

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA

SHIRLEY MARIA DE NAZARÉ ROCHA CARDOSO

**SISTEMAS ADESIVOS CONTENDO PARTÍCULAS BIOATIVAS  
FUNCIONALIZADOS COM CLOREXIDINA: ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA E CITOTOXICIDADE**

SÃO LUÍS/MA

2022

**SHIRLEY MARIA DE NAZARÉ ROCHA CARDOSO**

**SISTEMAS ADESIVOS CONTENDO PARTÍCULAS BIOATIVAS  
FUNCIONALIZADOS COM CLOREXIDINA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E  
CITOTOXICIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Odontologia da Universidade Federal do  
Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau  
de Cirurgião-Dentista

**Orientador:** Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Bauer

**Coorientador:** Dr. Paulo Vitor Campos Ferreira

SÃO LUÍS/MA

2022

**CARDOSO, S. M. N. R. SISTEMAS ADESIVOS CONTENDO PARTÍCULAS BIOATIVAS FUNCIONALIZADOS COM CLOREXIDINA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTOXICIDADE.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau de Cirurgião-Dentista.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Roberto de Oliveira Bauer  
(Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Dias Neves Lago  
(Avaliadora)

---

Prof. Dr. Nuno Filipe D Almeida  
(Avaliador)

---

Prof. Dr. Frederico Silva de Freitas Fernandes  
(Avaliador suplente)

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu **Pai do céu**, ele é detentor das primeiras palavras que ouvi quando passei nesse curso e tudo que se passou em minha cabeça e coração. Me encheu de forças, me encorajou e capacitou para o propósito que me chamou para cumprir para glória do seu nome. O Senhor abriu as portas e possibilitou a finalização do meu Curso de Odontologia na UFMA. Obrigada pelo lugar de tamanha honra, paizinho.*

*Aos meus pais, **Elíudes Rocha** e **Francisco Cardoso**, que me incentivaram e apoiaram em cada decisão e caminho que Deus semeava em meu coração. Sem vocês, não chegaria a lugar algum.*

*Ao meu parceiro e companheiro, **Yuri André**, que sempre tornou tudo mais leve depois de momentos de tensão e dedicação à graduação. Por sempre acreditar, incentivar e demonstrar profunda admiração por tudo que eu fui alcançando. Por comemorar cada conquista como se fosse a sua própria.*

*A minha querida **Míuria Joyce**, por ser minha parceira de negócios e de vida, vibrando por cada passo de vitória que eu obtive.*

*As minhas amigas de curso, **Roberta** (minha primeira e eterna dupla da vida), **Handreza**, **Amandha** e **Rafaella** (minha companheira de viagem e resumos nas longas horas para nossa cidade Cohab e Cohatrac). Em especial, à minha dupla **Natália**, pela parceria diária.*

*À minha primeira orientadora de projeto, **Elizabeth Lima**, digo que ela foi a resposta para as minhas orações. A primeira pessoa a me dá oportunidade de participar como bolsista de um projeto e confiar na seriedade do meu trabalho.*

*Ao meu orientador, **José Roberto de Oliveira Bauer**, que acreditou fielmente em mim e na minha capacidade, muito mais do que eu. Por aceitar desbravar o “terreno pantanoso” comigo, por todas as oportunidades, pela paciência em me ensinar e me tranquilizar em*

*muitos momentos. O senhor me abriu os olhos para o universo da pesquisa e esclareceu que as coisas dão muito errado antes de dá certo, que é preciso muita persistência e resiliência.*

*Ao grupo de pesquisa do **BIOMMA**, que me ensinaram sobre experimentos no laboratório, mas sobretudo sobre lições de vida. Em especial, a dupla **Fabiola e Thais**.*

*Ao meu coorientador, **Paulinho**, um amor de pessoa, que sempre esteve disposto a me ajudar, compartilhar conhecimento e, principalmente, interessado em saber se as coisas estavam bem.*

*À toda minha turma de graduação, que me acolheu desde o 2º período e aguentou o meu temperamento e gênio forte até o final do curso.*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos adesivos utilizados.....	13
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores da atividade antibacteriana $\log_{10}$ UFC dos adesivos testados.....	16
Figura 2: Resultados do pH dos meios de cultura após 24 horas.....	17
Figura 3: Valores de viabilidade celular (%) dos adesivos testados.....	18

## SUMÁRIO

RESUMO .....	3
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2 ARTIGO .....	8
RESUMO .....	9
3 INTRODUÇÃO .....	10
4 METODOLOGIA.....	11
4.1 Preparo dos vidros bioativos.....	11
4.2 Preparo dos adesivos experimentais .....	11
4.3 Funcionalização das partículas de vidro bioativo com clorexidina .....	12
4.4 Preparo dos adesivos contendo Clorexidina .....	12
4.5 Atividade Antibacteriana.....	13
4.6 pH do meio bacteriano.....	14
4.7 Citotoxicidade.....	14
4.8 Análise Estatística .....	15
5 RESULTADOS .....	15
5.1 Atividade antibacteriana .....	15
5.2 Análise do pH .....	16
5.3 Citotoxicidade.....	17
6 DISCUSSÃO .....	18
REFERÊNCIAS do artigo .....	21
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
REFERÊNCIAS fundamentação teórica .....	23
ANEXO A- Normas Para Submissão Brazilian Dental Journal .....	26



## RESUMO

O aprimoramento dos sistemas adesivos com o objetivo de melhorar a interação entre material restaurador e a interface adesiva é uma das prioridades da Odontologia. Dentre essas inovações, a associação entre sistemas adesivos e vidros bioativos tem demonstrado trazer inúmeros benefícios para a aplicação clínica deste material, entretanto alguns aspectos ainda não são claros na literatura. Assim, este estudo tem como objetivo caracterizar novos adesivos contendo vidro bioativo (45S5), em diferentes concentrações (5 e 20%, peso). O vidro 45S5 foi funcionalizado com clorexidina e incorporados em sistemas adesivos experimentais. A atividade antibacteriana e a citotoxicidade dos sistemas adesivos experimentais foram avaliadas. Foram utilizados 6 grupos: adesivo comercial do tipo autocondicionante, como controle; o sistema adesivo autocondicionante experimental sem biovidro, como grupo controle; sistema adesivos autocondicionante experimental + 45S5 5%; sistema adesivo autocondicionante experimental + 45S5 20%; sistema adesivo autocondicionante experimental + 45S5 5% + Clorexidina; sistema adesivos autocondicionante experimental + 45S5 20% + Clorexidina. Esses grupos foram submetidos a testes microbiológicos e de citotoxicidade. Os grupos contendo clorexidina apresentaram uma ação bactericida superior aos demais grupos. Os grupos contendo apenas biovidro não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle comercial e experimental. Nos testes de citotoxicidade, todos os grupos avaliados apresentaram biocompatibilidade. Os adesivos funcionalizados com clorexidina não apresentaram toxicidade às células e conseguiram alcançar excelentes resultados de atividade bacteriana.

**Palavras-chaves:** adesivos dentinários; vidro bioativo; atividade antibacteriana; clorexidina

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

Sistemas adesivos foram desenvolvidos a partir do estudo desenvolvido por BUONOCORE (1955), em que a adesão ao esmalte foi avaliada a partir do contato de um agente condicionante com o esmalte. Isso resultou na adesão da resina acrílica ao substrato, devido a criação de porosidades no substrato, aumentando a área e a energia superficial. Ao penetrar nas porosidades, ocorre a formação de projeções resinosas, e, posterior, união micromecânica com o esmalte (VAN MEERBEEK *et al.*, 2011).

Recentemente, os sistemas adesivos foram classificados em convencionais, autocondicionantes. E, atualmente, o mercado conta com os sistemas adesivos universais ou multi-mode, que podem ser utilizados na forma convencional ou no modo autocondicionante (MUÑOZ *et al.*, 2013). O modo convencional apresenta 2 passos (condicionamento ácido e primer/adesivo) (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2017). Já o modo autocondicionante, que contém monômeros acídicos hidrofílicos que condicionam o substrato, são aplicados com apenas 1 passo.

