

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ODONTOLOGIA-
DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

STELLA MARIA GLACI REINKE

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO CONTENDO MICROPARTÍCULAS
INOVADORAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

PONTA GROSSA
2014

STELLA MARIA GLACI REINKE

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO CONTENDO MICROPARTÍCULAS
INOVADORAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*, área de concentração: Clínica Integrada, linha de pesquisa: Prevenção em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Raposo
Fernandes

PONTA GROSSA
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

R372 Reinke, Stella Maria Glaci
Desenvolvimento tecnológico,
caracterização e avaliação de cimento de
ionômero de vidro contendo micropartículas
inovadoras de digluconato de clorexidina/
Stella Maria Glaci Reinke. Ponta Grossa,
2014.
133f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Área
de Concentração: Clínica Integrada),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helena
Raposo Fernandes.

1.Biomateriais. 2.Citotoxicidade.
3.Propriedades mecânicas. I.Farago, Paulo
Vitor. II. Fernandes, Maria Helena
Raposo. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Doutorado em Odontologia.
IV. T.

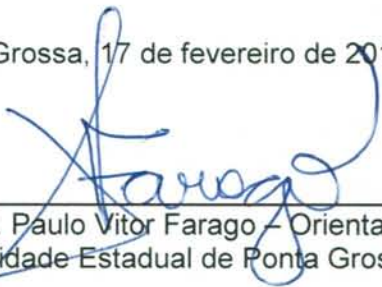
CDD: 617.6

STELLA MARIA GLACI REINKE

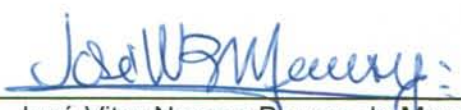
**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO CONTENDO MICROPARTÍCULAS
INOVADORAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*, área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa: Prevenção em Odontologia.

Ponta Grossa, 17 de fevereiro de 2014.



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. José Vitor Nogara Borges de Menezes
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Michele Debiase Alberton
Universidade Regional de Blumenau



Profª. Drª. Stella Kossatz Pereira
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profª. Drª. Osnara Maria Mongruel Gomes
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS CURRICULARES

STELLA MARIA GLACI REINKE

NASCIMENTO 27.06.1983	Massaranduba – Santa Catarina
FILIAÇÃO	Rolf Reinke Junior Diana Margaret Reinke
2001 – 2005	Curso de Graduação em Odontologia, Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau – Santa Catarina.
2008 – 2010	Programa de Pós-graduação <i>Stricto Sensu</i> em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nível de Mestrado em Odontologia – área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa: Prevenção em Odontologia, Ponta Grossa – Paraná.
2010 – 2014	Programa de Pós-graduação <i>Stricto Sensu</i> em Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), nível de Doutorado em Odontologia – área de concentração em Clínica Integrada, linha de pesquisa: Prevenção em Odontologia, Ponta Grossa – Paraná.
2011	Doutorado Sanduíche pelo Programa PDSE – Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Portugal.

Dedico este trabalho a meus pais e meu esposo.
Pai e Mãe... amore senza fine.
Amor... You're the home my heart searched for so long
And it is you I have loved all along

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“Pai, pode crer eu vou bem, eu tô indo... tô tentando vivendo e pedindo... com loucura pra você renascer... Pai... você foi meu herói... você faz parte desse caminho.” (Fábio Jr)

Meu querido *Pai*, como agradecer a você tudo que fez por mim durante todos estes anos de doutorado? Como ter certeza que você está me ouvindo e vendo-me agora? Afinal, a mim só restou à fé. É acreditando nela que neste momento utilizo este espaço para te agradecer, por todo apoio durante estes anos, primeiro por todo o incentivo para que continua-se meus estudos, quando muitos disseram que você não deveria permitir, pelas muitas caronas, pelas madrugadas aguardando acordado para me buscar, pelas visitas que mesmo rápidas, já ajudavam a matar um pouco a saudade e a conseguir continuar longe. Quero te agradecer pela amizade, sempre disposto a me ouvir, a tentar entender um pouco deste mundo das pesquisas, pelas opiniões e ajudas. Agradecer-te pelas palavras de incentivo, pela atenção e dedicação durante o período que passei em Portugal, por aprender a usar o msn para conversar todos os dias comigo, sua dedicação não tem como esquecer.

Mas, principalmente, *Pai* quero agradecer-te pelo amor que sempre me deu, pelos principais ensinamentos que recebi na vida, meu exemplo de amor a família, de fé, de dedicação e de paixão ao que se faz, meu exemplo de vida! Serei eternamente grata pela honra de ter vivido com você estes quase 30 anos, porém queria mais. Saiba onde estiver que esta etapa que concluo, perde grande parte do seu brilho com a sua ausência, nada é igual sem você, sem seu olhar cheio de orgulho. Mais esta etapa é resultado de tudo que você me ensinou a ser, essa vitória é nossa, e todas as novas etapas que vierem em minha vida serão sempre baseadas nos teus ensinamentos e exemplo. Seguirei guiada por ti minha eterna lua, meu amor sem fim!

AGRADECIMENTOS

A *Deus* e à *minha família*, por guiarem minha vida e serem a base de tudo.

À minha mãe, *Diana*, mulher guerreira, dedicada e esforçada, que ama a sua família e se mantém forte até nos momentos onde sua fraqueza seria o mais normal e aceitável, tudo por sua família! Quero te agradecer por ser assim, por não me deixar desistir, por acreditar em mim sempre e me permitir sonhar. Obrigada por cada dia nestes quatro anos de doutorado, pela atenção mesmo com quilômetros de distância, nunca me deixou só. Obrigada pelo apoio e ajuda em todos os momentos, nunca medindo esforços para facilitar a minha vida, que estava sempre corrida. Obrigada por ser a minha companheira e amiga em tantas viagens a Ponta Grossa. Obrigada por sempre estar pronta para me ouvir desabafar, fosse ao telefone, pela internet ou pessoalmente. Obrigada por todo o carinho e dedicação durante o período que estive em Portugal, quem me conhece sabe que se não fosse a segurança vinda das pessoas que amo eu não teria conseguido. Obrigada por sempre acreditar em meu potencial, acreditar que eu seria capaz. Obrigada pela educação que recebi, por me ensinar a ser forte, e desejar ir longe, isto é o pilar que tornou tudo possível. Minha grande amiga, minha melhor amiga, concluímos mais uma caminhada, que venham muitas ainda, sempre juntas, amo-te!

Ao *Márcio*, que começou o doutorado como namorado virou noivo e agora é meu amado esposo, mas sempre foi principalmente meu grande companheiro. Obrigada pela ajuda em todas as etapas deste trabalho, tudo tem um pouco de você, cada foto, cada linha escrita e revisada, cada dia de laboratório, até mesmo em pleno período de festas de fim do ano estávamos juntos em Portugal no laboratório. Obrigada pelo apoio nas diversas viagens neste último ano para Ponta Grossa, mesmo cansado nunca me deixou só. Quantas histórias, quanto apoio, amizade e companheirismo, paciência com essa alemoa brava, não é mesmo?! Meu amor, obrigada por tudo, por tornar muito mais doce as lembranças destes anos de doutorado, foi uma honra ser sua colega, pois admiro muito o profissional que tu és, obrigada por compartilhar seus conhecimentos sempre comigo com muita paciência e carinho. Obrigada pelo apoio no momento mais difícil da minha vida, por me mostrar que desistir não ia resolver nada, por me ajudar a continuar, acreditando que eu iria conseguir dar conta e

terminar, mesmo por muitas vezes eu te falando que não conseguia mais, que estava perdida. Obrigada por compartilhar teus sonhos comigo, e tornar eles os nossos sonhos, que seja assim para sempre nossas vidas, juntos para sempre, amo-te! (como aprendemos juntos).

Aos meus irmãos *Anna* e *Victor*, meus sobrinhos, *Matheus*, *Bárbara*, *Kyvia*, *Luka* e *Victor Filho*, meus cunhados *Beto* e *Daiana*, minha família, obrigada por todo apoio e carinho durante esta longa caminhada, obrigada pelas visitas e pela compreensão com tantos momentos de ausência, agora é hora de nunca mais ficar longe, de manter nossa família linda unida para sempre como aprendemos. Obrigada pelos fins de semana de casa cheia, que venham muitos mais na casa do pai e da mãe, na *nossa* eterna casa! Os fins de semana longe de todo este agito foram os momentos mais difíceis, vocês fizeram muita falta. Obrigada por terem conservado o meu lugar aqui, a certeza que sempre teria para onde voltar foi essencial para que tudo desse certo. Amo muito todos vocês!

Ao *Pedro* e *Giovana*, filhos do meu querido esposo, mais acima de tudo meus amigos, obrigada por fazerem parte da minha vida e aceitarem fazer parte da minha família, pessoas maravilhosas com um coração lindo, que compreenderam sempre as ausências necessárias nestes anos de doutorado, que dividem seu bem mais precioso comigo, companheiros na nossa EuroTrip, obrigada por tudo.

Aos familiares do meu esposo, *Márcia* e *Felipe*, *Alessandra*, *Milton Junior* e *Caroline*, em especial aos meus sogros *Neusa* e *Milton*, obrigada por todo o carinho e compreensão nestes anos de doutorado, e principalmente obrigada por me receberem tão bem em sua casa e sua família.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Paulo Vitor Farago*, obrigada por ser esta pessoa maravilhosa com quem tive a honra de trabalhar durante estes anos de doutorado. Primeiro, gostaria de agradecer ao Orientador, atencioso e paciente com esta aluna com conhecimentos limitados de farmacotécnica, primeira orientada oficial de doutorado, foi uma honra e um desafio. Obrigada por ter aceitado o desafio de me orientar num projeto que construímos juntos, onde como você mesmo disse aprendemos um com o outro, você mostrou-se um verdadeiro orientador. Obrigada

pela compreensão da minha ausência no momento que passei por dificuldades, respeitar meu silêncio e acreditar que iria voltar no momento que estivesse pronta. Mas não poderia deixar de agradecer ao amigo que conquistei, pelas diversas jantadas deliciosas e por dividir comigo sua vida, você certamente será eterno em minha vida, obrigada por ser o melhor orientador do mundo!

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, representada pelo Magnífico Reitor *Prof. Dr. Luciano Santana Vargas*, gostaria de agradecer a oportunidade de adquirir conhecimento numa Universidade com excelência em ensino, pesquisa e extensão.

À *Profª. Drª. Osnara Maria Mongruel Gomes* coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, obrigada por todo o carinho e atenção sempre dispensados comigo. Obrigada por ser este exemplo de dedicação como profissional e pessoa, um verdadeiro exemplo de mulher.

Ao *Prof. Dr. Luis Esmerino*, da UEPG, muito obrigada pelo auxílio no delineamento e execução da avaliação microbiológica das micropartículas, assim como o empréstimo de seus materiais.

Aos demais Professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, *Alessandra, Alessandro, Denise, Everton, Fábio André, Gibson, Janaína, João Carlos, Nara, Osnara, Paulo Vitor e Daniel*, obrigada por compartilharem seus conhecimentos com muita dedicação.

Aos colegas de doutorado, *Alexandra, Carlos, Giovana, Luis, Miguel, Yasmine e Yileng*, obrigada por todas as experiências compartilhadas nestes anos de mestrado e doutorado. Certamente foram mas anos juntos do que todos planejaram inicialmente quando nos conhecemos em Ponta Grossa, mais foi maravilhoso, resultando em muitos momentos que jamais esquecerei.

Ao colega e grande amigo *Luis Alfonso Arana Gordillo*, meu querido *Lucho*, obrigada pela amizade neste tempo todo, você certamente sabe o quanto foi importante sua amizade. Foi uma honra ser sua colega, obrigada pela companhia no dia-a-dia de laboratório, sempre animando o ambiente e compartilhando o seu conhecimento.

Aos colegas *Yasmine Mendes Pupo* e *Andreas Felipe Cartagena Molina* muito obrigada por todo o auxílio durante a realização desta pesquisa, sempre dispostos a ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

Às amigas *Bruna Fortes Bittencourt* e *Ana Cristina Kovalik Gonçalves*, obrigada pela amizade e carinho em todos estes anos, vocês certamente alegraram muito meus dias e foram muito importantes em toda esta caminhada.

À querida *Rafaela Garcia*, orientada de iniciação científica e amiga, obrigada por compartilhar seus conhecimentos de acadêmica de Farmácia comigo, certamente crescemos juntas em cada etapa realizada.

A todos os funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial *Julia Folmer de Andrade Ribeiro* (Departamento de Ciências Farmacêuticas), *Elizabete Munhoz* (Departamento de Ciências Farmacêuticas), *Janaína* (Departamento de Ciências Farmacêuticas), *Luzia Chaves Simão* (LABMU), *Milton Domingos Michel* (CIPP), *Morgana das Graças Procz dos Santos* (Programa de Pós-graduação em Odontologia), *Nilson Biagini Sabino* (LABMU), *Douglas Wellington Migliorini* (CIPP) pela ajuda em todos os momentos que necessitei, certamente vocês contribuíram muito para que este estudo fosse concluído.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES*, pelo auxílio financeiro concedido para minha formação.

À *Universidade do Porto-UP*, Portugal, representada pela *Prof^a. Luiza Capitão*, responsável pela Mobilidade acadêmica internacional, e o *Prof. Dr. Afonso Pinhão Ferreira*, diretor da Faculdade de Medicina Dentária da UP (FMD), obrigada por possibilitar a realização de parte do doutorado numa instituição de ensino tão completa.

À *Prof.^a Dr.^a. Maria Helena Raposo Fernandes*, chefe do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da FMD da UP, obrigada por todo o carinho e atenção com que nos recebeu, por sua contribuição maravilhosa na minha formação,

certamente foi um período de muito aprendizado. Obrigada por compartilhar conosco seu amor pelo estudo com células, nunca esquecerei sua alegria ao ver as células crescerem.

À *Profª. Drª. Ana Paula Pacheco*, professora da Faculdade de Engenharia da UP, obrigada por toda sua contribuição na etapa de avaliação microbiológica, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao *Prof. Pedro de Sousa Gomes*, da FMD da UP, obrigada pela contribuição com seus conhecimentos no delineamento do estudo de biocompatibilidade celular.

