorations? Results of a survey with Brazilian general dentists. *Braz Dent J*. 2013 Nov-Dec;24(6):642-6. doi: 10.1590/0103-6440201302361.
7. Askar H, Krois J, Göstemeyer G, Bottenberg P, Zero D, Banerjee A, et al. Secondary caries: what is it, and how it can be controlled, detected, and managed? *Clin Oral Investig*. 2020 May;24(5):1869-76. doi: 10.1007/s00784-020-03268-7.
8. Beck F, Lettner S, Graf A, Bitriol B, Dumitrescu N, Bauer P, et al. Survival of direct resin restorations in posterior teeth within a 19-year period (1996-2015): A meta-analysis of prospective studies. *Dent Mater*. 2015 Aug;31(8):958-85. doi: 10.1016/j.dental.2015.05.004.
9. Worthington HV, Khangura S, Seal K, Mierzwinski-Urban M, Veitz-Keenan A, Sahrman P, et al. Direct composite resin fillings versus amalgam fillings for permanent posterior teeth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 Aug 13;8(8):CD005620. doi: 10.1002/14651858.CD005620.pub3.

¹ De acordo com o estilo Vancouver.

10. Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater.* 2012 Jan;28(1):87-101. doi: 10.1016/j.dental.2011.09.003.
11. Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater.* 2011 Jan;27(1):29- 38. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.020.
12. Eltahlah D, Lynch CD, Chadwick BL, Blum IR, Wilson NHF. An update on the reasons for placement and replacement of direct restorations. *J Dent.* 2018 May;72:1-7. doi: 10.1016/j.jdent.2018.03.001.
13. Thomas RZ, van der Mei HC, van der Veen MH, de Soet JJ, Huysmans MC. Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Feb;23(1):7-13. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00381.x.
14. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater.* 2015 Nov;31(11):e247-77. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.001.
15. Chen MH. Update on dental nanocomposites. *J Dent Res.* 2010 Jun;89(6):549- 60. doi: 10.1177/0022034510363765.
16. Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater.* 2009 Aug;25(8):1001-6. doi: 10.1016/j.dental.2009.02.009.
17. Zhang K, Zhang N, Weir MD, Reynolds MA, Bai Y, Xu HHK. Bioactive dental composites and bonding agents having remineralizing and antibacterial characteristics. *Dent Clin North Am.* 2017 Oct;61(4):669-87. doi: 10.1016/j.cden.2017.05.002.
18. Boaro LCC, Campos LM, Varca GHC, Dos Santos TMR, Marques PA, Sugii MM, et al. Antibacterial resin-based composite containing chlorhexidine for dental applications. *Dent Mater.* 2019 Jun;35(6):909-18. doi: 10.1016/j.dental.2019.03.004.
19. Antonucci JM, Zeiger DN, Tang K, Lin-Gibson S, Fowler BO, Lin NJ. Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications. *Dent Mater.* 2012 Feb;28(2):219-28. doi: 10.1016/j.dental.2011.10.004.
20. Neves JG, Marcato PD, de Paula E Silva FWG, Mantovani CPT, Prado HS, Aires CP et al. Synthesis and characterization of an experimental primer containing chitosan nanoparticles - Effect on the inactivation of metalloproteinases, antimicrobial activity and adhesive strength. *Arch Oral Biol.* 2021 Jul;127:105148. doi: 10.1016/j.archoralbio.2021.105148.