Os sistemas adesivos são classificados em convencionais, autocondicionantes e universais. Os adesivos convencionais são divididos em 3 (condicionamento ácido total, primer e adesivo) ou 2 passos (condicionamento ácido e primer/adesivo) (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2017). Os sistemas autocondicionantes contêm monômeros acídicos hidrofílicos que condicionam o substrato. Podem ser divididos em sistemas de frasco único (prime + bond) e dois passos (Primer e bond). Por outro lado, os sistemas denominados universais podem ser aplicados pelas técnicas convencional ou autocondicionante, a depender da situação clínica e preferência do operador (MUÑOZ *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços, a longevidade clínica persiste como limitação desses materiais. O contínuo processo de degradação da interface adesiva é ocasionado pela exposição a estresses físico-químicos que levam ao surgimento de pontos de falha. Essas regiões são susceptíveis a infiltração de fluídos salivares contendo bactérias e nutrientes. Tais condições são favoráveis a colonização bacteriana e formação de biofilmes cariogênicos que podem desencadear o desenvolvimento de lesões de cárie (ITTHAGARUN *et al.*, 2004; SAURO & PASHLEY, 2016; SHINOHARA, 2006).

Adicionalmente, a elevada quantidade de solventes, em alguns sistemas, facilita a hidrólise do material devido à presença de fluido dentinário. Nesse ponto, as enzimas metaloproteinases contribuem no processo de degradação da interface adesiva através de uma ação proteolítica do colágeno (YAMAUTI *et al.*, 2011).

Com o objetivo de reduzir a degradação da camada adesiva, estudos (BAUER *et al.*, 2019; SAURO *et al.*, 2012; ZHANG, 2017) têm demonstrado que a incorporação de vidros bioativos a sistemas adesivos tem melhorado as propriedades mecânicas, o potencial antibacteriano, promovido a formação de dentina terciária, demonstrado baixa citotoxicidade e protegido a polpa dentária.

Os vidros bioativos surgiram na década de 60 como representante da segunda geração dos biomateriais. A segunda geração possibilitou a ligação entre a superfície de um material sintético com o tecido hospedeiro, criando uma interface (HENCH, 2006). O primeiro a ser desenvolvido foi o biovidro 45S5 e é um dos mais utilizados na Odontologia (HENCH, 2006; KRISHNAN *et al.*, 2013).

Resultados promissores já apareciam em pesquisas na década de 70 com esse biovidro, testes *in vitro* mostraram o desenvolvimento de uma camada de hidroxiapatita em soluções que não apresentavam íons cálcio ou fosfato. A formação da camada de hidroxiapatita ligou-se a camadas de fibrilas de colágeno criando uma forte interface, semelhante a observada *in vivo* (HENCH, 1971; HENCH 1972; HENCH 1973; HENCH 1974). Ademais, o processo de dissolução iônica resultante da presença de partículas bioativas podem influenciar na biocompatibilidade celular do material (HOPPE, GÜLDAL, BOCCACCINI, 2011; SILVER, DEAS, ERECIŃSKA, 2001).

Descobriu-se que o 45S5 poderia estimular osteoblastos a produzir tecido ósseo, fazendo com que a terceira geração focasse no uso de partículas (HENCH, 2006). Atualmente, diversos materiais odontológicos são compostos por 45S5, a fim de induzir a formação de uma camada mineralizada rica em cálcio e fosfato (ABBASSY *et al.*, 2019; BAKRY *et al.*, 2014).

A incorporação do 45S5 é uma opção para solucionar a degradação da interface adesiva. No entanto, um desafio permanece, o acúmulo de biofilme local. A clorexidina é um eficaz agente químico de ação antimicrobiana e padrão-ouro para controle do biofilme oral (ARAÚJO, 2021; FARRET *et al.*, 2011). A clorexidina é um

antisséptico catiônico e pertence ao grupo das bisbiguanidas. Não é esporicida, mas apresenta boa atividade contra bactérias gram-positivas e menor atividade contra bactérias gram-negativas e fungos (TORTORA *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2021).

A formulação mais conhecida comercialmente da clorexidina é na forma de digluconato, geralmente em bochechos na concentração de 0,12%. Contudo, a depender da concentração ela atua como bactericida, induzindo o extravasamento de constituintes celulares vitais, como ácido nucleico e potássio ou bacteriostática, apenas inibindo o crescimento, sem gerar morte (TSUCHIYA *et al.*, 1999; AKAKI, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2021).

A fim de compreender melhor os mecanismos de ação da clorexidina, estudos *in vitro* têm sido realizados acerca do potencial citotóxico dessa substância em modelos com células semelhantes a odontoblastos, com o propósito de identificar a resposta pulpar (HANKS *et al.*, 1998; MACDOUGALL *et al.*, 1995). Enquanto isso, alguns estudos já apontam uma possível citotoxicidade da clorexidina (GIANNELLI, 2008; LIU *et al.*, 2018). Por outro lado, há estudos reportando resultados favoráveis (STAVROULLAKIS AT *et al.*, 2021). A importância desses experimentos está no fato de que os odontoblastos são as células de revestimento da polpa e as primeiras afetadas por elementos que chegam à câmara pulpar (BABICH *et al.*, 1995).

As repercussões biológicas que o material adesivo com incorporação de clorexidina é capaz de gerar são desconhecidas. A aplicação de materiais em contato direto com a polpa ou em proximidade (menos de 0,5mm) podem ocasionar resposta pulpar inflamatória crônica, dilatação e congestão de vasos sanguíneos (HEBLING, 1999; PASHLEY, 1988). Os monômeros que permaneceram podem por difusão e lixiviação percorrer os túbulos dentinários e chegar no tecido pulpar e ter potencial efeito citotóxico (CHEN *et al.*, 2001; KWON *et al.*, 2015).

Assim, necessita-se de mais pesquisas para avaliar melhor a incorporação de agentes antimicrobianos e partículas bioativas no desenvolvimento de sistemas adesivos experimentais. Estudos recentes elucidam a vantagem que a clorexidina não interfere na formação da camada híbrida e inibe as enzimas metaloproteínases, minimizando a degradação da interface adesiva (CASTRO *et al.*, 2003; HEBLING *et al.*, 2005).

Portanto, objetivou-se caracterizar as propriedades de viabilidade celular e atividade antibacteriana de um sistema adesivo autocondicionante experimental contendo diferentes concentrações de partículas de vidro bioativo 45S5 funcionalizadas com clorexidina.

O objetivo da pesquisa foi desenvolver um sistema adesivo autocondicionante a favor da viabilidade celular, a fim de evitar a continuidade dos efeitos nocivos na polpa causados por monômeros residuais dos materiais dentários atuais. Uma das maneiras para possibilitar isso seria através da diminuição da permeabilidade dentinária, constituindo um mecanismo de defesa contra injúrias que podem atingir as células da câmara pulpar.

## 2 ARTIGO

### **Sistemas adesivos contendo vidro bioativo funcionalizado com clorexidina: atividade antibacteriana e citotoxicidade**

Shirley Maria de Nazaré Rocha Cardoso<sup>1</sup>

Paulo Vitor Campos Ferreira<sup>1</sup>

José Roberto de Oliveira Bauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biomateriais (BIOMMA), Odontologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

**Endereço para correspondência:**

Rua Manoel Felizardo Melo, número 13, Apt. 05, Bairro Cohab Anil III, São Luís, Maranhão, Brasil, CEP: 65051-500.