À *Mônica Pereira Garcia*, técnica do Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da FMD da UP, obrigada pelo convívio diário durante o período em Portugal, sempre disposta a nos auxiliar na adaptação ao país e ao laboratório, sua ajuda foi essencial.

À *Universidade Regional de Blumenau-FURB*, todos os professores, funcionários e meus alunos, obrigada pelo convívio diário, lugar onde iniciei meus estudos na Odontologia, e que hoje retorno, com muita honra e alegria, para compartilhar um pouco do que aprendi nestes anos todos de formação.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para que esta caminhada fosse concluída, muito obrigada!

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar no sonho que se tem ou que seus planos
nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser
alguém... Quem acredita sempre alcança!*

Renato Manfredini Junior (Renato Russo)

Reinke SMG. **Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação de cimento de ionômero de vidro contendo micropartículas inovadoras de digluconato de clorexidina**. 2014, 133f. [Tese de Doutorado em Clínica Integrada – Faculdade de Odontologia]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2014.

RESUMO

O cimento de ionômero de vidro (CIV) é um material amplamente utilizado na Odontologia, por apresentar capacidade de adesão aos tecidos dentários e atividade anticariogênica. Estudos anteriores têm sugerido que a incorporação de antimicrobianos ao CIV permite um aumento na longevidade das restaurações, assim como uma ação antibacteriana frente ao biofilme dental depositado sobre as restaurações. Com o intuito de otimizar a incorporação do antimicrobiano ao CIV o presente estudo propõe-se a desenvolver, caracterizar e avaliar um CIV contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina (Clx Dg). Realizou-se um estudo laboratorial para (1) formular e avaliar micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg para serem adicionadas em um CIV comercial e (2) investigar as propriedades citotóxicas e mecânicas desse novo material. As micropartículas foram obtidas pelo método de emulsão em meio não aquoso/evaporação do solvente a partir dos polímeros (Eudragit® S100 e RS100) e do Clx Dg a 10 e 25%. A caracterização dos materiais microparticulados foi feita por métodos morfológicos, térmicos e espectroscópicos, avaliação do teor e liberação do fármaco. As duas melhores formulações de micropartículas foram incorporadas em um CIV já comercializado, obtendo-se dois materiais experimentais além do CIV puro, considerado como controle. Estes materiais foram submetidos à análise de biocompatibilidade com células de polpa dental e fibroblastos gengivais humanos, a atividade antimicrobiana e a avaliação de propriedades mecânicas (resistência à abrasão, à compressão, à tração diametral e flexão). As micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg foram preparadas com sucesso, apresentando características de: partículas de tamanho micrométrico, termoestáveis, amorfas/não-cristalinas, com alta eficiência de encapsulação do fármaco, atividade antimicrobiana comprovada, liberação lenta e controlada do fármaco. A incorporação das micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg ao CIV acrescentou capacidade antimicrobiana ao material e não causou aumento da citotoxicidade do mesmo. As propriedades mecânicas sofreram alterações positivas e negativas após a incorporação das micropartículas, porém sem contraindicar o uso desse novo material. Conclui-se que foi possível desenvolver, caracterizar e avaliar o CIV contendo micropartículas (met)acrílicas inovadoras de Clx Dg, e que o mesmo apresentou características e desempenho satisfatórios. Esse novo material tem potencial promissor para procedimentos restauradores, necessitando a realização de estudos clínicos.

Palavras-chave: Biomateriais; Citotoxicidade; Propriedades mecânicas.

Reinke SMG. **Technological development, characterization and evaluation of glass ionomer cement containing innovative microparticles of chlorhexidine digluconate**. 2014, 133f. [Doctoral thesis in Integrated Clinical Practice – Faculty of Dentistry]. Ponta Grossa: State University of Ponta Grossa; 2014.

ABSTRACT

Glass ionomer cement (GIC) is a widely used material in dentistry for providing both adhesion to dental tissues and anticariogenic activity. Previous studies have suggested that the incorporation of antimicrobials to GIC allows an increase in the longevity of restorations as well as an antibacterial activity against biofilm deposited on the restorations. In order to have a better incorporation of an antimicrobial to GIC, this study aims at evaluating a GIC containing chlorhexidine digluconate (Clx Dg)-loaded (meth)acrylic microparticles. In brief, it was carried out a laboratory study (1) to formulate and to evaluate Clx Dg-loaded (meth)acrylic microparticles for being added into a commercial GIC and (2) to investigate the cytotoxic and mechanical properties of this novel material. Microparticles were obtained by the non-aqueous emulsion/solvent evaporation method using Eudragit® S100 and RS100 as polymers and Clx Dg at 10 and 25%. The characterization was performed by morphological, thermal and spectroscopic methods and by evaluating the drug content and drug release. The two best formulations of microparticles were incorporated into a commercial GIC and resulted in two new experimental materials. The pure GIC was used as control. The biocompatibility of these materials was investigated using dental pulp cells and human gingival fibroblasts. In addition, the antimicrobial activity and the mechanical properties (resistance to abrasion, compressive strength, diametral tensile strength and flexural strength) were carried out. Clx Dg-loaded (meth)acrylic microparticles were successfully prepared. Micrometer-sized, heat-stable, and amorphous/non-crystalline formulations with high drug-loading efficiencies, effective antimicrobial activity, and a controlled release of the drug were obtained. The incorporation of Clx Dg-loaded (meth)acrylic microparticles into GIC provided antimicrobial properties to this material and did not increase its cytotoxicity. The mechanical properties demonstrated positive and negative changes after the microparticles incorporation. However these changes did not contraindicate the use of this new material. It was concluded that it was possible to obtain a GIC containing innovative Clx Dg-loaded (meth)acrylic microparticles that showed suitable features and performance. This new material has a promising potential for restorative procedures. However, additional clinical studies are required.

Keywords: Biocompatible Materials; Cytotoxicity; Mechanical properties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Estrutura química da clorexidina.....	30
Figura 2	- Estrutura química do poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila).....	32
Figura 3	- Estrutura química do cloreto de poli(metacrilato de trimetilamonioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila).....	32
Figura 4	- Fluxograma do estudo.....	47
Figura 5	- Esquema de preparação das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina pelo método de emulsão em meio não aquoso/evaporação do solvente.....	49
Figura 6	- Pastilha de KBr contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	52
Figura 7	- Cimento de ionômero de vidro, usado como controle e base para incorporação das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	57
Figura 8	- Delineamento dos testes para a avaliação dos novos materiais.	57
Figura 9	- Corpo-de-prova para a avaliação da biocompatibilidade celular dos materiais.....	58
Figura 10	- Molde e corpo-de-prova para a avaliação da capacidade de liberação e recarga de íon fluoreto.....	63
Figura 11	- Molde e corpo-de-prova para a avaliação de resistência à abrasão.....	64
Figura 12	- Esquema das leituras para avaliação da rugosidade superficial.	66
Figura 13	- Esquema das indentações para avaliação da dureza superficial	67
Figura 14	- Dispositivo para adaptação do corpo-de-prova e fixação na matriz da máquina de escovação.....	67
Figura 15	- Escovas dentais e dentifrício utilizados na escovação.....	68
Figura 16	- Molde para a confecção dos corpos-de-prova para a avaliação da resistência à compressão.....	70
Figura 17	- Molde para a confecção dos corpos-de-prova para a avaliação da resistência à tração diametral.....	71

Figura 18	- Micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	74
Figura 19	- Imagens de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 1200 X das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina MS10 (a), MS25 (b), MRS10 (c) e MRS25 (d).....	76
Figura 20	- Padrões da difração de raios X do digluconato de clorexidina, Eudragit® S100, Eudragit® RS100 e micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	77
Figura 21	- Espectros de FTIR do digluconato de clorexidina, Eudragit® S100, Eudragit® RS100 e micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	78
Figura 22	- Termogramas das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	79
Figura 23	- Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos nos tempos pré-determinados para o esquema dinâmico, método indireto, com tempo de cultura celular de 1 dia.....	84
Figura 24	- Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos nos tempos pré-determinados para o esquema dinâmico, método indireto, com tempo de cultura celular de 4 dias.....	85
Figura 25	- Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos em contato com os corpos-de-prova.....	86
Figura 26	- Viabilidade celular das células de polpa dental humana nos tempos pré-determinados para o esquema acumulativo, método indireto.....	87
Figura 27	- Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos nos tempos pré-determinados para o esquema acumulativo, método direto.....	88
Quadro 1	- Marca comercial, fabricante, lote, composição e manipulação do material testado.....	56
Gráfico 1	- Taxas de dissolução de digluconato de clorexidina como fármaco puro e em micropartículas (met)acrílicas.....	80
Gráfico 2	- Valores obtidos por turbidimetria visível referentes ao crescimento microbiano de <i>Streptococcus mutans</i> , a partir dos	

	meios de cultura coletados no esquema dinâmico (valor do 89 branco=0,070).....	
Gráfico 3	- Média da liberação de íons fluoreto (ppm) dos cimentos de ionômeros de vidro, 1 dia (1), 2 dias (2), 7 dias (3), 14 dias (4) e após recarga (5). Comparações dos valores por material entre os diferentes tempos: diferença significativa (*) com 7 dias, 14 dias e após recarga; (#) com 7 dias, 14 dias e após recarga; (**) com após recarga; (***) com 14 dias e após recarga; (p<0,05, ANOVA 2 critérios com pós-teste de Bonferroni).....	91
Gráfico 4	- Média e desvio padrão da massa (g) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois de submetidos à abrasão. Comparações entre os valores iniciais e finais: diferenças significativas para os grupos CIV+MS25, CIV+MRS25 e CIV (teste t de <i>student</i> pareado). Comparações dos valores iniciais entre os diferentes grupos: diferença significativa entre todos (p<0,05, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores finais entre os diferentes grupos: diferença significativa entre todos (p<0,05, ANOVA com pós-teste de Tukey).....	92
Gráfico 5	- Valores das diferenças entre massa inicial e final (g) dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à abrasão. Comparações dos valores sem diferença estatisticamente significativa entre todos (ANOVA com pós-teste de Tukey).....	93
Gráfico 6	- Valores das diferenças entre rugosidade Ra inicial e final (µm), dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à abrasão. Comparações dos valores: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV (ANOVA com pós-teste de Tukey).....	94
Gráfico 7	- Valores das diferenças entre rugosidade Rt inicial e final (µm), dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à abrasão. Comparações dos valores: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV (ANOVA com pós-teste de Tukey).....	95
Gráfico 8	- Valores das diferenças entre dureza superficial inicial e final (VHN), dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à	

	abrasão. Comparações dos valores: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 (ANOVA com pós-teste de Tukey).....	97
Gráfico 9	- Média e desvio padrão dos valores de resistência à compressão (MPa) após 24 horas e 1 mês de armazenamento em meio úmido dos cimentos de ionômeros de vidro. Comparações entre os valores 24 horas e 1 mês: diferenças significativas para os grupos CIV+MS25 e CIV (teste t de <i>student</i> pareado). Comparações dos valores de 24 horas entre os diferentes grupos: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p<0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores de 1 mês entre os diferentes grupos: diferença significativa entre todos os grupos ($p<0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey).....	98
Gráfico 10	- Média e desvio padrão dos valores de resistência à tração diametral (MPa) após 24 horas e 1 mês de armazenamento em meio úmido dos cimentos de ionômeros de vidro. Comparações entre os valores 24 horas e 1 mês: sem diferenças significativas para todos os grupos (teste t de <i>student</i> pareado). Comparações dos valores de 24 horas entre os diferentes grupos: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p<0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores de 1 mês entre os diferentes grupos: diferença significativa (#) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p<0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey).....	99
Gráfico 11	- Média e desvio padrão dos valores de resistência à flexão (MPa) após 24 horas e 1 mês de armazenamento em meio úmido, dos cimentos de ionômeros de vidro. Comparações entre os valores 24 horas e 1 mês: diferenças significativas no grupo CIV+MRS25 (teste t de <i>student</i> pareado). Comparações dos valores de 24 horas entre os diferentes grupos: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p<0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores de 1 mês	

entre os diferentes grupos: diferença significativa (#) com
CIV+MS25 ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey)..... 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Formulações das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	48
Tabela 2	- Modelos matemáticos relacionados aos ensaios de dissolução.....	54
Tabela 3	- Eficácia de encapsulação e tamanho de partícula para as micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.....	75
Tabela 4	- Dados de liberação obtidos por meio do ajuste dos perfis de dissolução do digluconato de clorexidina a partir das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina frente à equação biexponencial.....	81
Tabela 5	- Zonas de inibição do crescimento* em milímetros obtidas a partir das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina e controles contra microrganismos habituais do meio bucal.....	82
Tabela 6	- Número de unidades formadoras de colônias de <i>Streptococcus mutans</i> , obtido após a semeadura em placa de Petri, os com meios de cultura coletados no esquema dinâmico.....	90
Tabela 7	- Média (desvio padrão) da rugosidade Ra (μm) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois da abrasão.....	94
Tabela 8	- Média (desvio padrão) da rugosidade Rt (μm) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois da abrasão.....	95
Tabela 9	- Média (desvio padrão) da dureza (VHN) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois da abrasão.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ART	Tratamento Restaurador Atraumático
CIV	Cimento de ionômero de vidro
Clx Dg	Digluconato de clorexidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MBC	Concentração mínima bactericida
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Concentração mínima inibitória
MMPs	Metaloproteinases
MSC	Critério de seleção do modelo
MTT	Análise colorimétrica do metiltetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
ppm	Partes por milhão
r	Coeficiente de correlação
Ra	Rugosidade média aritmética
Rt	Rugosidade total
TSB	Caldo triptona de soja
TISAB II	Solução Tampão para ajuste da força iônica total
TG	Termogravimetria
TGA	Análise termogravimétrica
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Ultravioleta
VHN	Dureza Vickers
α -MEM	Meio essencial mínimo, modificação alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	Potencial hidrogeniônico
%	Por cento
®	Marca registrada
h	Horas
°C	Graus Celsius
μm	Micrômetro(s)
mW	Miliwatt(s)
g	Grama(s)
m	Metro(s)
V	Volt(s)
Rev	Revoluções
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
±	Mais ou Menos
nm	Nanometro(s)
cm	Centímetro(s)
μg	Micrograma(s)
™	Marca Registrada
kV	Kilovolt(s)
°	Grau(s)
mA	MiliAmpére(s)
L	Litro(s)
RPM	Rotações por minuto
mm	Milímetro(s)
μL	Microlitro(s)
s	Segundo(s)
kN	QuiloNewton
Hz	Hertz
MPa	Megapascal
Kgf	Kilogramaforça