21. Skrtic D, Hailer AW, Takagi S, Antonucci JM, Eanes ED. Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate/methacrylate composites in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel. *J Dent Res*. 1996 Sep;75(9):1679-86. doi: 10.1177/00220345960750091001.
22. Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. *J Dent Res*. 2012 Oct;91(10):979-84. doi: 10.1177/0022034512458288.
23. Lung CY, Sarfraz Z, Habib A, Khan AS, Matinlinna JP. Effect of silanization of hydroxyapatite fillers on physical and mechanical properties of a bis-GMA based resin composite. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016 Feb;54:283-94. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.09.033.
24. Liang K , Xiao S , Shi W , Li J , Yang X , Gao Y et al. 8DSS-promoted remineralization of demineralized dentin in vitro. *J Mater Chem B*. 2015 Sep 7;3(33):6763-72. doi: 10.1039/c5tb00764j.
25. Balbinot GS, Leitune VCB, Ogliari FA, Collares FM. Niobium silicate particles promote in vitro mineral deposition on dental adhesive resins. *J Dent*. 2020 Oct;101:103449. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103449.
26. Yang Y, Xu Z, Guo Y, Zhang H, Qiu Y, Li J, et al. Novel core-shell CHX/ACP nanoparticles effectively improve the mechanical, antibacterial and remineralized properties of the dental resin composite. *Dent Mater*. 2021 Apr;37(4):636-47. doi: 10.1016/j.dental.2021.01.007.
27. Zhou W, Peng X, Zhou X, Weir MD, Melo MAS, Tay FR et al. In vitro evaluation of composite containing DMAHDM and calcium phosphate nanoparticles on recurrent caries inhibition at bovine enamel-restoration margins. *Dent Mater*. 2020 Oct;36(10):1343-55. doi: 10.1016/j.dental.2020.07.007.
28. Melo MA, Cheng L, Weir MD, Hsia RC, Rodrigues LK, Xu HH. Novel dental adhesive containing antibacterial agents and calcium phosphate nanoparticles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013 May;101(4):620-9. doi: 10.1002/jbm.b.32864.
29. Zanatta FB Rösing CK. (PDF) Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. 2007 . [homepage on the Internet]. [citado 28 out 2022] Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/290798560_Clorexidina_Mecanismo_de_acao_e_evidencias_atuais_de_sua_eficacia_no_contexto_do_biofilme_supragengival.
30. Van Strydonck DA, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2012 Nov;39(11):1042-55. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01883.x.

31. Costa EMMdB, Paraíba UEd, Barbosa AS, Paraíba UEd, Arruda TAd, Paraíba UEd, et al. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2010 Jun;46:175-80. doi:10.1590/S1676-24442010000300004
32. Privitera GP, Costa AL, Brusaferrero S, Chirletti P, Crosasso P, Massimetti G, et al. Skin antiseptics with chlorhexidine versus iodine for the prevention of surgical site infection: A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control.* 2017 Feb 1;45(2):180-9. doi: 10.1016/j.ajic.2016.09.017.
33. Zhang JF, Wu R, Fan Y, Liao S, Wang Y, Wen ZT, et al. Antibacterial dental composites with chlorhexidine and mesoporous silica. *J Dent Res.* 2014 Dec;93(12):1283-9. doi: 10.1177/0022034514555143.
34. Cheng YJ, Zeiger DN, Howarter JA, Zhang X, Lin NJ, Antonucci JM, et al. In situ formation of silver nanoparticles in photocrosslinking polymers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011 Apr;97(1):124-31. doi: 10.1002/jbm.b.31793.
35. Kasraei S, Sami L, Hendi S, Alikhani MY, Rezaei-Soufi L, Khamverdi Z. Antibacterial properties of composite resins incorporating silver and zinc oxide nanoparticles on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Restor Dent Endod.* 2014 May;39(2):109-14. doi: 10.5395/rde.2014.39.2.109.
36. Makvandi P, Gu JT, Zare EN, Ashtari B, Moeini A, Tay FR, et al. Polymeric and inorganic nanoscopic antimicrobial fillers in dentistry. *Acta Biomater.* 2020 Jan 1;101:69-101. doi: 10.1016/j.actbio.2019.09.025.
37. Rodrigues MC, Rolim WR, Viana MM, Souza TR, Gonçalves F, Tanaka CJ, et al. Biogenic synthesis and antimicrobial activity of silica-coated silver nanoparticles for esthetic dental applications. *J Dent.* 2020 May;96:103327. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103327.
38. Stenhagen ISR, Rukke HV, Dragland IS, Kopperud HM. Effect of methacrylated chitosan incorporated in experimental composite and adhesive on mechanical properties and biofilm formation. *Eur J Oral Sci.* 2019 Feb;127(1):81-88. doi: 10.1111/eos.12584.
39. Sahariah P, Másson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules.* 2017 Nov 13;18(11):3846-68. doi: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
40. Pinto MFC, Alania Y, Natale LC, Magalhães AC, Braga RR. Effect of Bioactive Composites on Microhardness of Enamel Exposed to Carious Challenge. *Eur J Prosthodont Restor Dent.* 2018 Aug 30;26(3):122-8. doi: 10.1922/EJPRD_01781Pinto07.