**Telefone:** +55 (98) 98874-7912

**E-mail:** shirleyrochacardoso@gmail.com

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito da adição do vidro bioativo (45S5) funcionalizado com clorexidina na citotoxicidade e atividade microbiana. **Material e métodos:** Foram utilizados 6 grupos: (1) Controle comercial – Adesivo hidrofóbico; (2) adesivo experimental sem biovidro (Controle experimental) (3) adesivo experimental + 5% do vidro 45S5 (wt%); (4) adesivo experimental + 20% do vidro 45S5 (wt%); (5) adesivo experimental + 5% de 45S5 funcionalizado com clorexidina; (6) adesivo experimental + 20% de 45S5 funcionalizado com clorexidina. Discos dos materiais foram confeccionados para a avaliação da atividade bacteriana (*Streptococcus mutans* ATCC 159). A viabilidade celular (%) dos materiais foi testada através da técnica de MMT Assay. **Resultados:** Os grupos contendo clorexidina apresentaram ação bactericida superior aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Os grupos contendo apenas biovidro não apresentaram atividade bacteriana ( $p > 0,05$ ). Nos testes de citotoxicidade, todos os grupos avaliados apresentaram resultados similares entre si ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** A funcionalização de partículas de biovidro com clorexidina não compromete a toxicidade, além de alcançar elevada atividade bacteriana.

**Palavras-chaves:** adesivos dentinários; vidro bioativo; atividade antibacteriana; clorexidina; citotoxicidade.

### 3 INTRODUÇÃO

Apesar do progresso da Odontologia adesiva, existe desafios a serem superados, como as falhas na interface da restauração dentária. Isso se deve, principalmente, à hidrólise polimérica e a degradação da camada híbrida que podem favorecer à infiltração por fluidos e bactérias (SAURO & PASHLEY, 2016).

Busca-se aumentar a longevidade das restaurações adesivas, sendo uma forma a incorporação de partículas bioativas nos materiais restauradores. Um sistema adesivo com propriedades bioativas, biocompatível e com ação antimicrobiana é uma alternativa para superar o problema da interface adesiva, evitando a instalação da cárie secundária (SAURO & PASHLEY, 2016).

Estudos (SAURO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2014; ZHANG, 2017; BAUER *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2021) têm demonstrado que a incorporação de vidros bioativos a sistemas adesivos tem melhorado as propriedades mecânicas, o potencial antibacteriano e são capazes de promover a formação de dentina terciária, demonstrar baixa citotoxicidade e proteger a polpa dentária. Atualmente, o biovidro 45S5 é um dos mais utilizados na Odontologia (KRISHNAN *et al.*, 2013).

O biovidro é um material que já foi incorporado com sucesso em diversos produtos e com diferentes propósitos, como em cobertura de implantes (KIRSTEN *et al.*, 2015), resinas ortodônticas (PROENÇA *et al.*, 2020), cimento de ionômero de vidro (VAN DIJKEN *et al.*, 2019) e até mesmo em sistemas adesivos (SAURO *et al.*, 2012; BAUER *et al.*, 2016; BAUER *et al.*, 2019).

Contudo, pouco se conhece a respeito da atividade antibacteriana promovida pelo vidro bioativo 45S5 quando incorporado nesses produtos, bem como acerca da sua citotoxicidade. Além disso, não há padronização para os testes de propriedades antimicrobianas (CAMILERRI *et al.*, 2020).

Estudo recente de WANITWISUTCHAI *et al.*, (2021), mostra que a ação antibacteriana do vidro 45S5 em resinas ortodônticas é pouco expressiva e depende de sua proporção na composição. Enquanto isso, PROENÇA *et al.*, (2020), obteve excelentes resultados em materiais resinosos. É desconhecido, porém, o mecanismo de ação do vidro 45S5 em sistemas adesivos, com pesquisas apenas acerca da aplicação direta desse material na forma de pó ou suspensão (BAUER *et al.*, 2019).



Assim, busca-se por um material que recupere o tecido dentário e apresente efeitos antimicrobianos. Estudos recentes elucidam que a clorexidina não interfere na formação da camada híbrida e inibe as enzimas metaloproteinases, minimizando a degradação da interface adesiva (CASTRO *et al.*, 2003; HEBLING, *et al.*, 2005).

Pesquisas promissoras têm sido realizadas e demonstrado o potencial da clorexidina quando carregada em nanotubos de carbono e incorporadas em sistemas adesivos (BOTTINO *et al.*, 2013). Isso ocorre através da interação entre as moléculas de clorexidina e a superfície das partículas de 45S5 (MORITZ e GESZKE-MORITZ, 2015).

O objetivo desse estudo é caracterizar as propriedades de viabilidade celular e atividade antibacteriana de um sistema adesivo autocondicionante experimental contendo diferentes concentrações de partículas de vidro bioativo 45S5 funcionalizadas com clorexidina.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Preparo dos vidros bioativos**

Foi utilizado o vidro bioativo comercial 45S5 (Sylc, OSsray Ltd, London, United Kingdom) submetido a um processo de trituração em um sistema vibratório (8000M, Mixer / Mill, SPEX SamplePrep, NJ, EUA) com um conjunto de moagem de carboneto de tungstênio (SPEX SamplePrep, NJ, EUA) por 30 minutos. O pó resultante da moagem foi submetido a peneiras de diferentes calibres 150µm - 75µm - 53µm - 38µm - 20µm (Hogentogler & Co., Inc, Columbia, MD, USA).

### **4.2 Preparo dos adesivos experimentais**

O pó do vidro bioativo 45S5 resultante da etapa anterior foi incorporado a dois sistemas adesivos autocondicionantes experimentais. Concentrações de 5% e 20% de partículas do vidro bioativo 45S5 foram adicionados à porção hidrofóbica (*bond*) dos materiais.

Os sistemas adesivos foram preparados de acordo com estudo realizado por BAUER, *et al.*, 2019 através da mistura de um *blend* de monômeros com o auxílio de

um agitador magnético em ambiente com temperatura e umidade controlada. Após a incorporação do vidro bioativo, os materiais foram centrifugados (SpeedMixer, FlackTek, Carolina do Sul, EUA) para homogeneização completa. Um adesivo experimental sem partículas (controle experimental) também foi formulado. O adesivo Magic Bond (Coltene, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi utilizado como controle comercial para esse estudo.

### **4.3 Funcionalização das partículas de vidro bioativo com clorexidina**

A funcionalização das partículas de vidro bioativo foi realizada por capilaridade, onde uma suspensão de vidro bioativo previamente preparada foi incorporada a uma solução aquosa de clorexidina 20% (Farmacia Naturale). A mistura (10mg de vidro bioativo/1ml de clorexidina) foi agitada por 1h em agitador magnético e então centrifugada por 5min a 4000rpm para descartar o sobrenadante. O pellet resultante foi seco a 37°C em uma incubadora a vácuo por 12 h.

### **4.4 Preparo dos adesivos contendo Clorexidina**

A suspensão de biovidro, previamente preparada, foi incorporada à uma solução de clorexidina 0,12 % e levadas ao agitador magnético durante 10 minutos. Logo após, essa solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O pellet resultante foi colocado para secar na dessecadora e em seguida, a proporção de 5% e 20% desse biovidro enriquecido com clorexidina foi adicionado ao *blend* de monômeros. Foram utilizados 6 tipos de materiais: O adesivo Magic Bond (Coltene, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), como controle comercial; o sistema adesivo autocondicionante experimental sem biovidro, como grupo controle; sistema adesivos autocondicionante experimental + 45S5 5%; sistema adesivo autocondicionante experimental + 45S5 20%; sistema adesivo autocondicionante experimental + 45S5 5% + Clorexidina; sistema adesivos autocondicionante experimental + 45S5 20% + Clorexidina. Para cada material, foram feitas 3 amostras, 24 horas antes de cada repetição do experimento.