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	CLOREXIDINA E MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS.....	29
2.2	CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO E ANTIMICROBIANOS.....	32
2.3	PROPRIEDADES DO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO.....	35
2.3.1	BIOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
2.3.2	LIBERAÇÃO DE ÍON FLUORETO.....	38
2.3.3	RESISTÊNCIA À ABRASÃO.....	40
2.3.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS: COMPRESSÃO, TRAÇÃO DIAMETRAL E FLEXÃO.....	43
3	PROPOSIÇÃO.....	45
3.1	OBJETIVO GERAL.....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	MATERIAIS PARA A ELABORAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	46
4.2	PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	46
4.3	AVALIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	49
4.3.1	AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO.....	49

4.3.2	QUANTIFICAÇÃO DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS.....	50
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	51
4.4.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	51
4.4.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	52
4.4.3	AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	52
4.4.4	ANÁLISE TÉRMICA.....	53
4.4.5	ENSAIO DE DISSOLUÇÃO- LIBERAÇÃO DO FÁRMACO.....	53
4.4.5.1	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO.....	54
4.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	55
4.6	INCORPORAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO.....	56
4.7	AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	57
4.7.1	ESQUEMA DINÂMICO.....	59
4.7.2	ESQUEMA ACUMULATIVO.....	60
4.8	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS CIMENTOS DE IONÔMEROS DE VIDRO.....	61
4.9	LIBERAÇÃO E RECARGA DE ÍON FLUORETO.....	62
4.10	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ABRASÃO.....	63
4.10.1	ALTERAÇÃO DE MASSA.....	65

4.10.2	ALTERAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	65
4.10.3	ALTERAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL.....	66
4.10.4	ESCOVAÇÃO SIMULADA.....	67
4.11	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	69
4.11.1	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO.....	69
4.11.2	RESISTÊNCIA À TRAÇÃO DIAMETRAL.....	71
4.11.3	RESISTÊNCIA À FLEXÃO.....	71
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
5	RESULTADOS.....	74
5.1	PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	74
5.2	AVALIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	75
5.2.1	AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO.....	75
5.2.1	QUANTIFICAÇÃO DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NAS MICROPARTÍCULAS.....	75
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	75
5.3.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	75
5.3.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	76
5.3.3	AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	77
5.3.4	ANÁLISE TÉRMICA.....	78
5.3.5	ENSAIO DE DISSOLUÇÃO- LIBERAÇÃO DO FÁRMACO.....	80

5.3.5.1	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO.....	80
5.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA.....	81
5.5	INCORPORAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO.....	82
5.6	AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	83
5.6.1	ESQUEMA DINÂMICO.....	83
5.6.2	ESQUEMA ACUMULATIVO.....	86
5.7	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS CIMENTOS DE IONÔMEROS DE VIDRO.....	88
5.8	LIBERAÇÃO E RECARGA DE ÍON FLUORETO.....	90
5.9	AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ABRASÃO.....	91
5.9.1	ALTERAÇÃO DE MASSA.....	92
5.9.2	ALTERAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	93
5.9.3	ALTERAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL.....	95
5.10	PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	97
5.10.1	RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO.....	97
5.10.2	RESISTÊNCIA À TRAÇÃO DIAMETRAL.....	98
5.10.3	RESISTÊNCIA À FLEXÃO.....	99
6	DISCUSSÃO.....	101
7	CONCLUSÃO.....	113
	REFERÊNCIAS.....	115

ANEXOS..... 122

INTRODUÇÃO

O cimento de ionômero de vidro surgiu na década de 1970 a partir da combinação dos cimentos de silicato e policarboxilato de zinco, resultando em um material com propriedades altamente positivas, tais como: ação anticariogênica e adesividade à estrutura dentária (Mc Lean et al.¹ 1989, Mount² 1996). Essas qualidades permitiram sua ampla aplicação nas várias especialidades da Odontologia, principalmente na etapa de adequação da cavidade bucal, como material restaurador provisório.

A longevidade dos materiais restauradores na cavidade bucal está relacionada à manutenção das suas qualidades estéticas e funcionais (Weerheijm, Groen³ 1999, Xie et al.⁴ 2000, Smales, Gao⁵ 2000, Frencken, Holmgren⁶ 2001) frente à ação da mastigação/fonação, erosão ocasionada pelos alimentos e abrasão ocasionada pela escovação dental. Na presença de dentes restaurados a mastigação/fonação, erosão e abrasão podem levar à perda de massa, alterar a rugosidade superficial e fraturar o material restaurador (Heath, Wilson⁷ 1976, Forss et al.⁸ 1991, Momoi et al.⁹ 1997, Rios et al.¹⁰ 2002, Mondelli et al.¹¹ 2005, Kielbassa et al.¹² 2005, Gladys et al.¹³ 2007, Wang et al.¹⁴ 2009, Reinke et al.¹⁵ 2011). A maioria dos microrganismos, especialmente aqueles que são responsáveis pela lesão de cárie (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp.) só podem sobreviver na boca quando conseguem se aderir às superfícies duras. Portanto, a rugosidade superficial das superfícies duras intrabuciais é importante no processo de retenção bacteriana (Quirynen et al.¹⁶ 1990, Svanberg et al.¹⁷ 1990, Bollen et al.¹⁸ 1997). Sendo o ideal que o material restaurador apresente propriedades mecânicas o mais próximas do esmalte dental (Heath, Wilson⁷ 1976, Mc Lean et al.¹ 1989, Xie et al.⁴ 2000).

A baixa resistência adesiva do material com o substrato dentinário também pode levar à consequências insatisfatórias, observadas clinicamente pela falta de anatomia adequada das restaurações, microinfiltração marginal e desenvolvimento de lesão de cárie. Esses efeitos negativos reduzem a longevidade das restaurações (Svanberg et al.¹⁷ 1990, Cho, Cheng¹⁹ 1999, Smales, Gao⁵ 2000).

A ação das metaloproteinases (MMPs) também tem sido relatada na literatura como um fator que interfere na longevidade da adesão do material restaurador ao substrato dentinário por interferir degradando a camada adesiva

formada (Carrilho et al.²⁰ 2007, Carrilho et al.²¹ 2007, Boushell et al.²² 2008, Imazato²³ 2009).

Levando em consideração a capacidade antibacteriana da clorexidina sobre o biofilme dental, que impede o crescimento dos microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento da cárie dental, assim como sua ação inibidora sobre as MMPs (Jones²⁴ 1997, Carrilho et al.²⁰ 2007, Carrilho et al.²¹ 2007, Imazato²³ 2009), sugeriu-se que a incorporação da clorexidina no cimento de ionômero de vidro possa melhorar o desempenho das restaurações com esse material, incorporando uma ação antimicrobiana (Takahashi et al.²⁵ 2006, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Isso modifica a visão atual do cimento de ionômero de vidro como material restaurador provisório, e consolida-o como um restaurador definitivo, bioativo, principalmente quando utilizado na técnica do Tratamento Restaurador Atraumático (ART). Diversos autores já relataram a incorporação de algum agente antimicrobiano no cimento de ionômero de vidro, descrevendo que houve o ganho imediato na propriedade antimicrobiana, sem relatos em longo prazo, porém com alterações das propriedades mecânicas, como resistência a compressão e tração diametral (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Tüzüner, Ulusu.³¹ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013).

Uma forma de disponibilizar fármacos com potencial de compatibilizá-los aos materiais odontológicos é a microencapsulação. As micropartículas poliméricas são formas farmacêuticas que permitem otimizar a biodisponibilidade das substâncias terapeuticamente ativas por meio de uma liberação prolongada e controlada (Ahmad et al.³² 2011).

Dessa forma, a incorporação da clorexidina viabiliza o ganho de propriedades antimicrobianas aos cimentos de ionômeros de vidro, entretanto com o inconveniente de reduzir as propriedades mecânicas do mesmo. Nesse sentido, surge a perspectiva de promover a microencapsulação desse fármaco, com o propósito de permitir uma liberação lenta do antimicrobiano, associada à manutenção das características físicas e de desempenho satisfatório do material odontológico. Portanto, neste trabalho, propõe-se um estudo laboratorial para (1) formular e avaliar micropartículas (met)acrílicas inovadoras de digluconato de clorexidina para serem adicionadas em cimentos de ionômeros de vidro e (2) investigar as propriedades

citotóxicas e mecânicas desses novos materiais, com potencial emprego em procedimentos restauradores, como o ART.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLOREXIDINA E MICROENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS

A clorexidina (Figura 1) é uma bisbiguanida catiônica sintética que contém, na sua estrutura, dois anéis clorofenólicos e dois grupos biguanida, ligados simetricamente por uma cadeia hexametilênica (Greenstein et al.³³ 1986). A clorexidina está geralmente disponível em três fórmulas químicas: digluconato, acetato e cloridrato (Grupta et al.³⁴ 2012). A bisbiguanida é uma base forte, carregada positivamente, praticamente insolúvel em água, sendo por isso indicado na Odontologia o uso na forma de sal digluconato, que proporciona maior solubilidade para a substância.

Por sua estrutura anfipática, a clorexidina, quando usada em alta concentração, tem extraordinário efeito bactericida e, em baixas concentrações, bacteriostático, afetando a integridade da membrana da bactéria. Sendo uma molécula catiônica, a clorexidina é atraída pela superfície bacteriana na qual é absorvida, promovendo a ruptura da membrana citoplasmática (Zorko, Jerala³⁵ 2008). Este fármaco tem sido muito utilizado como antisséptico na pele e produtos orais, devido às suas propriedades antibacterianas amplas. A resistência bacteriana à clorexidina é extremamente rara, o que faz com que o uso profilático de longo prazo seja possível (Campbell et al.³⁶ 2000).

Em relação às formulações bucais, a maioria dos estudos foi realizada utilizando o digluconato de clorexidina, devido à sua estabilidade, solubilidade em água e facilidade em se dissociar no pH fisiológico, apresentando a carga positiva (Mohammadi, Aboott³⁷ 2009). No entanto, quando usada em solução aquosa, a clorexidina mostra incompatibilidade com algumas substâncias, como o flúor, e pode causar danos em longo prazo para a cavidade bucal (desordem gustativa, erosão da mucosa bucal, pigmentação castanha de dentes e alguns materiais restauradores). A clorexidina também tem um sabor amargo, que é difícil de mascarar completamente, o que torna seu uso desagradável (Arnold et al.³⁸ 2008, Grupta et al.³⁴ 2012).

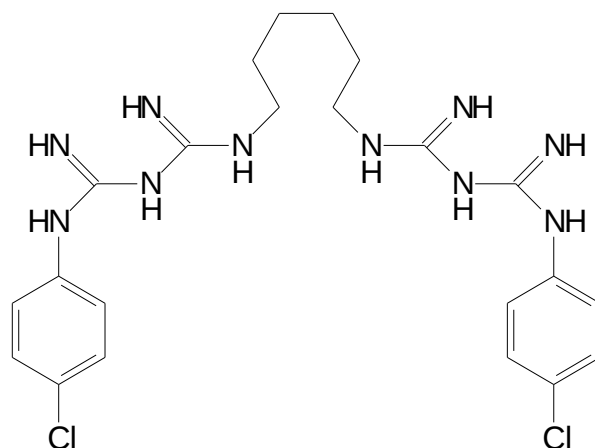


Figura 1 – Estrutura química da clorexidina

As micropartículas poliméricas são formas farmacêuticas que permitem a proteção do fármaco contra a ação de outras substâncias ou do ambiente, a eliminação de incompatibilidades, ou o mascaramento do sabor desagradável. As micropartículas são particularmente interessantes para o desenvolvimento de formulações de liberação controlada ou prolongada. Elas desempenham um papel importante como sistemas de carregamento de fármacos com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade em relação aos medicamentos convencionais e minimizar efeitos colaterais (Ahmad et al.³² 2011).

Vários métodos estão disponíveis para a microencapsulação de fármacos e um dos mais comumente utilizados é o de emulsão/evaporação do solvente (Ng et al.³⁹ 2010). Este procedimento pode ser realizado por meio de diferentes protocolos e a escolha da melhor opção depende das propriedades físicas e químicas do composto que se objetiva encapsular (Li et al.⁴⁰ 2008). Em geral, os compostos solúveis em água, incluindo as proteínas e os peptídeos, são encapsulados pela técnica de emulsão dupla/evaporação do solvente. No entanto, uma baixa eficiência de encapsulação é obtida utilizando esse procedimento, em particular para fármacos com baixa massa molecular e/ou de alta natureza hidrofílica, devido a uma migração substancial do fármaco a partir da emulsão primária para a fase aquosa externa durante a emulsificação e/ou evaporação do solvente (Farago et al.⁴¹ 2008).

Devido a essas dificuldades, poucos estudos foram realizados associando este método ao digluconato de clorexidina. Yue et al.⁴² (2004) prepararam micropartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico), contendo digluconato de clorexidina

e a sua associação com ciclodextrinas. Baixos valores de eficiência de encapsulação de 10,2, 11,5, e 6,1% foram obtidos para as micropartículas com digluconato de clorexidina, associação de digluconato de clorexidina e β -ciclodextrina-metilado e associação de digluconato de clorexidina e hidroxipropil- β -ciclodextrina, respectivamente.

Entretanto, no método de emulsão em meio não aquoso/evaporação do solvente orgânico, o polímero e fármaco são dissolvidos num solvente orgânico volátil e esta fase resultante é emulsionada numa fase oleosa (óleo mineral, óleo de semente de algodão ou de triglicerídeos), a qual é não-solvente para ambos, polímero e o fármaco, e geralmente contém uma adequada quantidade de emulsionante. O solvente volátil é removido totalmente da emulsão por extração em fase contínua e/ou evaporação (Naik et al.⁴³ 2012). Este procedimento é um método adequado para preparar micropartículas de uma vasta gama de fármacos hidrofílicos como pantoprazol de sódio sesqui-hidratado (Raffin et al.⁴⁴ 2006), ibuprofeno (Akhtar et al.⁴⁵ 2012), misoprostol (Akhtar et al.⁴⁵ 2012), cloridrato de metformina (Garud, Garud⁴⁶ 2012) e zidovudine (Nath et al.⁴⁷ 2011), além do digluconato de clorexidina, objeto do presente estudo.