41. Langhorst SE, O'Donnell JN, Skrtic D. In vitro remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. *Dent Mater.* 2009 Jul;25(7):884-91. doi: 10.1016/j.dental.2009.01.094.
42. Meyer-Lueckel H, Wierichs RJ, Schellwien T, Paris S. Remineralizing efficacy of a CPP-ACP cream on enamel caries lesions in situ. *Caries Res.* 2015;49(1):56-62. doi: 10.1159/000363073.
43. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent advances in remineralization Therapies for Caries Lesions. *Adv Dent Res.* 2018 Feb;29(1):55-9. doi: 10.1177/0022034517740124.
44. Taha AA, Patel MP, Hill RG, Fleming PS. The effect of bioactive glasses on enamel remineralization: A systematic review. *J Dent.* 2017 Dec;67:9-17. doi: 10.1016/j.jdent.2017.09.007.
45. Seppä L. Fluoride varnishes in caries prevention. *Med Princ Pract.* 2004 NovDec;13(6):307-11. doi: 10.1159/000080466.
46. Natale LC, Rodrigues MC, Alania Y, Chiari MDS, Boaro LCC, Cotrim M, Vega O, Braga RR. Mechanical characterization and ion release of bioactive dental composites containing calcium phosphate particles. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2018 Aug;84:161-7. doi: 10.1016/j.jmbbm.2018.05.022.
47. Alania Y, Chiari MD, Rodrigues MC, Arana-Chavez VE, Bressiani AH, Vichi FM, et al. Bioactive composites containing TEGDMA-functionalized calcium phosphate particles: Degree of conversion, fracture strength and ion release evaluation. *Dent Mater.* 2016 Dec;32(12):e374-e381. doi: 10.1016/j.dental.2016.09.021.
48. Chiari MD, Rodrigues MC, Xavier TA, de Souza EM, Arana-Chavez VE, Braga RR. Mechanical properties and ion release from bioactive restorative composites containing glass fillers and calcium phosphate nano-structured particles. *Dent Mater.* 2015 Jun;31(6):726-33. doi: 10.1016/j.dental.2015.03.015.
49. Cai X, Han B, Liu Y, Tian F, Liang F, Wang X. Chlorhexidine-Loaded Amorphous Calcium Phosphate Nanoparticles for Inhibiting Degradation and Inducing Mineralization of Type I Collagen. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017 Apr 19;9(15):12949-12958. doi: 10.1021/acsami.6b14956.
50. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, et al. Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine. *Dent Mater.* 2012 May;28(5):573-83. doi: 10.1016/j.dental.2012.01.006.
51. Braga RR. Calcium phosphates as ion-releasing fillers in restorative resin-based materials. *Dent Mater.* 2019 Jan;35(1):3-14. doi: 10.1016/j.dental.2018.08.288.