Tabela 1 - Composição dos adesivos utilizados

Adesivo	Composição
Magic Bond (2001931)	Bond: Dimetacrilato de Uretano, Dimetacrilato Piromelítico (PMDM), 2-hidroxietil metacrilato, Bisfenol A Metacrilato de Glicidila, Álcool Anidro, Glicerol 1,3-dimetacrilato, Óxido 2,4,6-trimetilbenzoildifenil fosfina, Canforoquinona, Butil Hidroxitolueno, Dióxido de Silício, Bis-(hidroxietil)- aminopropil-N-hidroxietil-octadecilamina difluoridrato.
Controle	Bond: UDMA, TEGDMA, GDMA, Bis-EMA, Bis-GMA, DMAEMA, CQ.
45S5 5% 45S5 20%	Bond: UDMA, TEGDMA, GDMA, Bis-EMA, Bis-GMA, DMAEMA, CQ, vidro bioativo 45S5 (concentrações de 5%, e 20%).
45S5 5% 45S5 20% Clorexidina	Bond: UDMA, TEGDMA, GDMA, Bis-EMA, Bis-GMA, DMAEMA, CQ, vidro bioativo 45S5 (concentrações de 5%, e 20% enriquecido com clorexidina previamente)

*Bis-EMA: bisfenol glicidil dimetacrilato etoxilado; Bis-GMA: bisfenol-A glicidil metacrilato; CQ: canforoquinona; DMAEMA: 2-dimetilaminoetil dimetacrilato; GDMA: glicerol dimetacrilato; GDMA-P: 1,3-dimetacrilato de glicerol fosfato; HEMA: hidroxietilmetacrilato; TEGDMA: tri etileno glicol dimetacrilato; UDMA: dimetacrilato de uretano.*

#### 4.5 Atividade Antibacteriana

Seis discos (5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura) de cada adesivo (bond) foram confeccionados utilizando uma matriz metálica (n=6). Os moldes foram preenchidos com os materiais, recobertos com uma tira de poliéster e uma lâmina de vidro para remover o excesso de adesivo e fotopolimerizados por 20 segundos (1200 mW/cm<sup>2</sup> - Raddi-cal, SDi, Victoria, Austrália).

Os discos foram colocados em uma placa de cultura estéril de 24 poços, acoplados a suportes e submetidos a esterilização com luz UV. Depois, foram colocados em cada poço, 2 ml de meio de cultura esterilizado de BHI (BD, Sparks, USA) e SM UA159 com 1% de glicose durante 24 horas a 37 ° C, 10% de CO<sub>2</sub>.

Após as 24 horas do experimento, o biofilme formado nos discos foi coletado separadamente. Os biofilmes foram diluídos à temperatura ambiente em um tubo de

ependorff com 1 ml de solução salina estéril, submetendo os discos à homogeneização por vórtex. Os biofilmes colhidos foram submetidos à sonicação em uma potência de 7W por 30 seg (Branson, Sonifier 50, Danbury, CT, USA) para remover os biofilmes formados sobre os discos. Alíquotas da suspensão foram usadas para determinar a viabilidade bacteriana.

Uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão foi diluída em solução de NaCl 0,9% estéril em série até 10<sup>-7</sup>, e duas gotas de 10  $\mu$ L de cada diluição seriada foram inoculadas em BHI ágar (BD, Sparks, EUA). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub>. As unidades formadoras de colônias foram contadas e expressas como UFC / mg de peso úmido de biofilme (AIRES *et al.*, 2008).

#### **4.6 pH do meio bacteriano**

O pH do meio em que os discos estavam imersos foi verificado (Orion 4, Star Plus, Thermo Fisher Scientific, Brasil) antes de iniciar o experimento e 24 horas após a finalização do experimento. Em seguida, os discos foram retirados dos poços.

#### **4.7 Citotoxicidade**

Para o teste de citotoxicidade, uma linhagem de células fibroblásticas imortalizadas (GM) foi cultivada em Meio Essencial de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina / estreptomicina a 37 ° C com uma mistura de gás umidificado de 5% de CO<sub>2</sub> e 95 % de ar. As células foram plaqueadas na concentração de 10<sup>5</sup> cel/mL em uma placa 96 poços para cada tempo determinado (n=3 por grupo). Paralelamente, os corpos de prova foram confeccionados e esterilizados com luz ultravioleta por 30 min. Em seguida, foram imersos em 4ml de DMEM, onde as amostras foram deixadas por 24h. Após 24h, tratou-se as células com meio DMEM utilizado para os discos dos grupos experimentais. A viabilidade foi medida pelo teste de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio) no período de 24h/48h. Após 3 horas, retirou-se o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio) e álcool etílico absoluto foi utilizado para solubilização do formazan. A placa foi então

analisada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm e a viabilidade determinada de acordo com a leitura.

#### 4.8 Análise Estatística

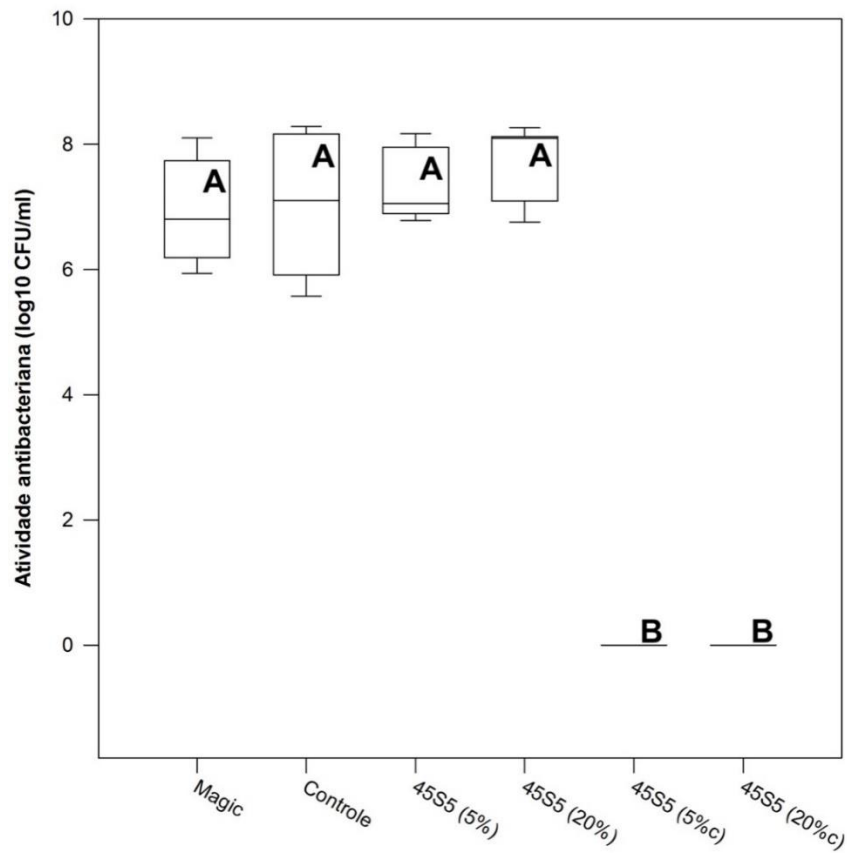
A análise estatística foi realizada utilizando o *software* SigmaPlot (Systat Software Inc., San Jose, Califórnia, EUA). Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para determinar a normalidade. Os dados da citotoxicidade foram submetidos a ANOVA One-Way (1-fator) e Holm-Sidak para contraste entre as médias ( $\alpha = 0.05$ ). Os dados da atividade antimicrobiana violaram a normalidade ( $p < 0,05$ ). Assim, os dados da unidade formadora de colônias (UFC) foram transformados em Log 10 (UFC/mL) e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e teste Student-Newman-Keuls para contraste entre as médias.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade antibacteriana

A Figura 1 mostra os resultados da avaliação da atividade antibacteriana dos materiais testados. Os adesivos experimentais contendo diferentes concentrações de biovidro 45S5 enriquecidos com clorexidina apresentaram redução significativa nas Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus mutans*, quando comparado com os adesivos carregados com 45S5 em diferentes concentrações, controle comercial e controle experimental (sem carga). Os adesivos comercial, controle experimental e 45S5 5% e 45S5 20% apresentaram valores de atividade antibacteriana semelhantes.

Figura 1 – Valores da atividade antibacteriana  $\log_{10}$  UFC dos adesivos testados.