Dentre os polímeros empregados para a microencapsulação de fármacos, destaca-se o uso dos polímeros (met)acrílicos, comercialmente conhecidos como Eudragit[®], amplamente difundidos na área farmacêutica, como agentes formadores de filmes. Esses materiais são pertencentes às séries E, L, S, RL, RS e NE30D, possuindo diferentes estruturas químicas, com variadas características de solubilidade (Kibbe⁴⁸ 2000). As séries L e S formam filmes insolúveis no meio ácido estomacal, atuando como revestimentos gastro-resistentes para comprimidos. De acordo com a composição química, o Eudragit[®] S100 apresenta solubilidade em valores de pH superiores a 7,0, condições em que forma sais com substâncias alcalinas (Labarre et al.⁴⁹ 2011). Esse polímero (Figura 2) é obtido da copolimerização por adição do ácido metacrílico e do metacrilato de metila, sendo que a proporção molar de grupos carboxila livre em relação ao grupamento éster é de aproximadamente 1:2 no Eudragit[®] S100 (Raffin et al.⁴⁴ 2006; United States Pharmacopeia⁵⁰ 2005).

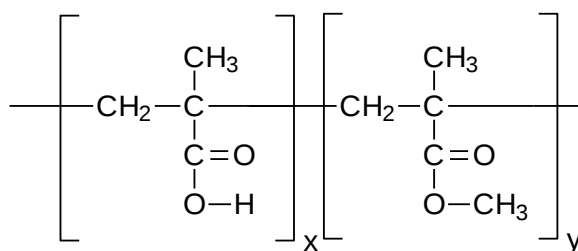


Figura 2 – Estrutura química do poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila)

Os materiais pertencentes à série Eudragit® RS formam filmes insolúveis em água, sendo indicados para a liberação sustentada de fármacos (Figura 3). São copolímeros contendo unidades de metacrilato de amônio, com proporção do grupo funcional amônio quaternário de 5 mol%. Os grupos amônio, presentes na forma de sais, conferem a característica de permeabilidade a esse polímero. Dessa forma, o material é insolúvel, porém permeável à água, permitindo que a liberação da substância ativa seja pH independente (Haznedar, Dourtnç⁵¹ 2004; Wu et al.⁵² 2003).

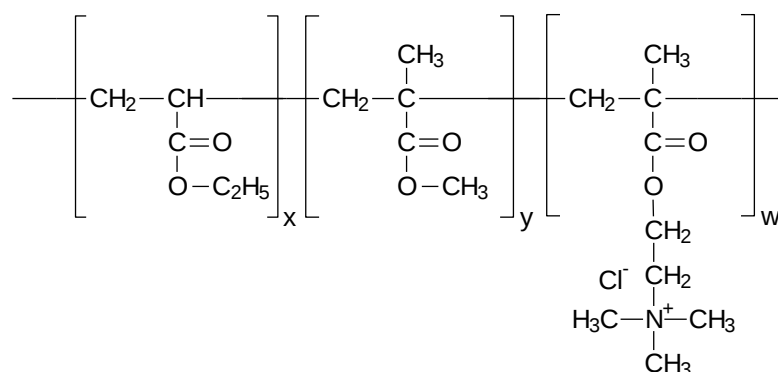


Figura 3 – Estrutura química do cloreto de poli(metacrilato de trimetilamonioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila)

2.2 CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO E ANTIMICROBIANOS

O cimento de ionômero de vidro consiste basicamente de um vidro aluminossilicato com alto conteúdo de íon fluoreto, interagindo com um ácido polialcenoico, numa reação de presa do material (reação ácido-base), em que a maior parte do processo de geleificação ocorre nas primeiras 48 horas (h) (Mc Lean et al.¹ 1989, Mount² 1996). As partículas de vidro estão intimamente relacionadas com as propriedades dos cimentos de ionômeros de vidro, tanto propriedades mecânicas, quanto a ação anticariogênica, que resulta principalmente do alto conteúdo de íon

fluoreto e a capacidade de troca iônica com a superfície (Gladys et al.¹³ 1997, Xie et al.⁴ 2000, Rodrigues et al.⁵³ 2005, Wiegand et al.⁵⁴ 2007).

O cimento de ionômero de vidro já passou por diversas alterações na formulação inicial com o objetivo de solucionar alguns inconvenientes como o longo tempo de presa, a baixa resistência mecânica e a alta sensibilidade às variações de umidade (sinérese e embebição). Com a adição de 20% de componentes orgânicos na forma de monômeros fotopolimerizáveis, ativados com luz visível, obteve-se um material com redução expressiva do tempo de trabalho, e melhoria das características de sinérese e embebição após a fotoativação (Mc Lean et al.¹ 1989, Mount² 1996). Em contrapartida os cimentos de ionômeros de vidro modificados por resina, como passaram a ser chamados, criaram a necessidade de um campo operatório livre de umidade durante a confecção da restauração e apresentaram alterações positivas e negativas das propriedades mecânicas (Momoi et al.⁹ 1996, Gladys et al.¹³ 1997, Xie et al.⁴ 2000, Rios et al.¹⁰ 2002, Cefaly et al.⁵⁵ 2003, Ellakuria et al.⁵⁶ 2003, Kalix et al.⁵⁷ 2004, Mondelli et al.¹¹ 2005).

No início dos anos 90, foi desenvolvido o cimento de ionômero de vidro condensável ou de alta viscosidade. Ele resulta de uma alteração na relação pó/líquido e na composição, sendo desenvolvido especialmente para uso em restaurações atraumáticas (ART), por apresentarem uma consistência que facilita a inserção na cavidade a ser restaurada e pelo endurecimento mais rápido (Mount² 1996, Frencken, Holmgren⁶ 1999). Estudos demonstraram que os cimentos de ionômeros de vidro de alta viscosidade apresentaram propriedades mecânicas superiores aos cimentos de ionômeros de vidro convencionais e modificados por resina (Momoi et al.⁹ 1997, Gladys et al.¹³ 1997, Cho, Cheng¹⁹ 1999, Xie et al.⁴ 2000, Rios et al.¹⁰ 2002, Kunzelmann et al.⁵⁸ 2003, Reinke et al.¹⁵ 2013).

Mesmo com o significativo avanço mencionado para aprimorar as propriedades mecânicas, físicas e de adesão dos cimentos ionoméricos, existe ainda a necessidade de melhoria do material para que possa ser utilizado em restaurações oclusoproximais amplas dentro da filosofia do ART (Frencken, Holmgren⁶ 2001) no sentido de apresentar maior longevidade. No ART, a remoção do tecido cariado é realizada manualmente, podendo a eficácia na eliminação do tecido infectado ser menor. As bactérias residuais podem permanecer por longo tempo, e se houver uma falha no vedamento realizado pelo material restaurador, desencadear uma reativação do processo carioso (Weerheijm, Groen³ 1999). Atualmente, as inovações guiam a

uma nova dimensão: o desenvolvimento de materiais com "função bioativa" para fornecer efeitos terapêuticos (Imazato²³ 2009). Autores têm sugerido a incorporação de antimicrobianos nos materiais restauradores, como sistemas adesivos, resinas compostas e cimento de ionômero de vidro, permitindo uma ação antimicrobiana na superfície do material, e na interface dente-restauração. Essa capacidade de controlar bactérias é vantajosa para eliminar o risco de desmineralização adicional e cavitação, uma vez que a cárie é uma doença infecciosa e a erradicação de bactérias cariogênicas compensa possíveis falhas, como remoção não completa do tecido infectado, futuras trincas e fraturas, não permitindo o desenvolvimento de lesões recorrentes (Takahashi et al.²⁵ 2006, Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Imazato²³ 2009, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Hiraishi et al.⁶⁰ 2010, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013).

Estudos prévios têm mencionado a incorporação de diferentes antimicrobianos, isolados ou combinados, no cimento de ionômero de vidro convencional ou de alta viscosidade (Takahashi et al.²⁵ 2006, Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012) e no cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Esses antimicrobianos foram normalmente incorporados ao pó do cimento de ionômero de vidro, como: diacetato de clorexidina com dicloridrato de clorexidina (Takahashi et al.²⁵ 2006), ciprofloxacina, metronidazol e minociclina (Yesilyurt et al.²⁹ 2009), diacetato de clorexidina com cetrimida (Tüzüner et al.²⁶ 2011), cetrimida, cloreto de cetilpiridínio (Tüzüner, Ulusu³¹ 2012), hclato de doxiciclina (Castilho et al.³⁰ 2012) e clorexidina (Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Entretanto, Tüzüner e Ulusu³¹ em 2012 relataram a incorporação do cloreto de benzalcônio ao líquido, diferindo da tendência de incluir o antimicrobiano ao pó do material.

A escolha por grande parte dos autores pela clorexidina, diferindo apenas no tipo de sal utilizado, está intimamente ligada aos diversos estudos que já demonstraram, ao longo dos anos, que ela é um agente antimicrobiano efetivo para o meio bucal. Usada principalmente no tratamento de gengivite, tem ação sobre o biofilme já formado e na inibição da recolonização do biofilme dentário, sendo considerada o padrão ouro dos bochechos antimicrobianos odontológicos (Jones²⁴ 1997, Yue et al.⁴² 2004, McCoy et al.⁶¹ 2008), e com a vantagem de não apresentar

risco do desenvolvimento de resistência como os outros antibióticos. Porém, na maior parte dos relatos da literatura, a clorexidina foi usada em sua forma pura, sem nenhum tratamento prévio para a incorporação no material, o que pode justificar sua eficácia maior nas primeiras horas, questionando-se, porém sua eficácia em longo prazo (Tüzüner et al.²⁶ 2011, Castilho et al.³⁰ 2012).

Além disso, a incorporação de agentes antimicrobianos pode causar alterações nas propriedades físicas e mecânicas do cimento de ionômero de vidro (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Sendo assim, torna-se importante a avaliação da ação antimicrobiana do material, bem como a avaliação de propriedades mecânicas, para fundamentar o uso clínico futuro. A perda de propriedades do material tem sido o maior problema encontrado pelos pesquisadores que desejam a incorporação dos antimicrobianos, tendo sido demonstrado que essa perda está intimamente ligada à concentração do antimicrobiano incorporado (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013).

2.3 PROPRIEDADES DO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

2.3.1 BIOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O conhecimento do efeito causado por materiais restauradores sobre as células é um dado importante para direcionar as suas indicações. Diversos estudos têm chamado a atenção para a relevância de se investigar o grau de biocompatibilidade dos materiais odontológicos, considerando este é um passo importante antes de sua aplicação clínica na cavidade bucal (Leyhausen et al.⁶² 1998, Six et al.⁶³ 2000, de Souza Costa et al.⁶⁴ 2003, Aranha et al.⁶⁵ 2006, de Souza Costa et al.⁶⁶ 2006, Lessa et al.⁶⁷ 2008, Giannelli et al.⁶⁸ 2008, Bakopoulou et al.⁶⁹ 2009). O material deve ser biocompatível, isto é, ter a capacidade de causar uma resposta biológica apropriada, principalmente em relação aos tecidos moles e pulpares, não contendo substâncias tóxicas que causem lesões a esses tecidos, nem alterações de natureza sistêmica (Wataha⁷⁰ 2001).

Sabendo-se da proximidade que a restauração com cimento de ionômero de vidro tem dos fibroblastos gengivais e das células de polpa dental, torna-se imperativa a avaliação da biocompatibilidade de materiais inovadores. Em geral os

cimentos de ionômeros de vidro são considerados pouco irritantes para o tecido pulpar, por possuírem em sua composição o poli(ácido acrílico), considerado um ácido fraco e macromoléculas de alta massa molecular, que tendem a unir-se com o cálcio dos dentes, limitando sua difusão para o interior dos canalículos dentinários (Baratieri et al.⁷¹ 1995, Leyhausen et al.⁶² 1998, Six et al.⁶³ 2000, de Souza Costa et al.⁶⁴ 2003, Aranha et al.⁶⁵ 2006, Lessa et al.⁶⁷ 2008, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013).

Trabalhos, que avaliaram os cimentos de ionômero de vidro demonstraram que o material apresentou maior citotoxicidade nas primeiras horas após sua manipulação. Verificou-se uma redução maior que 50% da viabilidade celular, possivelmente pelo baixo pH inicialmente após a reação de presa e/ou pela liberação de produtos tóxicos resultantes da reação de presa do material (Lessa et al.⁶⁷ 2008, Castilho et al.²⁸ 2013). Os estudos que avaliam a viabilidade celular utilizam a análise colorimétrica do metiltetrazólio (MTT), pois ela representa a taxa de atividade mitocondrial/citoplasmática das células pela demonstração citoquímica da desidrogenase succínica (Leyhausen et al.⁶² 1998, Aranha et al.⁶⁵ 2006, Lessa et al.⁶⁷ 2008, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013).

A incorporação de partículas resinosas nos cimentos de ionômeros de vidro melhorou algumas propriedades mecânicas do material, e principalmente possibilitou um melhor controle do tempo de trabalho. Porém, trabalhos demonstraram que a incorporação dessas partículas aumentou o efeito citotóxico do material. Nesses casos os efeitos citotóxicos elevados podem ser decorrentes de monômeros resinosos que não reagiram (de Souza Costa et al.⁶⁴ 2003, Aranha et al.⁶⁵ 2006, Lessa et al.⁶⁷ 2008, Bakopoulou et al.⁶⁹ 2009). Sendo assim, a incorporação de antimicrobianos pode resultar em um aumento da citotoxicidade do cimento de ionômero de vidro, igualmente devido à alteração da composição do material, levando à presença de resíduos após a reação de presa. Porém, os dados experimentais têm mantido a controvérsia em relação a esse aspecto.

Castilho et al.³⁰ (2012) incorporaram 1,5, 3,0 e 4,5% de hiclato de doxiciclina a um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, e avaliaram a citotoxicidade por meio de extratos, obtidos de cada amostra, sobre as células odontoblastoides durante 24 h. A avaliação da morfologia, do metabolismo com o ensaio do MTT e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) comprovaram que não houve nenhum efeito tóxico.