52. Wang X, Yu Y, Ji L, Geng Z, Wang J, Liu C. Calcium phosphate-based materials regulate osteoclast-mediated osseointegration. *Bioact Mater*. 2021 May 12;6(12):4517-30. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.003.
53. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002 Sep 2;41(17):3130-46. doi: 10.1002/1521-3773(20020902)41:173.O.CO;2-1.
54. Rafeek AD, Choi G, Evans LA. Controlled synthesis of dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) from metastable solutions: insights into pathogenic calcification. *J Mater Sci Mater Med*. 2021 Nov 24;32(12):142. doi: 10.1007/s10856-021-06617-4.
55. Epple M, Ganesan K, Heumann R, Klesing J, Kovtun A, Neumann S, et al. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *J Mater Chem*. 2010;20,18-23. doi: 10.1039/B910885H
56. Wang L, Nancollas GH. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chem Rev*. 2008 Nov;108(11):4628-69. doi: 10.1021/cr0782574.
57. Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates (CaPO₄): Occurrence and properties. *Morphologie*. 2017 Sep;101(334):125-42. doi: 10.1016/j.morpho.2017.03.007.
58. Kusuma Eriwati Y, Putriani D, Geraldine K, Hermansyah H. Fluoride and calcium release from peppermint-flavored fluoride varnish containing dicalciumphosphate-dihydrate coated with xylitol. *Saudi Dent J*. 2022 Jan;34(1):68-73. doi: 10.1016/j.sdentj.2021.09.021.
59. Wefel JS, Harless JD. The use of saturated DCPD in remineralization of artificial caries lesions in vitro. *J Dent Res*. 1987 Nov;66(11):1640-3. doi: 10.1177/00220345870660110701.
60. Gandolfi MG, Zamparini F, Degli Esposti M, Chiellini F, Fava F, Fabbri P, et al. Highly porous polycaprolactone scaffolds doped with calcium silicate and dicalcium phosphate dihydrate designed for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Sep;102:341-61. doi: 10.1016/j.msec.2019.04.040.
61. Alania Y, Natale LC, Nesadal D, Vilela H, Magalhães AC, Braga RR. In vitro remineralization of artificial enamel caries with resin composites containing calcium phosphate particles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Jul;107(5):1542- 50. doi: 10.1002/jbm.b.34246.
62. Reddy S, Prasad MG, Kaul S, Satish K, Kakarala S, Bhowmik N. Efficacy of 0.2% tempered chlorhexidine as a pre-procedural mouth rinse: A clinical study. *J Indian Soc Periodontol*. 2012 Apr;16(2):213-7. doi: 10.4103/0972-124X.99264.

63. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent*. 2020 Dec;103:103497. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103497.
64. do Amorim CV, Aun CE, Mayer MP. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res*. 2004 Jul-Sep;18(3):242-6. doi: 10.1590/s1806-83242004000300012.
65. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res*. 2007 Jan;86(1):90-4. doi: 10.1177/154405910708600115.
66. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975 Jun;54 Spec No B:B57-62. doi: 10.1177/00220345750540022601.
67. Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira Cda C, et al. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1249-52. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.003.
68. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater*. 2010 Aug;26(8):779-85. doi: 10.1016/j.dental.2010.04.002.
69. Cousido MC, Tomás Carmona I, García-Caballero L, Limeres J, Alvarez M, Diz P. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig*. 2010 Aug;14(4):397-402. doi: 10.1007/s00784-009-0320-2.
70. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J Dent Res*. 1990 Mar;69(3):861-4. doi: 10.1177/00220345900690030601.
71. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, et al. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater*. 2012 May;28(5):561-72. doi: 10.1016/j.dental.2012.01.005.
72. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dent Mater*. 2003 Jun;19(4):313-9. doi: 10.1016/s0109-5641(02)00060-x.
73. Wu J, Zhou H, Weir MD, Melo MA, Levine ED, Xu HH. Effect of dimethylaminohexadecyl methacrylate mass fraction on fracture toughness and antibacterial properties of CaP nanocomposite. *J Dent*. 2015 Dec;43(12):1539-46. doi: 10.1016/j.jdent.2015.09.004.