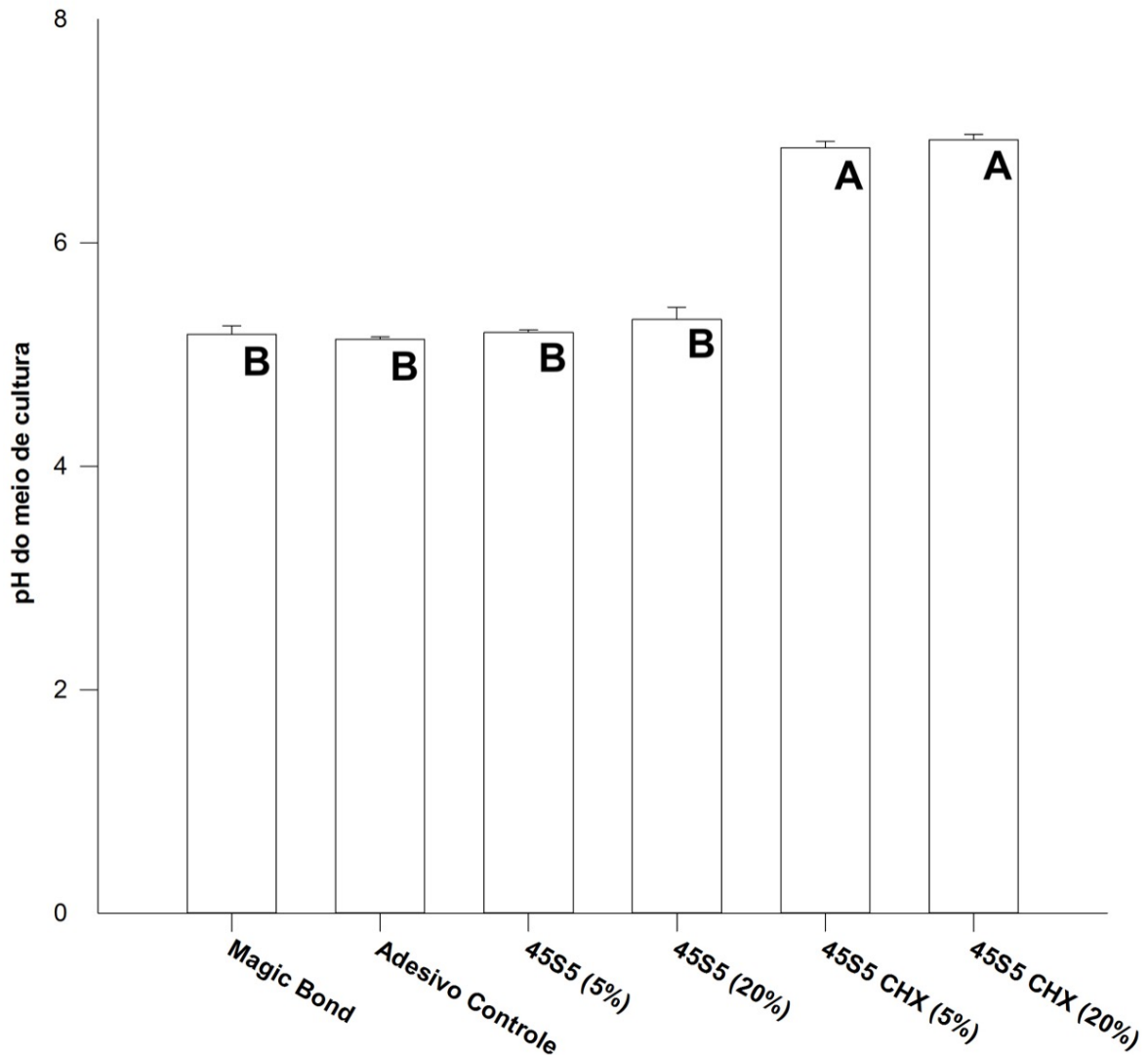


*\* Box-plot com letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).*

## 5.2 Análise do pH

A Figura 2 mostra o resultado do pH dos meios de cultura retirados dos poços após as 24 horas que ficaram no experimento. Os grupos de adesivos contendo clorexidina conseguem alcalinizar mais o pH em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ).

Figura 2 - Resultados do pH dos meios de cultura após 24 horas.

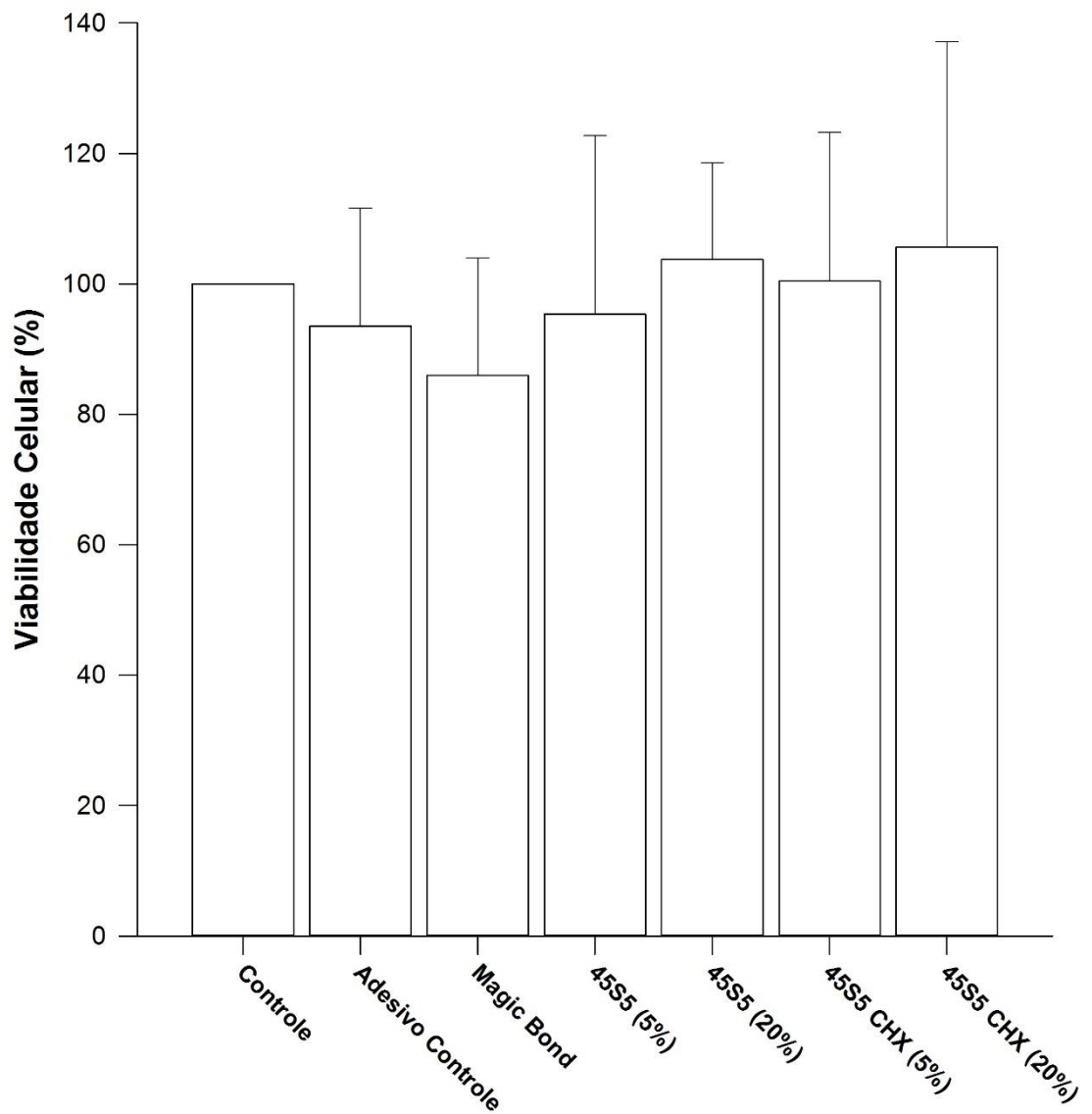


*\*Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).*

### 5.3 Citotoxicidade

Na Figura 3, observa-se que os adesivos de todos os grupos avaliados apresentaram biocompatibilidade. Os adesivos testados apresentaram valores de viabilidade celular similares ( $p > 0,05$ ).