Castilho et al.²⁸ (2013) incorporaram clorexidina 0,2, 0,5, 1,25 e 2,5% em um cimento de ionômero de vidro modificado por resina e avaliaram a citotoxicidade de igual forma (MTT e MEV). Os autores verificaram que a concentração de 2,5% causava uma diminuição significativa da viabilidade celular, quando comparado ao controle. Porém, as baixas concentrações de clorexidina apresentaram uma tendência a estimular o metabolismo celular. Este trabalho demonstrou que a incorporação da clorexidina ao cimento de ionômero de vidro pode causar um aumento da citotoxicidade do material final, estando relacionado com a citotoxicidade da própria clorexidina.

Giannelli et al.⁶⁸ (2008) relataram em seu trabalho com fibroblastos, células endoteliais e osteoblastos, que a clorexidina afetou a viabilidade celular de forma dose-tempo-dependente. Seu efeito citotóxico consistiu na indução de apoptose e autofagia celular, distúrbios da função mitocondrial, aumento de cálcio intracelular e estresse oxidativo.

A ação antimicrobiana do cimento de ionômero de vidro é baixa, gerando assim o interesse da incorporação de um antimicrobiano ao material. Fato que torna essencial a avaliação dessa propriedade nos estudos que realizam a incorporação de antimicrobianos (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). O teste de difusão em ágar, com *Streptococcus mutans*, é o método mais comumente verificado nos artigos, por ser um teste de baixo custo e com rápida resposta na determinação dos efeitos antibacterianos (Takahashi et al.²⁵ 2006, Hiraishi et al.⁷² 2010, Tüzüner et al.²⁶ 2011).

Os trabalhos têm indicado que a incorporação dos antimicrobianos em diferentes concentrações é efetiva para dar ao material ionomérico a ação antimicrobiana sobre bactérias cariogênicas, principalmente sobre *Streptococcus mutans* em testes *in vitro* (Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). A duração do efeito microbiológico é proporcional à concentração de antimicrobiano incorporado ao material (Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Castilho et al.³⁰ 2012). Nos trabalhos, há controvérsias em relação à ação de inibição bacteriana ser também proporcional à concentração do fármaco. A maior parte dos estudos verificou essa relação (Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013) sendo que somente Takahashi et al.²⁵ (2006) apresentou resultados em desacordo entre os artigos revisados.

O período de avaliação dos efeitos microbiológicos, na maioria das investigações, foi entre 24 e 48 h, demonstrando ser um período suficiente para a avaliação com *Streptococcus mutans* (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Castilho et al.²⁸ 2013). No entanto, Tüzüner et al.²⁶ (2011) realizaram a avaliação de cimentos de ionômeros de vidro convencionais de alta viscosidade contendo diacetato de clorexidina/cetrimida (2,5/ 2,5%) contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, sendo as culturas examinadas com 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Foram encontradas diferenças entre os materiais experimentais em relação aos níveis de *Streptococcus mutans* nos dias 1, 7 e 60, bem como para *Lactobacillus casei* em todos os períodos de tempo ($p < 0,05$). Ambos os materiais experimentais exibiram um contínuo efeito antibacteriano até 90 dias.

2.3.2 LIBERAÇÃO DE ÍON FLUORETO

O íon fluoreto liberado pelo cimento de ionômero de vidro é o principal responsável pela ação cariostática do material e sua capacidade de prevenir a lesão de cárie (Rodrigues et al.⁵³ 2005, Wiegand et al.⁵⁴ 2007). O íon fluoreto é captado pelo dente, reduz a desmineralização e aumenta a remineralização, além de interferir na formação do biofilme dental e na inibição do crescimento de microrganismos. A presença contínua de íon fluoreto, mesmo em baixa concentração, é eficaz para inibir a desmineralização e favorecer a remineralização (Ten Cate⁷³ 1990, Ten Cate, Featherstone⁷⁴ 1991, Chaves, Vieira-da-Silva⁷⁵ 2002, Neelakantan et al.⁷⁶ 2011). A reação do íon fluoreto e da hidroxiapatita resulta na formação de fluorapatita, que devido ao arranjo espacial, é mais estável ao ataque ácido. Porém, estudos clínicos ainda são controversos em relação à efetividade do íon fluoreto liberado pelo material restaurador ao meio bucal (Wiegand et al.⁵⁴ 2007).

A liberação de íon fluoreto pode ser influenciada principalmente pelo valor do pH do meio bucal, sendo que em caso de lesões cariosas ativas, um meio com pH ácido, causa uma maior liberação de íon fluoreto, favorecendo a remineralização dessas lesões (Wiegand et al.⁵⁴ 2007, Markovic et al.⁷⁷ 2008). Markovic et al.⁷⁷ (2008) avaliaram a influência de meios de armazenamento com diferentes pH sobre a concentração de íon fluoreto na superfície de cinco cimentos de ionômeros de vidro. As alterações morfológicas nas superfícies dos materiais foram avaliadas por meio de MEV e técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

Os corpos-de-prova foram armazenados em quatro meios diferentes (I- solução salina, II- solução de pH= 2,5, III- solução de pH= 5,5, IV- solução de fluoreto de sódio). Após 7 dias, alguns corpos-de-prova foram transferidos do meio I, II e III para a solução de fluoreto de sódio (NaF) durante 3 min. Foram então realizadas as análises de MEV e EDS. As menores quantidades de íon fluoreto foram detectadas nas superfícies dos corpos-de-prova armazenados em ambientes de pH baixo. Após a imersão na solução de NaF, a concentração de íon fluoreto nas superfícies dos corpos-de-prova aumentou, quando comparado com os meios de armazenamento anteriores. O MEV revelou inúmeras lacunas, rachaduras e microporosidades em todos os materiais. Porém, foi observada uma estrutura mais homogênea nos corpos-de-prova armazenados em ambiente de pH neutro, quando comparada aos corpos-de-prova armazenados em soluções ácidas.

Outros aspectos importantes dos cimentos de ionômero de vidro são: sua capacidade de captação de íon fluoreto do meio bucal, armazenamento para posterior liberação, aumentando o tempo de liberação de íon fluoreto ao meio bucal (Wiegand et al.⁵⁴ 2007, Markovic et al.⁷⁷ 2008). Esta capacidade de recarga permite uma liberação em longo prazo, auxiliando a prevenir o desenvolvimento de lesão de cárie secundária, atuando sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* spp. na interface dente/restauração (Smales et al.⁵ 2000, Pedrini et al.⁷⁸ 2001, Wiegand et al.⁵⁴ 2007, Markovic et al.⁷⁷ 2008). Porém, Pedrini et al.⁷⁸ (2001) relataram que a maior atividade antimicrobiana do cimento de ionômero de vidro ocorre nos primeiros 4 dias, não sendo recuperada após a recarga de íon fluoreto.

A capacidade de recarga e liberação de íon fluoreto pode ser influenciada pela permeabilidade do material, concentração e tipo de fluoreto utilizado (Sá et al.⁷⁹ 2004, Wiegand et al.⁵⁴ 2007, Aguiar et al.⁸⁰ 2008, Markovic et al.⁷⁷ 2008, Silva et al.⁸¹ 2010). No estudo de Silva et al.⁸¹ (2010), foi avaliada a liberação de íon fluoreto de cimentos de ionômeros de vidro convencionais e modificados por resina, antes e após a recarga com NaF 2%. Os autores concluíram que todos os materiais estudados desenvolveram padrão semelhante de liberação de íon fluoreto, com liberação acentuada nos primeiros dias e decréscimo lento, mantendo nível constante até o décimo quarto dia. Além disso, verificaram que os cimentos de ionômeros de vidro convencionais liberaram maiores concentrações de íon fluoreto do que os cimentos de ionômeros de vidro modificados por resina. Após a aplicação tópica de NaF 2%, todos os cimentos de ionômeros de vidro aumentaram significativamente a

concentração de íon fluoreto liberado nas 24 h subsequentes, comprovando a capacidade de recarga desses materiais.

As modificações realizadas nos cimentos de ionômeros de vidro ocasionaram, em geral, alterações na capacidade de liberação e de recarga de íon fluoreto do material (Sá et al.⁷⁹ 2004, Aguiar et al.⁸⁰ 2008, Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Markovic et al.⁷⁷ 2008, Silva et al.⁸¹ 2010, Neelakantan et al.⁷⁶ 2011, Tüzüner et al.²⁶ 2011). Porém, em um trabalho, ocorreu apenas alterações na proporção pó/líquido (Bombonatti et al.⁸² 2003), sendo que a capacidade de liberação de íon fluoreto foi mantida em todos os momentos. Geralmente, a redução dessa capacidade está relacionada à modificação da matriz, aos mecanismos de conformação e ao conteúdo de íon fluoreto de cada material (Wiegand et al.⁵⁴ 2007). Tüzüner et al.²⁶ (2011) avaliaram a liberação de íon fluoreto de dois cimentos de ionômeros de vidro convencionais de alta viscosidade com incorporação de diacetato de clorexidina+cetrimida (2,5 / 2,5%). Os corpos-de-prova ficaram armazenados em água destilada a 37°C, sendo analisada a liberação de íon fluoreto após 1, 7, 15 e 30 dias. As diferenças entre os materiais experimentais foi pequena, sendo encontradas maiores diferenças na comparação entre os materiais experimentais e os materiais controle. Foi possível verificar que ocorreu liberação de íon fluoreto durante todo o período de análise.

2.3.3 RESISTÊNCIA À ABRASÃO

O restabelecimento e manutenção da higiene bucal é um dos objetivos para que se realize um procedimento restaurador em um dente com lesão cáries. A higiene bucal é realizada pelo uso de escova dental e dentífrico, procedimento que poderá ocasionar desgaste nos dentes e/ou materiais restauradores. Isso ocorre em função da presença de agentes abrasivos nos dentífricos e pelas cerdas das escovas dentais. Por essa razão, os materiais restauradores necessitam apresentar resistência à abrasão, sendo demasiadamente importante a avaliação desta propriedade para novos materiais. Diversos estudos realizados, com o intuito de avaliar a abrasão, preconizaram o modelo de abrasão por escovação simulada (estudo *in vitro*) que possibilitou padronizar diversas variáveis como: técnica, força, velocidade e tempo de escovação (Mondelli et al.¹¹ 2005, Heintze et al.⁸³ 2006, Voronets et al.⁸⁴ 2008).

Sabe-se que o cimento de ionômero de vidro convencional de alta viscosidade apresenta resistência à abrasão menor que o esmalte dentário. Porém, é maior que a dentina e o cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Forss et al.⁸ 1991, Gladys et al.¹³ 1997, Momoi et al.⁹ 1997, Rios et al.¹⁰ 2002). Fato que demonstrou que a alteração na composição do material pode modificar significativamente suas propriedades.

As alterações ocasionadas pela abrasão, nos materiais restauradores, podem reduzir a longevidade das restaurações. É possível, com o passar do tempo, verificar-se clinicamente estas alterações. A falta de anatomia adequada, fraturas, microinfiltração e aumento da rugosidade superficial são as alterações mais comuns observadas nos materiais restauradores. Por isso, a alteração de massa, a rugosidade e a dureza superficial são os principais parâmetros usados para mensurar a resistência de materiais à abrasão pela escovação (Momoi et al.⁹ 1997, Rios et al.¹⁰ 2002, Mondelli et al.¹¹ 2005, Heintze et al.⁸³ 2006, Voronets et al.⁸⁴ 2008, Reinke et al.¹⁵ 2011).

A alteração de massa é medida em diferentes estudos que avaliaram a resistência à abrasão de materiais restauradores, sendo que quando se trabalha com materiais hidrofílicos é importante o controle da umidade durante o procedimento de pesagem. Esse passo é crucial quando se realiza estudos com o cimento de ionômero de vidro, em função da grande quantidade de água em sua composição. Já que nas primeiras 72 h, após iniciada a reação de presa, o mesmo sofre sinérese e embebição. Dessa forma, é necessário aguardar esse período até a estabilização da massa para iniciar a avaliação de resistência à abrasão (Rios et al.¹⁰ 2002, Mondelli et al.¹¹ 2005, Reinke et al.¹⁵ 2011).

O valor da rugosidade superficial é importante, uma vez que age diretamente no processo de retenção bacteriana e consequentemente no desenvolvimento do biofilme dental. Pois, os microrganismos necessitam aderir-se à superfície dentária para que seja desenvolvido o biofilme dental (Quirynen et al.¹⁶ 1990, Svanberg et al.¹⁷ 1990, Bollen et al.¹⁸ 1997). O valor de rugosidade limite, sugerido na literatura para iniciar a retenção bacteriana, é 0,2 μm . Assim, valores acima deste representam um maior acúmulo de biofilme e resultam em um maior risco de desenvolvimento de lesões de cárie e de inflamação periodontal (Bollen et al.¹⁸ 1997). Os estudos utilizaram a avaliação da rugosidade média aritmética (Ra) e rugosidade total (Rt) como parâmetros isolados ou associados para mensurar a

resistência à abrasão (Gladys et al.¹³ 1997, Rios et al.¹⁰ 2002, Mondelli et al.¹¹ 2005, Attin et al.⁸⁵ 2006, Silva, Zuanon⁸⁶ 2006, Reinke et al.¹⁵ 2011). Para realizar a medição, o equipamento possui uma ponta de diamante de alta precisão, que se desloca paralelamente à superfície do corpo-de-prova, gerando uma curva com variação de alturas e reproduzindo exatamente os vales e picos existentes na superfície do corpo-de-prova. Após obter esses dados, o rugosímetro calcula o perfil médio entre os vales e picos e gera o valor de Ra. A Rt é a distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais profundo no comprimento de avaliação (Perez et al.⁸⁷ 2009).

O valor da dureza superficial dos materiais restauradores é mais um parâmetro que está relacionado com a resistência do material, o qual está intimamente ligado ao risco de desadaptação e de fratura das restaurações. Além disso, é um dado importante para prever possíveis danos que a restauração pode causar aos dentes antagonistas. Por essa razão, o material restaurador deve ter o seu valor de dureza superficial o mais próximo do valor da dureza do esmalte dentário (Gladys et al.¹³ 1997, Xie et al.⁴ 2000, Voronets et al.⁸⁴ 2008). O valor de dureza superficial tem sido avaliado em estudos associados à resistência a abrasão (Gladys et al.¹³ 1997, Momoi et al.⁹ 1997, Reinke et al.¹⁵ 2011) e isoladamente, como parâmetro de comparação entre materiais (Xie et al.⁴ 2000, Ellakuria et al.⁵⁶ 2003, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012).