74. Li F, Wang P, Weir MD, Fouad AF, Xu HH. Evaluation of antibacterial and remineralizing nanocomposite and adhesive in rat tooth cavity model. *Acta Biomater.* 2014 Jun;10(6):2804-13. doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.033.
75. Ge Y, Wang S, Zhou X, Wang H, Xu HH, Cheng L. The Use of Quaternary Ammonium to Combat Dental Caries. *Materials (Basel).* 2015 Jun;8(6):3532-49. doi: 10.3390/ma8063532.
76. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials.* 2006 Jul;27(21):3995-4002. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.003.
77. Zhang N, Ma J, Melo MA, Weir MD, Bai Y, Xu HH. Protein-repellent and antibacterial dental composite to inhibit biofilms and caries. *J Dent.* 2015 Feb;43(2):225-34. doi: 10.1016/j.jdent.2014.11.008.
78. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine.* 2020 Apr 17;15:2555-2562. doi: 10.2147/IJN.S246764. 72
79. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol.* 2010 Nov 15;144(1):51-63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012.
80. Spencer P, Ye Q, Misra A, Goncalves SE, Laurence JS. Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *J Dent Res.* 2014 Dec;93(12):1243-9. doi: 10.1177/0022034514550039.
81. Wang X, Du Y, Luo J. Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. *Nanotechnology.* 2008 Feb 13;19(6):065707. doi: 10.1088/0957-4484/19/6/065707.
82. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res.* 2019;53(3):284-95. doi: 10.1159/000493031.
83. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Res.* 2011;45(5):460-8. doi: 10.1159/000331207.
84. Byeon SM, Lee MH, Bae TS. The effect of different fluoride application methods on the remineralization of initial carious lesions. *Restor Dent Endod.* 2016 May;41(2):121-9. doi: 10.5395/rde.2016.41.2.121.
85. Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res.* 2010;24 Suppl 1:9-17. doi: 10.1590/s1806-83242010000500003.

86. Ministério da Saúde. Guia de recomendações para o uso de fluoretos no Brasil 2009. [homepage on the Internet]. [citado 28 out 2022]. Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/guia_fluoretos.pdf
87. Lacerda APAG, Oliveira NA, Pinheiro HHC, Assis KML, Cury JA. Water fluoridation in the ten largest municipalities of the state of Tocantins, Brazil. *Cien Saude Colet*. 2020 Mar;25(4):1507-18. doi: 10.1590/1413-81232020254.17722018.
88. Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J*. 2004;15(3):167-74. doi: 10.1590/s0103-64402004000300001.
89. 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*. 2007 Mar;23(3):343-62. doi: 10.1016/j.dental.2006.01.022.
90. Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, et al. Strong nanocomposites with Ca, PO(4), and F release for caries inhibition. *J Dent Res*. 2010 Jan;89(1):19-28. doi: 10.1177/0022034509351969.
91. Skrtic D, Hailer AW, Takagi S, Antonucci JM, Eanes ED. Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate/methacrylate composites in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel. *J Dent Res*. 1996 Sep;75(9):1679-86. doi: 10.1177/00220345960750091001.
92. Weir MD, Chow LC, Xu HH. Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. *J Dent Res*. 2012 Oct;91(10):979-84. doi: 10.1177/0022034512458288.
93. Chow CK, Wu CD, Evans CA. In vitro properties of orthodontic adhesives with fluoride or amorphous calcium phosphate. *Int J Dent*. 2011;2011:583521. doi: 10.1155/2011/583521.
94. Grobler SR, Majeed A, Moola MH, Rossouw RJ, van Wyk Kotze T. In vivo Spectrophotometric Assessment of the Tooth Whitening Effectiveness of Nite White 10% with Amorphous Calcium Phosphate, Potassium Nitrate and Fluoride, Over a 6- month Period. *Open Dent J*. 2011 Mar 2;5:18-23. doi: 10.2174/1874210601105010018.
95. Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res*. 2012 Sep;24(2):41-7. doi: 10.1177/0022034512454294.
96. Reynolds EC. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Adv Dent Res*. 2009;21(1):25-9. doi: 10.1177/0895937409335619.

97. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate modified glass ionomer cement attenuates demineralization and modulates biofilm composition in dental caries. *Dent Mater J*. 2021 Jan 31;40(1):84-93. doi: 10.4012/dmj.2019-325.
98. Reise M, Kranz S, Heyder M, Jandt KD, Sigusch BW. Effectiveness of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP) Compared to Fluoride Products in an In-Vitro Demineralization Model. *Materials (Basel)*. 2021 Oct 11;14(20):5974. doi: 10.3390/ma14205974.
99. Raphael S, Blinkhorn A. Is there a place for Tooth Mousse in the prevention and treatment of early dental caries? A systematic review. *BMC Oral Health*. 2015 Sep 25;15(1):113. doi: 10.1186/s12903-015-0095-6
100. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)*. 2014 Nov 20;5(3):108-14.
101. Li L, Pan H, Tao J, Xu X, Mao C, Gu X, et al. Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks. 2008 Jul; 18:4079-84. doi: 10.1039/B806090H
102. Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater*. 2009 Jun;4(3):034104. doi: 10.1088/1748-6041/4/3/034104.
103. Haghgoo R, Rezvani MB, Salehi Zeinabadi M. Comparison of nano-hydroxyapatite and sodium fluoride mouthrinse for remineralization of incipient carious lesions. *J Dent (Tehran)*. 2014 Jul;11(4):406-10.
104. Bayindir ZS, Yuksel N. Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. *J Pharm Sci*. 2010 Apr;99(4):2049- 60. doi: 10.1002/jps.21944.
105. Chatterjee K, Sarkar S, Jagajjanani Rao K, Paria S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014 Jul;209:8-39. doi: 10.1016/j.cis.2013.12.008.
106. Jenjob R , Phakkeeree T , Crespy D . Core-shell particles for drug-delivery, bioimaging, sensing, and tissue engineering. *Biomater Sci*. 2020 May 21;8(10):2756- 70. doi: 10.1039/c9bm01872g.
107. Santos MVBd, Feitosa GT, Osajima JA, Santos RLP, Silva EDd, et al. Desenvolvimento de biomaterial composto por hidroxiapatita e clorexidina para aplicação na cavidade oral. *Cerâmica*. 2019 Jan;65(373). doi: 10.1590/0366-69132019653732441.

108. Rodrigues MC, Hewer TL, Brito GE, Arana-Chavez VE, Braga RR. Calcium phosphate nanoparticles functionalized with a dimethacrylate monomer. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Dec;45:122-6. doi: 10.1016/j.msec.2014.08.066.
109. Xu HH, Weir MD, Sun L. Nanocomposites with Ca and PO₄ release: effects of reinforcement, dicalcium phosphate particle size and silanization. *Dent Mater*. 2007 Dec;23(12):1482-91. doi: 10.1016/j.dental.2007.01.002.
110. Ionescu AC, Hahnel S, Cazzaniga G, Ottobelli M, Braga RR, Rodrigues MC, et al. Streptococcus mutans adherence and biofilm formation on experimental composites containing dicalcium phosphate dihydrate nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 Jul;28(7):108. doi: 10.1007/s10856-017-5914-7.
111. Melo MA, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel calcium phosphate nanocomposite with caries-inhibition in a human in situ model. *Dent Mater*. 2013 Feb;29(2):231-40. doi: 10.1016/j.dental.2012.10.010.
112. Misra DN. Interaction of chlorhexidine digluconate with and adsorption of chlorhexidine on hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*. 1994 Nov;28(11):1375-81. doi: 10.1002/jbm.820281116.