Figura 3 – Valores de viabilidade celular (%) dos adesivos testados.



## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de estratégias que atribuem propriedades bioativas a sistemas adesivos têm sido alvo frequente de estudos científicos CARVALHO *et al.*, 2014; CARVALHO, *et al.*, 2021).

Neste estudo, partículas de 45S5 foram funcionalizadas com clorexidina 20% e inseridas ao adesivo experimental. Esse processo ocorre através de interações entre as moléculas de clorexidina e a superfície das partículas de 45S5 (MORITZ e GESZKE-MORITZ, 2015). Por sua vez, silicatos, como partículas de 45S5, possuem superfície rica em grupos silanol (Si-OH) (HENCH, 2006). Assim, o processo de



carregamento de clorexidina em partículas de vidro bioativo ocorre através da forte interação entre grupos Si-OH e as porções alcalinas das moléculas de clorexidina (MORITZ e GESZKE-MORITZ, 2015).

Depois desse processo, avaliou-se a atividade antimicrobiana destes sistemas adesivos experimentos com clorexidina. Os resultados demonstraram elevada efetividade, quando comparada aos grupos controles e experimentais contendo apenas 45S5. Esta propriedade está associada a presença de clorexidina na superfície das partículas de vidro bioativo dos grupos 45S5- clorexidina 5% e 45S5- clorexidina 20%, os quais não apresentaram diferença estatística entre si. Acredita-se que as partículas de vidro bioativo funcionalizadas foram capazes de liberar suficiente quantidade de clorexidina para levar as bactérias a morte das bactérias no meio de cultura. A clorexidina leva a uma diminuição na fluidez da membrana em ambas as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas com perda da atividade osmorregulatória e capacidade metabólica da membrana celular e de suas enzimas, além da inibição da respiração celular e do transporte de solutos (TSUCHIYA *et al.*, 1999).

Recentemente, foi observado que há uma falta de padronização dos testes em todos os níveis, não há padrões específicos para o teste de propriedades antimicrobianas (CAMILERRI *et al.*, 2020). Da mesma forma, o presente estudo observa na literatura uma falta no consenso sobre a possível atividade antimicrobiana de partículas de 45S5. Diferentes aspectos metodológicos (tempo de contato, tipo de açúcar, quantidade de açúcar, forma/tamanho do corpo de prova) podem estar ligados aos diferentes resultados encontrados na literatura. Estudos apontam que partículas de vidro bioativo apresentam atividade bacteriana, em aplicações diretas e/ou indiretas (BAUER *et al.*, 2019; PROENÇA *et al.*, 2020). Este estudo não apontou atividade antimicrobiana para os grupos experimentais contanto apenas vidro bioativo. Por outro lado, quando as partículas foram funcionalizadas com clorexidina, foi observada uma ação antimicrobiana mais efetiva. Dessa forma, estudos precisam ser realizados para determinação da concentração ideal de partículas de vidro bioativo funcionalizadas, bem como para otimização do processo de funcionalização.

Se por um lado a clorexidina contribuí na atividade bacteriana do material, estudos apontam uma possível citotoxicidade da clorexidina (GIANNELLI, 2008; LIU *et al.*, 2018). O presente estudo apresentou resultados favoráveis de viabilidade celular, em todos os grupos experimentais. Resultados também reportados em outro

estudo (STAVROULLAKIS AT *et al.*, 2021). Ressalta-se que a presença de partículas bioativas pode influenciar positivamente na viabilidade celular do material devido o processo de dissolução iônica (HOPPE, GÜLDAL, BOCCACCINI, 2011; SILVER, DEAS, ERECIŃSKA, 2001).

Por fim, observa-se na literatura uma falta de consenso sobre a possível atividade antimicrobiana de partículas de vidro bioativo, quando aplicadas de forma indireta adicionadas a matrizes poliméricas. Aspectos metodológicos necessitam de padronização para o correto estudo da possível propriedade antimicrobiana e mecanismos envolvidos nesse processo. Por outro lado, este estudo validou a funcionalização das partículas de vidro bioativo 45S5 com clorexidina para otimização da atividade antimicrobiana destes materiais. No entanto, estudos necessitam ser realizados para melhor entendimento de concentrações de vidro bioativo a serem utilizadas, bem como determinação da melhor concentração de clorexidina a serem utilizadas no processo de funcionalização.

## REFERÊNCIAS DO ARTIGO

- AIRES CP, *et al.* Effect of sucrose and starch on dental biofilm formation and on dentin demineralization. *Caries Research* 2008;42(5):380.
- BAUER, J. *et al.* Dentin pretreatment with 45S5 and niobophosphate bioactive glass: Effects on pH, antibacterial, mechanical properties of the interface and microtensile bond strength. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2019;90:374–380.
- BAUER, J. *et al.* Development of a simplified etch-and-rinse adhesive containing niobophosphate bioactive glass. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 2016; 69: 110–114.
- BOTTINO MC *et al.* Nanotube-modified dentin adhesive – Physicochemical and dentin bonding characterizations. *Dental Materials* 2013;29:1158-1165.
- CAMILLERI J, *et al.* Standardization of antimicrobial testing of dental devices. *Dental Materials* 2020;36:e59–73. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2019.12.006>.
- CARVALHO CN, *et al.* Micropush-out dentine bond strength of a new gutta-percha and niobium phosphate glass composite 2014. <https://doi.org/10.1111/iej.12334>.
- CARVALHO EM, *et al.* Development and characterization of self-etching adhesives doped with 45S5 and niobophosphate bioactive glasses: Physicochemical, mechanical, bioactivity and interface properties. *Dental Materials* 2021;37:1030–45. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2021.03.004>.
- CASTRO FL, *et al.* Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent.* 2003;5(2):129–138.
- GIANNELLI M, *et al.* Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in Vitro* 2008;22:308–17. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2007.09.012>.
- HEBLING J, *et al.* Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741–746.
- HENCH L. The story of Bioglass. *J Mater Sci: Mater Med* 2006;17:967–78. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- HOPPE A, GÜLDAL NS, BOCCACCINI AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757–74. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- KIRSTEN A. *et al.* Bioactive and thermally compatible glass coating on zirconia dental implants. *Journal of Dental Research* 2015; 94(2): 297–303.
- KRISHNAN V, Lakshmi T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 2013;4(2):78–83.
- LIU JX, *et al.* Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Joint Infect* 2018;3:165–72. <https://doi.org/10.7150/jbji.26355>.

MORITZ M, GESZKE-MORITZ M. Mesoporous silica materials with different structures as the carriers for antimicrobial agent. Modeling of chlorhexidine adsorption and release. *Appl Surf Sci* 2015;356:1327–40. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2015.08.138>.

PROENÇA, MAM. *et al.* Orthodontic resin containing bioactive glass: Preparation, physicochemical characterization, antimicrobial activity, bioactivity and bonding to enamel. *International Journal of Adhesion and Adhesives* 2020; (99): 102575.

SAURO S, Pashley DH. Strategies to stabilise dentine-bonded interfaces through remineralising operative approaches – State of The Art. *Int J Adhes & Adhes*. 2016 set;69: 39-57.

SAURO S. *et al.* Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2012;23(6):1521-1532.

SILVER IA, DEAS J, ERECIŃSKA M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 2001;22:175–85. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00173-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00173-3).

STAVROULLAKIS AT, *et al.* Interaction of epigallocatechin-gallate and chlorhexidine with *Streptococcus mutans* stimulated odontoblast-like cells: Cytotoxicity, Interleukin-1 $\beta$  and co-species proteomic analyses. *Arch Oral Biol* 2021;131:105268. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2021.105268>.

TSUCHIYA H, *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine in saliva after mouthrinsing. *Caries Res*. 1999;33(2):156-63. doi: 10.1159/000016510. PMID: 9892784.