As diferenciadas modificações na composição dos cimentos de ionômeros de vidro resultaram em materiais com propriedades diferenciadas, como já relatadas, sendo demonstrado que os cimentos de ionômeros de vidro modificados por resina apresentaram valores de dureza menores que os cimentos de ionômeros de vidro convencionais de alta viscosidade (Gladys et al.¹³ 1997, Xie et al.⁴ 2000, Ellakuria et al.⁵⁶ 2003).

A adição de antimicrobianos nos cimentos de ionômeros de vidro ocasionou uma redução no valor de dureza do material, estando essa alteração relacionada ao tipo de antimicrobiano e à concentração do mesmo (Tüzüner et al.²⁶ 2011, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012). Tüzüner, Ulusu³¹(2012) avaliaram o efeito, na dureza Vickers (VHN), da adição de cetrimida, cloreto de benzalcônio e clorexidina nas concentrações de 1 e 2% em um cimento de ionômero de vidro convencional de alta viscosidade. As medidas foram realizadas após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento a 37°C em água destilada. Foram observadas diferenças significativas entre o material controle e os grupos experimentais em todos os

períodos de tempo. Os materiais experimentais apresentaram diferenças significativas entre os períodos de estudo, sendo que o valor de dureza apresentou redução nos valores após 7 dias, enquanto que o grupo controle continuou a aumentar a sua dureza. Os valores de dureza foram menores para os materiais experimentais com maior concentração de antimicrobiano.

2.3.4 PROPRIEDADES MECÂNICAS: COMPRESSÃO, TRAÇÃO DIAMETRAL E FLEXÃO

A avaliação das propriedades mecânicas dos materiais restauradores é importante para demonstrar o seu comportamento frente às forças que estarão expostos quando em uso. Os estudos que relataram a avaliação de propriedades mecânicas do cimento de ionômero de vidro, objetivando a comparação entre materiais já comercializados ou a alteração de cimentos de ionômeros de vidro, utilizaram, geralmente, como parâmetros a resistência à compressão (Xie et al.⁴ 2000, Kalix et al.⁵⁷ 2004, Corrêa, Ogasawara⁸⁸ 2006, Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013), à tração diametral (Xie et al.⁴ 2000, Cefaly et al.⁵⁵ 2003, Kalix et al.⁵⁷ 2004, Aguiar et al.⁷⁹ 2008, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013) e à flexão (Xie et al.⁴ 2000, Aguiar et al.⁷⁹ 2008).

Esses diferentes testes permitem uma reprodução das forças mastigatórias, que não são exercidas de igual forma sobre o material. Sendo assim, no teste de resistência à compressão, duas forças axiais são aplicadas sobre o material com direções opostas, aproximando sua estrutura molecular. O teste de resistência à tração diametral é uma adaptação do teste de resistência à tração, semelhante ao teste de compressão, porém exercendo uma tensão em todo longo eixo do material. Já o teste de resistência à flexão, mede simultaneamente as tensões de tração, compressão e cisalhamento, pois a tensão é exercida sobre um lado do corpo-de-prova (Xie et al.⁴ 2000, Aguiar et al.⁷⁹ 2008).

Novamente, os estudos já demonstraram que a alteração na composição do cimento de ionômero de vidro resultou em mudanças das suas propriedades mecânicas (Xie et al.⁴ 2000, Cefaly et al.⁵⁵ 2003, Corrêa, Ogasawara⁸⁸ 2006, Takahashi et al.²⁵ 2006, Aguiar et al.⁷⁹ 2008, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Entretanto, diferente do ocorrido com os outros

parâmetros já relatados, a incorporação de partículas resinosas nos cimentos de ionômeros de vidro ocasionou melhoria das propriedades mecânicas avaliadas. Possivelmente, resultante das ligações cruzadas entre os materiais resinosos (Xie et al.⁴ 2000, Cefaly et al.⁵⁵ 2003, Kalix et al.⁵⁷ 2004). Isso comprova a necessidade de investigar diversos parâmetros quando se objetiva modificar os materiais.

Os estudos que realizaram a incorporação de antimicrobianos e que realizaram avaliação de propriedades mecânicas optaram pela avaliação da resistência a compressão. Pois, é a força mais frequentemente exercida nos materiais restauradores (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). A maioria dos trabalhos fez a incorporação do antimicrobiano em cimentos de ionômeros de vidro modificados por resina (Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Takahashi et al.²⁵ (2006) incorporou o diacetato de clorexidina isolado ou associado com o dicloridrato de clorexidina ao pó do cimento de ionômero de vidro, nas concentrações de 1/0, 2/0, 3/0, 1/1 e 2/2% (diacetato de clorexidina/ dicloridrato de clorexidina). A resistência à compressão foi avaliada após 24 h e 7 dias, ocorrendo aumento após 7 dias para todos os grupos. Em particular, quando a incorporação de diacetato de clorexidina 1% foi feita isoladamente, não causou alteração negativa, em comparação com o controle, em ambos os momentos avaliados.

Yesilyurt et al.²⁹ (2009) incorporaram a associação de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina ao cimento de ionômero de vidro convencional de alta viscosidade nas concentrações de 1,5, 3,0 e 4,5%. A resistência à compressão foi avaliada após 24 h e 7 dias, demonstrando valores maiores após sete dias para todos os grupos. Os grupos experimentais apresentaram ainda, valores menores quando comparados com o controle, sendo essa diferença significativa para as concentrações de 3,0 e 4,5%.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas inovadoras de digluconato de clorexidina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Formular micropartículas (met)acrílicas inovadoras de digluconato de clorexidina;
- ✓ Avaliar o teor de digluconato de clorexidina presente nas formulações;
- ✓ Caracterizar os novos materiais por métodos morfológicos, térmicos e espectroscópicos;
- ✓ Avaliar o perfil de liberação do digluconato de clorexidina pelas micropartículas (met)acrílicas por meio do ensaio de dissolução;
- ✓ Estudar a atividade microbiológica das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina;
- ✓ Incorporar micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina em cimento de ionômero de vidro;
- ✓ Avaliar a biocompatibilidade dos cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina por meio de testes em cultura de células humanas;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina;
- ✓ Verificar a capacidade de liberação de íon fluoreto e de recarga dos cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina;
- ✓ Analisar a resistência à abrasão dos cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina por meio de alteração de massa, rugosidade superficial e dureza superficial, quando submetidos à escovação simulada;
- ✓ Avaliar as propriedades mecânicas de resistência à compressão, resistência à tração diametral e resistência à flexão dos cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa contou com o auxílio financeiro da Fundação Araucária, obtido pelo Edital 14/2009 do Programa de Apoio a Pesquisa Básica e Aplicada no valor de R\$ 16.734,11.

O presente trabalho foi desenvolvido em diferentes etapas, sendo que as mesmas estão sumarizadas no fluxograma apresentado na Figura 4.

4.1 MATERIAIS PARA ELABORAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

Os polímeros poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila) na razão de 1:2 e $\overline{M}_w = 135.000$ g/mol (Eudragit® S100) e cloreto de poli(metacrilato de trimetilamonioetila-co-metacrilato de metila-co-acrilato de etila) na razão de 1:2:0,1 e $\overline{M}_w = 150.000$ g/mol (Eudragit® RS100) foram gentilmente cedidos pela Röhm Pharma Polymers (Darmstadt, Alemanha). O digluconato de clorexidina foi fornecido como solução aquosa a 20% (m/V) pela Galena (São Paulo, Brasil). Os outros solventes e reagentes apresentaram grau analítico e foram utilizados como recebidos.

4.2 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

Esta etapa foi realizada nos laboratórios do Programa de Pós-graduação mestrado em Ciências Farmacêuticas e mestrado/doutorado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina foram elaboradas pelo método de emulsão em meio não-aquoso/evaporação do solvente orgânico, a partir de dois polímeros (met)acrílicos amplamente difundidos no meio farmacêutico, Eudragit® S100 e Eudragit® RS100. Esses polímeros foram selecionados, pois na composição do cimento de ionômero de vidro já há previamente o Eudragit®, acreditando-se, dessa forma que os mesmos apresentariam compatibilidade com o material. Para tanto, foram delineadas diferentes diferentes formulações (Tabela 1), empregando o digluconato de

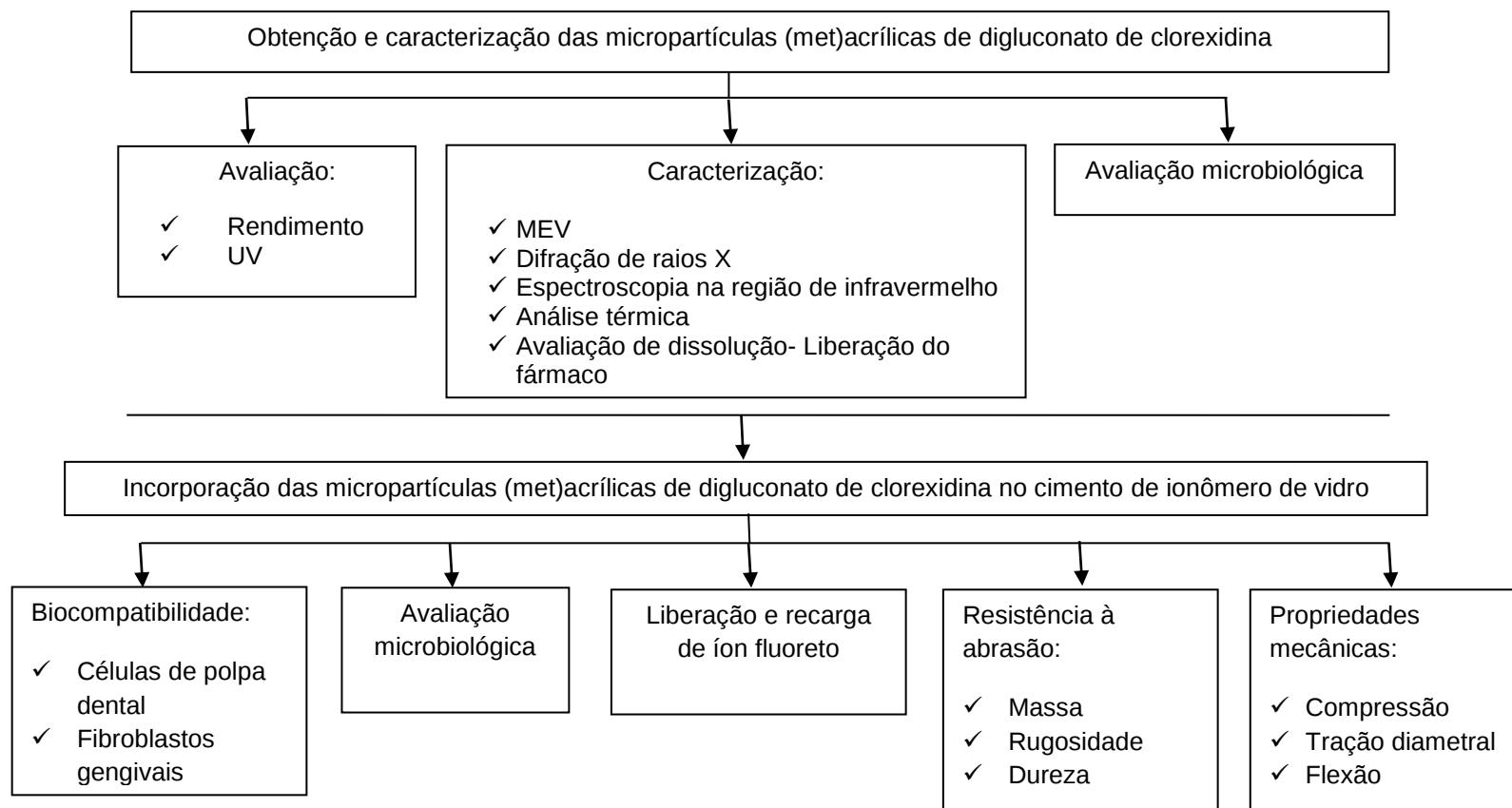


Figura 4- Fluxograma do estudo

clorexidina (Clx Dg) nas concentrações de 0, 10 e 25%.

Cada formulação foi elaborada em triplicata. De forma sintética, onde o Clx Dg e o polímero foram dissolvidos no(s) solvente(s) orgânico(s) adequado(s) por agitação magnética (800 rev/min), em temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após ser conservada por 12 h a $5 \pm 1^\circ\text{C}$, a fase interna (fase metanólica/acetônica) foi vertida sobre a fase externa (Monooleato de sorbitano Span® 80 e Vaselina líquida), mantendo a emulsão formada em agitação mecânica (1.000 rev/min), à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 6 h. Transcorrido o tempo para a evaporação do(s) solvente(s) orgânico(s), as micropartículas foram separadas por filtração à vácuo e lavadas, por 2 vezes, com 50 mL de ciclo-hexano, para a remoção do óleo mineral (vaselina líquida). Por fim, os produtos foram secos em estufa à vácuo a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 h e, posteriormente, mantidos em dessecador, sob vácuo, em temperatura ambiente (Figura 5).

Tabela 1 – Formulações das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

Composição	Formulações			
	MS10	MS25	MRS10	MRS25
Solução de digluconato de clorexidina 20% (mL)	0,50	1,25	0,50	1,25
Eudragit® S100 (g)	0,90	0,75	—	—
Eudragit® RS 100 (g)	—	—	0,90	0,75
Metanol (mL)	20,0	20,0	40,0	40,0
Acetona (mL)	20,0	20,0	—	—
Monooleato de sorbitano Span® 80 (g)	0,63	0,63	0,63	0,63
Vaselina líquida (mL)	200,0	200,0	200,0	200,0

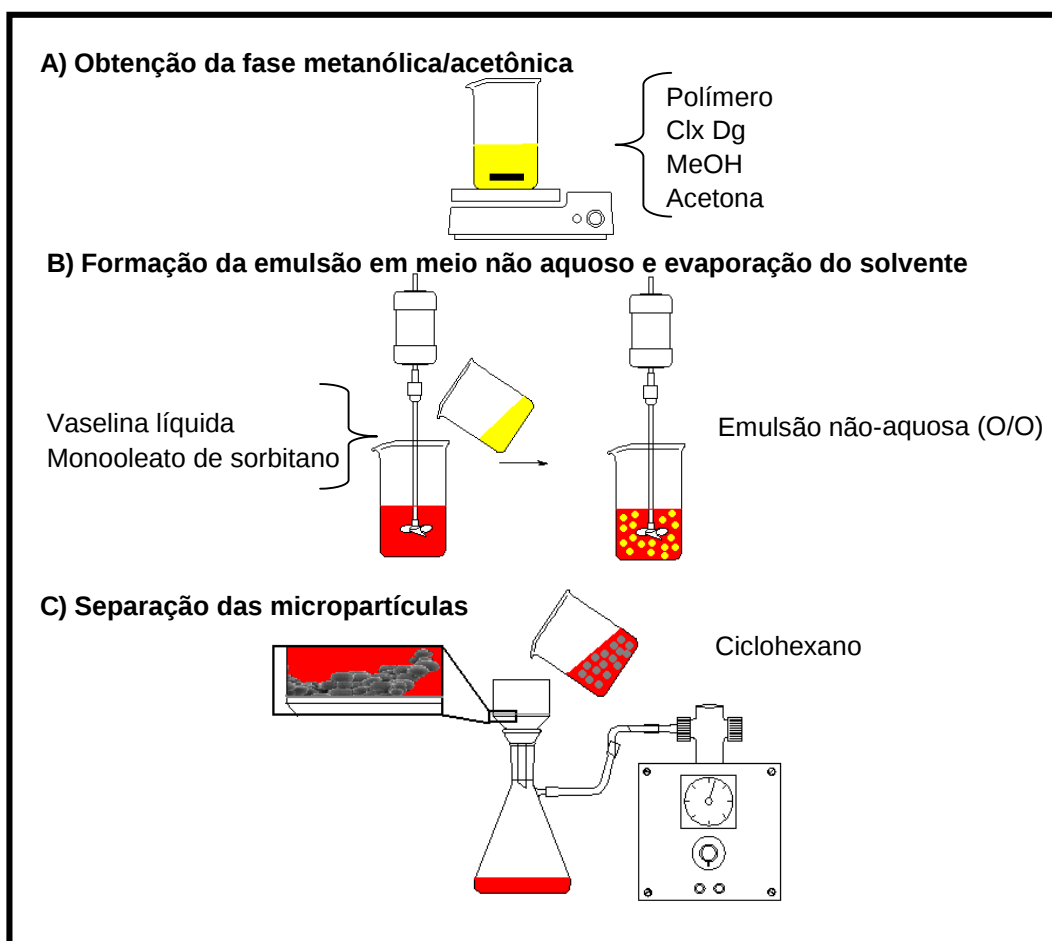


Figura 5 – Esquema de preparação das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina pelo método de emulsão em meio não-aquoso/evaporação do solvente

Mediante o emprego do mesmo procedimento, foram preparadas micropartículas na ausência do fármaco, designadas de MS0 e MRS0, representando as formulações controles correspondentes.

4.3 AVALIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

4.3.1 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO

Esta etapa foi realizada no laboratório do Programa de Pós-graduação mestrado/doutorado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para cada uma das formulações, o rendimento foi obtido pela razão entre a massa recuperada após a filtração das micropartículas (etapa final da

elaboração) pela soma das massas do polímero, do Clx Dg e do tensoativo (Monooleato de sorbitano, Span® 80), excluindo o Metanol/Acetona e a vaselina líquida, como indicado na Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa micropartículas}}{\text{massa}[\text{polímero} + \text{ClxDg} + \text{tensoativo}]} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS

Esta etapa foi realizada no laboratório de Química Farmacêutica e Controle da Qualidade do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A concentração de fármaco incorporado nas micropartículas (mg/g) e a eficiência de encapsulação (%) (Equação 2) foram obtidas a partir dos ensaios de quantificação desenvolvidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), em espectrofotômetro Genesys 10 UV Scanning (ThermoScientific Fisher, Madison, WI, EUA), com leitura em 255 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Esses ensaios foram feitos em triplicata para todos os produtos (ou materiais) obtidos. Previamente foi desenvolvida uma curva analítica, com dez níveis de concentração (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 µg/mL), utilizando água destilada como solvente ao sistema. Além disso, a equação de reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados. A validação do método de UV foi também realizada, por meio dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (International Conferencen Harmonisation⁸⁹). A faixa de concentração variou de 3,0 a 30,0 mg/mL. A linearidade foi de 0,9992 e o limite de detecção foi de 82,06 ng/mL.

$$EE = \left(\frac{\text{massa do fármaco nas micropartículas}}{\text{massa teórica do fármaco}} \right) \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Para cada formulação, uma massa exata de micropartículas equivalente a 30 mg de Clx Dg para cada formulação foi pesada e mantida sob agitação magnética (1000 rev/min) em 7 mL de água destilada, por 12 h, para extração total do fármaco. O volume foi completado, em balão volumétrico, com o mesmo solvente (água destilada), até 10 mL e filtrado por um filtro de membrana poli(fluoreto de vinilideno) (membrana Durapore™, tamanho de poros de 0,22 µm, Millipore, Bedford, MA, EUA). Em seguida, o filtrado foi diluído em balão volumétrico com água destilada. A concentração do ativo (Clx Dg) foi determinada por UV em 255 nm (United States Pharmacopeia⁵⁰ 2005), frente à curva analítica padrão obtida anteriormente, uma vez que este método tem sensibilidade analítica para a quantificação do fármaco presente nas micropartículas.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

4.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Esta etapa foi realizada no laboratório do Centro Interdisciplinar de Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A avaliação morfológica de superfície das micropartículas foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micropartículas foram levadas à estufa e, posteriormente, fixadas em suporte metálico. Na sequência, foram submetidas à metalização com ouro no equipamento IC-50 IonCoater (Shimadzu, Quioto, Japão). As micrografias foram obtidas após a visualização das amostras em microscópio eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (Shimadzu, Quioto, Japão) em uma voltagem de aceleração de 10 ou 15 kV com diferentes magnificações. A distribuição do tamanho das partículas foi estimada a partir da medida de cerca de 200 partículas, assumindo a forma esférica, que foram visualizadas em uma área escolhida arbitrariamente em micrografias ampliadas pelo software Image-Pro Plus (versão 3.0, Silver Springs, MD, EUA).

4.4.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Esta etapa foi realizada no laboratório do Centro Interdisciplinar de Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

As micropartículas que compõem os sistemas poliméricos, o fármaco Clx Dg e os polímeros foram examinadas em difratômetro de raios X Shimadzu XRD-6000 (Shimadzu, Quioto, Japão), scan de 5° a 50°, a uma taxa de varredura de 2°/min, utilizando uma fonte Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a 40 kV e 40 mA para a observação de picos indicativos de cristalinidade. Essa análise foi realizada com o propósito de se verificar se o fármaco estava na forma amorfa ou cristalina e trazer indícios sobre o tipo de sistema formado (microesfera ou microcápsula).

4.4.3 AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Esta etapa foi realizada no laboratório do Centro Interdisciplinar de Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Com o objetivo de avaliar o tipo da interação (física ou química) entre o fármaco e o polímero após a microencapsulação, as micropartículas (met)acrílicas foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Usou-se pastilha com KBr (Figura 6), empregando 0,0020 g de cada amostra e 0,20 g de KBr, no equipamento Shimadzu IR Prestige-21 (Shimadzu, Quioto, Japão), de 4000-400 cm^{-1} com 32 scans/min e resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos materiais foram avaliados frente aos espectros obtidos para o fármaco Clx Dg e para os polímeros de partida (Eudragit® S100 e Eudragit® RS100).

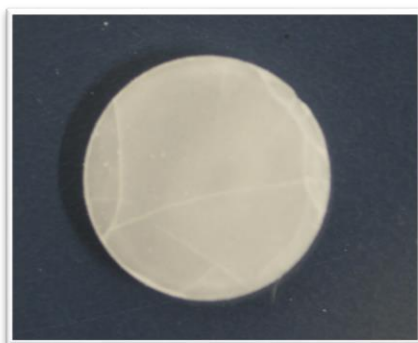


Figura 6 – Pastilha de KBr contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

4.4.4 ANÁLISE TÉRMICA

Esta etapa foi realizada no laboratório do Centro Interdisciplinar de Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Como o ambiente bucal sofre constantes alterações de temperatura, a degradação térmica das micropartículas foi investigada por termogravimetria (TG), sendo realizadas as medidas com o equipamento Shimadzu TGA-50 analisador termogravimétrico (Shimadzu, Quioto, Japão). A massa de cada amostra foi de 10 mg e as curvas termogravimétricas (TGA) foram registradas no decurso do aquecimento a partir da temperatura ambiente até 800°C, a uma taxa de 20°C/min utilizando uma atmosfera de ar sintético. Foi realizado o teste até 800°C para avaliar a estabilidade das micropartículas até valores extremos.

4.4.5 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO- LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

Esta etapa foi realizada no laboratório de Química Farmacêutica e Controle da Qualidade do curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

O estudo da liberação *in vitro*, em triplicata, foi conduzido para o Clx Dg e para as micropartículas (met)acrílicas contendo o fármaco, na forma de comprimidos, sem conter outros excipientes farmacêuticos, os comprimidos foram obtidos por compressão direta empregando 3 kgf/cm² por 2 min. O ensaio de dissolução foi conduzido em dissolutor de cubas Nova Ética 299/6 (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil), equipado com o aparato de pá, empregando cubas de vidro que foram mantidas em banho termostatzado a 37 ± 0,5°C, com agitação de 50 rev/min. A liberação do Clx Dg a partir das micropartículas foi avaliada em saliva artificial (NaF 0,0044 g/L, MgCl₂ 0,06 g/L, CaCl₂ 0,17 g/L, KCl 0,62 g/L, NaH₂PO₄.H₂O 4,82 g/L, Na₂HPO₄.7H₂O 4,04 g/L e H₂O para perfazer 1 L) com o objetivo de reproduzir o ambiente da cavidade bucal. Foi usado volume de 350 mL e em pH de 6,5 (Appel, Réus⁹⁰ 2003). A coleta das alíquotas provenientes do estudo de liberação foi realizada com pipetas (5 mL), nos intervalos de tempo pré-determinados de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360 min, totalizando 6 h de experimento, sendo filtradas em papel filtro de 0,45 µm de tamanho de poros (J Prolab,

São José dos Pinhais, Brasil), diluídas (quando necessário), e analisadas espectrofotometricamente a 255 nm no equipamento Genesys 10 Scanning UV (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA).

O valor da porcentagem de dissolução foi obtido a partir da quantidade de fármaco liberado. Um fator de correção foi aplicado devido à diluição cumulativa causada pela coleta das amostras, uma vez que a cada coleta foi reposto um volume igual de meio recentemente preparado.

4.4.5.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO

Os perfis de dissolução foram investigados por métodos modelo-dependentes, utilizando o software MicroMath Scientist® 2.01 (Salt Lake City, Utah, EUA). Os dados foram ajustados aos modelos monoexponencial, biexponencial, ordem zero e Weibull (Tabela 2). A seleção do modelo mais adequado foi baseada no valor do r , do critério de seleção do modelo (MSC) e do melhor ajuste gráfico.

Tabela 2 – Modelos matemáticos relacionados aos ensaios de dissolução

Modelo	Equação
Monoexponencial	$\%D = 100(1 - e^{-kt})$
Biexponencial	$\%D = 100[1 - (Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t})]$
Ordem zero	$\%D = kt$
Weibull	$\%D = 100[1 - e^{-(t/TD)^b}]$

Legenda: $\%D$ = porcentagem dissolvida, b = parâmetro de forma, TD = intervalo de tempo necessário para libertar 63,2% do fármaco, k , α e β = constantes cinéticas, t = tempo de dissolução, A e B = concentração inicial de fármaco que contribuem para as duas fases de dissolução

A fim de verificar o mecanismo de liberação do fármaco, uma equação simples e semi-empírica foi utilizada para descrever a referida liberação a partir dos sistemas poliméricos, a lei de potência ou modelo de Korsmeyer-Peppas (Equação 3).

$$ft = at^n \text{ (Equação 3)}$$

Onde ft é a fração de fármaco dissolvido no tempo t , n é o expoente de liberação, o qual indica o mecanismo da liberação do fármaco e a é uma constante que incorporam características estruturais e geométricas da forma farmacêutica.

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

Esta etapa foi realizada no laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Foi avaliado o potencial antimicrobiano das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina em comparação ao digluconato de clorexidina 0,12% - Periogard™ (Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brasil), considerado controle positivo e a solução salina estéril, considerada controle negativo. Inicialmente, foram preparadas suspensões padronizadas com os microrganismos *Candida albicans* ATCC 10231, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, correspondendo a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Inicialmente, as cepas dos microrganismos foram inoculadas em meio nutriente a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 h, com excessão dos *Streptococcus* que foram armazenados em ambiente de anaerobiose a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h, até atingir a fase exponencial de crescimento. Em seguida, a suspensão bacteriana foi preparada diluindo colônias em 3 mL de salina estéril, centrifugada a 4000 RPM durante 1 min, sendo ajustada pelo método colorimétrico a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

As suspensões foram semeadas pela técnica de *pour-plate*, em ágar Müeller Hinton e ágar BHI + 5% de sangue de carneiro, sendo o último utilizado para os *Streptococcus*. Em seguida, foram feitas as cavidades (poços) de 7 mm de diâmetro no ágar, que posteriormente receberam os produtos a serem testados. As placas de Petry foram incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 10 min para secagem. Após, uma massa igual a 300 µg de digluconato de clorexidina, a partir de cada formulação, foi depositada em cada cavidade, em seguida, 20 µL de solução salina foi colocada para umedecer as micropartículas. As placas foram novamente incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 h, em condições de aerobiose para *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, já os *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus mutans* foram incubados em condição de anaerobiose. Transcorrido esse tempo, foi aferido o halo de inibição do crescimento

microbiano, quando presente, com o auxílio de um paquímetro digital Absolute Mitutoyo 500-171-20B (Mitutoyo, Kawasaki, Japão) e de lupa Standard Estek (Estek, São Paulo, Brasil). Os testes foram realizados em triplicada.