VAN DIJKEN, JWV; Pallesen, U.; Benetti, A. A randomized controlled evaluation of posterior resin restorations of an altered resin modified glass-ionomer cement with claimed bioactivity. *Dental Materials* 2019; 35(2) 335–343.

WANITWISUTCHAI T. *et al.* Buffering capacity and antibacterial properties among bioactive glass-containing orthodontic adhesives. *Dental Materials Journal* 2021;40(5):1169–1176.

ZHANG, K. *et al.* Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. *Dental clinics of North America* v. 61, p. 669-687, oct. 2017.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se com esse estudo que os adesivos funcionalizados com clorexidina conseguiram alcançar bons resultados de atividade bacteriana, sem comprometer a biocompatibilidade e a bioatividade.

## REFERÊNCIAS FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- ABBASSY MA, *et al.* 45S5 Bioglass paste is capable of protecting the enamel surrounding orthodontic brackets against erosive challenge. *Journal of Orthodontic Science* 2019; 8 (1)
- ARAÚJO JLS. Analysis of Chlorhexidine Modified Cement in Orthodontic Patients: A Double-Blinded, Randomized, Controlled Trial. *Eur J Dent* 2021; 15(04): 639-646.
- BABICH H, *et al.* An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol.* 1995;11(2):79–88.
- BAKRY AS, *et al.* Evaluation of new treatment for incipient enamel demineralization using 45S5 bioglass. *Dental Materials* 2014;30(3): 314–320.
- BAUER, J. *et al.* Dentin pretreatment with 45S5 and niobophosphate bioactive glass: Effects on pH, antibacterial, mechanical properties of the interface and microtensile bond strength. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2019;90:374–380.
- BEDRAN-RUSSO A, *et al.* An Overview of Dental Adhesive Systems and the Dynamic Tooth-Adhesive Interface. *Dent Clin North Am.* 2017 out;61(4):713-731.
- BUONOCORE MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955; Dec 34(6): 849-53.
- CASTRO FL, *et al.* Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent.* 2003;5(2):129-38.
- CHEN RS, *et al.* The effect of curing light intensity on the cytotoxicity of a dentin-bonding agent. *Oper Dent* 2001;26(5):505–10.
- E. AKAKI. Avaliação da incorporação de agentes antibacterianos a cimentos resinosos. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) – Faculdade de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2005.
- FARRET MM, *et al.* Can we add chlorhexidine into glass ionomer cements for band cementation? *Angle Orthod.* 2011;81(03):496–502.
- GIANNELLI M, *et al.* Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in Vitro* 2008;22:308–17. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2007.09.012>.
- HANKS CT, *et al.* Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998;37(3-4):233–249.
- HEBLING J, *et al.* Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005;84(8):741-6.
- HEBLING, J. *et al.* Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *Journal of endodontics* v. 25, p. 676-682, out. 1999.
- HENCH L. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2006; 17(11): 967–978.

HENCH L, *et al.* Effects of microstructure on the radiation stability of amorphous semiconductors. *Int J. Non-Cryst. Sol.* 8–10 (1972) 837.

HENCH L, *et al.* Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 2 (1971) 117.

HENCH L; PASCHALL H. A. J. Direct bonding between bioactive glass-ceramic materials and bone. *Biomed. Mater. Res. Symp.* 4 (1973) 25.

HENCH L; PASCHALL H. A. J. Histochemical responses at a biomaterial's interface. *Biomed. Mater. Res. Symp.* 5 (1974) 49.

HOPPE A, GÜLDAL NS, BOCCACCINI AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757–74. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.

ITTHAGARUN A, *et al.* Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part III. Evidence from fluid conductance and artificial caries inhibition. *American journal of dentistry*, v.17, p. 394-400, dez. 2004.

KRISHNAN V, LAKSHMI T. Bioglass: A novel biocompatible innovation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 2013;4(2):78–83.

KWON HJ, *et al.* The effect of polymerization conditions on the amounts of unreacted monomer and bisphenol A in dental composite resins. *Dent Mater J* 2015;34(3):327–35.

LIU JX, *et al.* Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Joint Infect* 2018;3:165–72. <https://doi.org/10.7150/jbji.26355>.

MACDOUGALL M, *et al.* Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res.* 1995;33(13):97–103.

MUÑOZ MA, *et al.* Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent*, v. 41, n. 5, p. 404-11, may. 2013.

PASHLEY DH Consideration of dentine permeability in cytotoxicity testing. *International endodontic journal* v. 21, p. 143-154, mar. 1988.

SAURO S, PASHLEY DH. Strategies to stabilize dentine-bonded interfaces through remineralizing operative approaches – State of The Art. *Int J Adhes & Adhes.* 2016 set;69: 39-57.

SAURO S, *et al.* Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2012;23(6):1521-1532.

SHINOHARA MS, *et al.* Evaluation of antibacterial and fluoride-releasing adhesive system on dentin – microtensile bond strength and acid-base challenge. *Dental Materials Journal*, v.25, p. 545-542, set. 2006.

SILVER IA, DEAS J, ERECIŃSKA M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses

on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 2001;22:175–85. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00173-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00173-3).

STAVROULLAKIS AT, *et al.* Interaction of epigallocatechin-gallate and chlorhexidine with *Streptococcus mutans* stimulated odontoblast-like cells: Cytotoxicity, Interleukin-1 $\beta$  and co-species proteomic analyses. *Arch Oral Biol* 2021;131:105268. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2021.105268>.

TORTORA GJ, FUNKE BR CASE, CL. *Microbiologia*, 10<sup>a</sup> ed., Artmed, Porto Alegre; 2000. p. 184.

TSUCHIYA H, *et al.* High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine in saliva after mouthrinsing. *Caries Res.* 1999;33(2):156-63. doi: 10.1159/000016510. PMID: 9892784.

VAN MEERBEEK B, *et al.* State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011; 27(1):17-28.

YAMAUTI M, *et al.* Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci*, v. 119, n. 1, p. 79-85, feb. 2011.

ZHANG K, *et al.* Bioactive Dental Composites and Bonding Agents Having Remineralizing and Antibacterial Characteristics. *Dental clinics of North America* v. 61, p. 669-687, oct. 2017.

## ANEXO A- NORMAS PARA SUBMISSÃO BRAZILIAN DENTAL JOURNAL

### Instruções aos autores

#### Escopo e política

O Brazilian Dental Journal é um periódico científico revisado por pares (sistema duplo-cego) que publica Documentos Originais Completos, Comunicações Curtas, Relatórios de Casos e Críticas Convidadas, tratando os diversos campos da Odontologia ou áreas relacionadas, com acesso aberto. Serão considerados para publicação apenas artigos originais. Na submissão de um manuscrito, os autores devem informar em carta de encaminhamento que o material não foi publicado anteriormente e não está sendo considerado para publicação em outro periódico, quer seja no formato impresso ou eletrônico.

#### ENDEREÇO ELETRÔNICO PARA SUBMISSÃO

SERÃO CONSIDERADOS APENAS TRABALHOS REDIGIDOS EM INGLÊS. Autores cuja língua nativa não seja o Inglês, devem ter seus manuscritos revisados por profissionais proficientes na Língua Inglesa. **Os trabalhos aceitos para publicação serão submetidos à Revisão Técnica, que compreende revisão lingüística, revisão das normas técnicas e adequação ao padrão de publicação do periódico. O custo da Revisão Técnica será repassado aos autores. A submissão de um manuscrito ao BDJ implica na aceitação prévia desta condição.** A decisão de aceitação para publicação é de responsabilidade dos Editores e baseia-se nas recomendações do corpo editorial e/ou revisores "ad hoc". Os manuscritos que não forem considerados aptos para publicação receberão um e-mail justificando a decisão. Os conceitos emitidos nos trabalhos publicados no BDJ são de responsabilidade exclusiva dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do corpo editorial.

Todos os manuscritos serão submetidos a revisão por pares. Autores e revisores serão mantidos anônimos durante o processo de revisão. Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista.

Brazilian Dental Journal é um jornal de acesso aberto, o que significa que todos os artigos publicados estão disponíveis gratuitamente na Internet imediatamente após a publicação.

O Brazilian Dental Journal manterá os direitos autorais e editoriais de todos os artigos publicados, incluindo traduções. Os usuários podem usar, reutilizar e construir sobre o material publicado na revista, mas apenas para fins não comerciais e desde que a fonte seja claramente e adequadamente mencionada.

A Revista adota sistema para identificação de plágio (AntiPlagiarist - ACNP Software).

O Brazilian Dental Journal está indexado na base de dados DOAJ para acesso público.



## Forma e preparação de manuscritos

### AS NORMAS DESCRITAS A SEGUIR DEVERÃO SER CRITERIOSAMENTE SEGUIDAS.

#### Geral

- Submeter o manuscrito em Word e em PDF, composto pela página de rosto, texto, tabelas, legendas das figuras e figuras (fotografias, micrografias, desenhos esquemáticos, gráficos e imagens geradas em computador, etc).
- O manuscrito deve ser digitado usando fonte Times New Roman 12, espaço entrelinhas de 1,5 e margens de 2,5 cm em todos os lados. **NÃO UTILIZAR** negrito, marcas d'água ou outros recursos para tornar o texto visualmente atrativo.
- As páginas devem ser numeradas seqüencialmente, começando no *Summary*.
- Trabalhos completos devem estar divididos seqüencialmente conforme os itens abaixo:
  1. Página de Rosto
  2. Summary e Key Words
  3. Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão
  4. Resumo em Português (obrigatório apenas para os autores nacionais)
  5. Agradecimentos (se houver)
  6. Referências
  7. Tabelas
  8. Legendas das figuras
  9. Figuras
- Todos os títulos dos capítulos (Introdução, Material e Métodos, etc) em letras maiúsculas e sem negrito.
- Resultados e Discussão **NÃO** podem ser apresentados conjuntamente.
- Comunicações rápidas e relatos de casos devem ser divididos em itens apropriados.
- Produtos, equipamentos e materiais: na primeira citação mencionar o nome do fabricante e o local de fabricação completo (cidade, estado e país). Nas demais citações, incluir apenas o nome do fabricante.
- Todas as abreviações devem ter sua descrição por extenso, entre parênteses, na primeira vez em que são mencionadas.

#### **Página de rosto**

- A primeira página deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, nome dos autores (máximo 6), Departamento, Faculdade e/ou Universidade/Instituição a que pertencem (incluindo cidade, estado e país). **NÃO INCLUIR** titulação (DDS, MSc, PhD etc) e/ou cargos dos autores (Professor, Aluno de Pós-Graduação, etc).

- Incluir o nome e endereço **completo** do autor para correspondência (**informar e-mail, telefone e fax**).
- A página de rosto deve ser incluída em arquivo separado do manuscrito.

### **Manuscrito**

- A primeira página do manuscrito deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, sem o nome dos autores.

### **Summary**

- A segunda página deve conter o *Summary* (resumo em Inglês; máximo 250 palavras), em redação contínua, descrevendo o objetivo, material e métodos, resultados e conclusões. Não dividir em tópicos e não citar referências.
- Abaixo do *Summary* deve ser incluída uma lista de Key Words (5 no máximo), em letras minúsculas, separadas por vírgulas.

### **Introdução**

- Breve descrição dos objetivos do estudo, apresentando somente as referências pertinentes. Não deve ser feita uma extensa revisão da literatura existente. As hipóteses do trabalho devem ser claramente apresentadas.

### **Material e métodos**

- A metodologia, bem como os materiais, técnicas e equipamentos utilizados devem ser apresentados de forma detalhada. **Indicar os testes estatísticos utilizados neste capítulo.**

### **Resultados**

- Apresentar os resultados em uma seqüência lógica no texto, tabelas e figuras, enfatizando as informações importantes.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto.
- Tabelas e figuras devem trazer informações distintas ou complementares entre si.
- Os dados estatísticos devem ser descritos neste capítulo.

### **Discussão**

- Resumir os fatos encontrados sem repetir em detalhes os dados fornecidos nos Resultados.
- Comparar as observações do trabalho com as de outros estudos relevantes, indicando as implicações dos achados e suas limitações. Citar outros estudos pertinentes.
- Apresentar as conclusões no final deste capítulo. Preferencialmente, as conclusões devem ser dispostas de forma corrida, isto é, evitar citá-las em tópicos.

### **Resumo (em Português) - Somente para autores nacionais**

O resumo em Português deve ser **IDÊNTICO** ao resumo em Inglês (Summary). OBS: **NÃO COLOCAR** título e palavras-chave em Português.

### Agradecimentos

- O Apoio financeiro de agências governamentais deve ser mencionado. Agradecimentos a auxílio técnico e assistência de colaboradores podem ser feitos neste capítulo.

### Referências

- As referências devem ser apresentadas de acordo com o estilo do **Brazilian Dental Journal (BDJ)**. É recomendado aos autores consultar números recentes do BDJ para se familiarizar com a forma de citação das referências.
- As referências devem ser numeradas por ordem de aparecimento no texto e citadas entre parênteses, sem espaço entre os números: (1), (3,5,8), (10-15). **NÃO USAR SOBRESCRITO**.
- Para artigos com dois autores deve-se citar os dois nomes sempre que o artigo for referido. Ex: "According to Santos **and** Silva (1)...". Para artigos com três ou mais autores, citar apenas o primeiro autor, seguido de "et al.". Ex: "Pécora et al. (2) reported that..."
- Na lista de referências, os nomes de TODOS OS AUTORES de cada artigo devem ser relacionados. Para trabalhos com 7 ou mais autores, os 6 primeiros autores devem ser listados seguido de "et al."
- A lista de referências deve ser digitada no final do manuscrito, em seqüência numérica. Citar **NO MÁXIMO** 25 referências.
- A citação de abstracts e livros, bem como de artigos publicados em revistas não indexadas deve ser evitada, a menos que seja absolutamente necessário. **Não citar referências em Português**.
- Os títulos dos periódicos devem estar abreviados de acordo com o Dental Index. O estilo e pontuação das referências devem seguir o formato indicado abaixo:

#### *Periódico*

1. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. A novel method for the evaluation of powered toothbrush oscillation characteristics. *Am J Dent* 2004;17:307-309.

#### *Livro*

2. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1983.

*Capítulo de Livro*

3. Walton RE, Rotstein I. Bleaching discolored teeth: internal and external. In: Principles and Practice of Endodontics. Walton RE (Editor). 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p 385-400.

### Tabelas

- As tabelas com seus respectivos títulos devem ser inseridas após o texto, numeradas com algarismos arábicos; **NÃO UTILIZAR** linhas verticais, negrito e letras maiúsculas (exceto as iniciais).
- O título de cada tabela deve ser colocado na parte superior.

- Cada tabela deve conter toda a informação necessária, de modo a ser compreendida independentemente do texto.

### **Figuras**

- **NÃO SERÃO ACEITAS FIGURAS INSERIDAS EM ARQUIVOS ORIGINADOS EM EDITORES DE TEXTO COMO O WORD E NEM FIGURAS EM POWER POINT;**
- Os arquivos digitais das imagens devem ser gerados em Photoshop, Corel ou outro software similar, com extensão TIFF e resolução mínima de 300 dpi. Apenas figuras em PRETO E BRANCO são publicadas. Salvar as figuras no CD-ROM.
- Letras e marcas de identificação devem ser claras e definidas. Áreas críticas de radiografias e fotomicrografias devem estar isoladas e/ou demarcadas.
- Partes separadas de uma mesma figura devem ser legendadas com letras maiúsculas (A, B, C, etc). Figuras simples e pranchas de figuras devem ter largura mínima de 8 cm e 16 cm, respectivamente.
- As legendas das figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos e apresentadas em uma página separada, após a lista de referências (ou após as tabelas, quando houver).