4.6 INCORPORAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

Esta etapa foi realizada no laboratório do Programa de Pós-graduação mestrado/doutorado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Com base nas etapas de avaliação, caracterização e de avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina, as duas formulações com resultados mais adequados foram adicionadas pela técnica de incorporação geométrica ao pó do cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Ketac™ Molar Easymix, 3M Espe, St Paul, MN-EUA) para obter uma concentração de 20% de micropartículas no cimento de ionômero de vidro, com 5% de Clx Dg. Além disso, esse material foi considerado como material controle. Foram utilizadas as micropartículas (met)acrílicas contendo 25% de digluconato de clorexidina formuladas com Eudragit® S100 (MS25) e Eudragit® RS100 (MRS25). Em todas as etapas, os cimentos de ionômeros de vidro (experimentais e controle) foram manipulados conforme as instruções do fabricante do Ketac™ Molar Easymix (Quadro 1 e Figura 7), sendo que o ambiente de trabalho foi mantido em uma temperatura controlada de 23 ± 1 °C.

Quadro 1- Marca comercial, fabricante, lote, composição e manipulação do material testado

Marca Comercial	Fabricante	Lote	Composição	Manipulação
Ketac™ Molar Easymix	3M ESPE (St. Paul, MN-EUA)	429345	Pó: Vidro de fluorsilicato de alumínio, lantânio e cálcio, poli(ácido acrílico), Eudragit®, ácido tartárico, ácido sórbico, ácido benzoico. Líquido: Água, copolímero de ácido acrílico e ácido maleico, ácido tartárico e ácido benzoico.	Agitar previamente o frasco para soltar o pó; a proporção da mistura é 1 colher de pó: 1 gota do líquido. Manipular à temperatura ambiente de 20-25°C. Aglutinar o pó no líquido em, no máximo, 2 porções, até obter uma consistência homogênea.



Figura 7- Cimento de ionômero de vidro, usado como controle e como base para a incorporação das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

A avaliação dos novos materiais seguiu o delineamento apresentado na Figura 8.

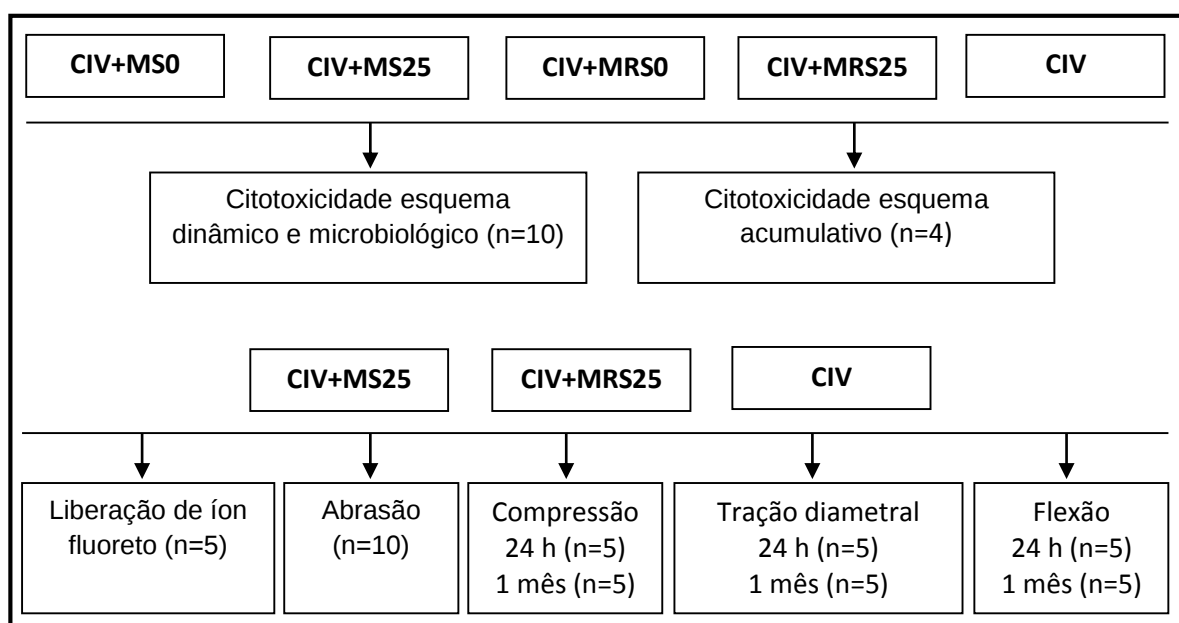


Figura 8- Delineamento dos testes para a avaliação dos novos materiais

4.7 AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE

Este teste foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular, da Faculdade de Medicina Dentária, na Universidade do Porto, Portugal, durante o período de Doutorado Sanduíche pelo Programa PDSE.

Com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade dos materiais, foi realizado o ensaio em cultura de células de polpa dental humana e de fibroblastos gengivais humanos (cultura primária), avaliando a citotoxicidade de forma direta e indireta. As células foram obtidas por meio de cultura primária e utilizou-se como materiais controle o cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade puro e incorporado com as micropartículas sem Clx Dg (MS0 e MRS0). Para isso foram confeccionados corpos-de-prova de 4 mm/1 mm (Figura 9), utilizando um molde metálico. Os moldes foram lubrificados com vaselina sólida (Miyako do Brasil, São Paulo, Brasil) e apoiado em uma tira de poliéster (TDV Dental, Pomerode, Brasil) sobre uma placa de vidro. A inserção foi realizada em único incremento, sendo todos os materiais manipulados de acordo com as instruções do fabricante (Quadro 1). Os cimentos de ionômeros de vidro foram inseridos no molde com uma espátula de inserção. Após completo preenchimento do molde, o cimento de ionômero de vidro foi coberto com tira de poliéster. Em seguida, o material foi pressionado com uma placa de vidro, por 1 min, para extravasar o excesso e padronizar a superfície com a maior lisura possível, enquanto aguardava-se a sua geleificação.

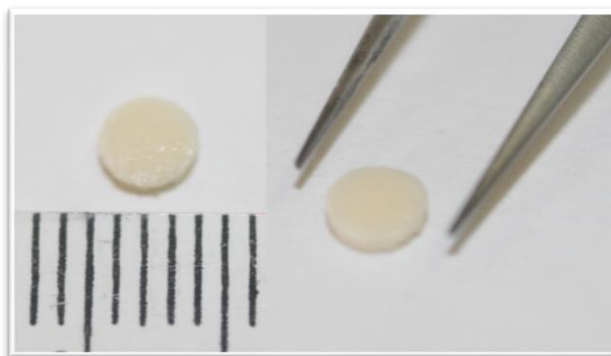


Figura 9- Corpo-de-prova para a avaliação da biocompatibilidade celular dos materiais

Após 1 h os corpos-de-prova receberam um acabamento com tiras de lixa de poliéster, para se obter extremidades lisas. Em seguida os corpos-de-prova foram esterilizados por óxido de etileno e posteriormente, em ambiente adequado (câmara de fluxo laminar) foram armazenados em meio de cultura contendo 88% de α -MEM (meio essencial mínimo, modificação alfa), 1% de penicilina e 1% de fungicida, sendo que os 10% de soro fetal bovino foram incluídos somente no momento de semeadura das células.

Foram realizados dois esquemas de trocas dos meios de cultura, um dinâmico e outro, acumulativo. Em ambos foram avaliadas as citotoxicidades direta

(semeando as células diretamente sobre os corpos-de-prova) e indireta (uso do meio de cultura no qual os corpos-de-prova foram armazenados previamente).

4.7.1 ESQUEMA DINÂMICO

Nesse estudo 10 corpos-de-prova foram armazenados em 1000 μL de meio de cultura. Em cada tempo pré-determinado (1, 2, 4 e 8 h, 1, 2, 4 e 7 dias) foram realizadas trocas do meio de cultura. Esses meios, após serem removidos, foram utilizados para incubar as células de fibroblastos gengivais humanos, caracterizando uma avaliação de citotoxicidade indireta. Sobre os corpos-de-prova foram também semeadas células de fibroblastos gengivais humanos, caracterizando a avaliação de citotoxicidade direta.

Em ambos os casos, os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando placas de 96 poços, nas quais foram adicionados 100 μL de meio por poço.

Para avaliar a citotoxicidade indireta, foram semeados fibroblastos gengivais humanos na concentração de 10^4 cel/cm^2 , sendo que as placas de 96 poços foram armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por três dias. Após esse período, foram realizadas as avaliações pelo método MTT, para comprovar a fixação e o crescimento dos fibroblastos gengivais humanos. Neste momento foi realizada a troca do meio, utilizando os meios de cultura (90%) armazenados previamente com o acréscimo de soro fetal bovino (10%).

Para a avaliação de citotoxicidade direta, foram colocados os corpos-de-prova com a face mais lisa voltada para cima em placas de 96 poços. Em seguida, foram semeados 100 μL de meio de cultura com células de fibroblastos gengivais humanos, na concentração de $10 \times 10^4 \text{ cel/cm}^2$. Usou-se somente semeadura com as células como controle nos poços, sem os corpos-de-prova.

Após 1 e 4 dias, o meio de cultura foi removido e a viabilidade celular foi avaliada por meio do MTT. Depois de aspirados os meios de cultura, de cada poço, foram aplicados 10 μL de MTT que permaneceu reagindo por 3 h. Concluído esse período, o MTT foi aspirado e aplicado tampão fosfato salino (PBS) para lavar os poços. Um volume de 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço e homogeneizou-se com o auxílio de pipeta. Efetuando-se uma análise espectrofotométrica do corante incorporado, empregando um leitor de microplacas (Biotech, Winooski, EUA) no comprimento de onda de 550 nm, sendo utilizado como

valor de branco o DMSO. Afim de se obter o valor somente do crescimento sobre os corpos-de-prova, os mesmos foram retirados após lavagem com PBS, colocados em outra placa de 96 poços, sendo adicionados 100 µL de DMSO por poço, o qual permaneceu por 1 h. Após esse tempo o DMSO foi retirado com o auxílio de pipeta e colocado em nova placa para leitura em 550 nm.

4.7.2 ESQUEMA ACUMULATIVO

Nesse experimento foram armazenados 4 corpos-de-prova em 400 µL de meio de cultura por cada tempo pré-determinado (1 e 4 h, 1, 3, 7 e 14 dias). Após a remoção desses meios, os mesmos foram utilizados para incubar as células de polpa dental humana, caracterizando uma avaliação de citotoxicidade indireta. Sobre os corpos-de-prova, foram semeadas células de fibroblasto gengival humano, caracterizando a avaliação de citotoxicidade direta.

Em ambos os casos, foram realizados os ensaios em triplicata, utilizando placas de 96 poços, nas quais foram utilizados 100 µL de meio por poço.

Para avaliar a citotoxicidade indireta, foram semeadas células de polpa dental humana na concentração de 2×10^4 cel/cm² em placas de 96 poços, as quais foram armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, foi efetuada a avaliação com o MTT para comprovar a fixação e o crescimento das células de polpa dental humana. Neste momento foi realizada a troca do meio, utilizando os meios de cultura (90%) armazenados previamente acrescidos de soro fetal bovino (10%).

Para a avaliação de citotoxicidade direta, foram colocados os corpos-de-prova com a face mais lisa voltada para cima em placas de 96 poços e semeados 100 µL de meio de cultura com células de fibroblasto gengival humano, na concentração de 10×10^4 cel/cm². Células semeadas diretamente na placa sem os corpos-de-prova foram usadas como controle.

Transcorrido um dia, foi removido o meio de cultura e a viabilidade celular das células de polpa dental humana foi avaliada por meio do método colorimétrico do MTT. Depois que os meios de cultura foram aspirados, de cada poço, foram aplicados 10 µL de MTT que permaneceu reagindo durante 3 h. Após esse período, o MTT foi aspirado e adicionado PBS para lavar os poços. Após, 100 µL de DMSO foi colocado em cada poço e homogeneizado com o auxílio de pipeta. A análise

espectrofotométrica do corante incorporado foi efetuada empregando um leitor de microplacas (Biotech, Winooski, EUA) no comprimento de onda de 550 nm, sendo utilizado DMSO puro como branco. Para a obtenção dos valores da viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos, quando do crescimento somente sobre os corpos-de-prova, os mesmos foram retirados após lavagem com PBS. Em seguida foram colocados em outra placa de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de DMSO. Após 3 h, o DMSO foi retirado com o auxílio de pipeta e colocado em nova placa para a leitura em 550 nm.

4.8 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS CIMENTOS DE IONÔMEROS DE VIDRO

Os meios de cultura armazenados no esquema dinâmico nos tempos experimentais de 1, 2, 4 e 8 h, 1, 2, 4 e 7 dias, foram também utilizados para o teste microbiológico contra *Streptococcus mutans*, a fim de comprovar a atividade antimicrobiana dos cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas met(acrílicas) de digluconato de clorexidina. A avaliação do crescimento bacteriano ocorreu por meio da leitura de absorvância, em comprimento de onda de 600 nm. Uma suspensão antimicrobiana (Cennoxícime Sys) foi utilizada como controle positivo.

Inicialmente, cepas de *Streptococcus mutans* foram inoculadas em caldo de tripton de soja (TSB) a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, por 18 h, até atingir a fase exponencial de crescimento. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4000 RPM durante 15 min, sendo resuspendida em caldo Müller Hinton por duas vezes, ajustada para uma densidade óptica (600 nm) de 4×10^6 UFC/mL. Para a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e da concentração mínima bactericida (MBC), a cultura microbiológica foi realizada em placas de 96 poços. Por tanto, em cada poço, 50 µL de suspensão bacteriana e 50 µL de cada meio de cultura previamente armazenado foram adicionados. As placas foram incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 e 48 h, em estufa, em condição de anaerobiose.

A leitura da turbidimetria visível a 600 nm foi realizada após 24 h, empregando um leitor de microplacas (Biotech, Winooski, EUA). Das concentrações (meios de cultura previamente armazenados) que não apresentaram crescimento visível, 50 µL foram semeados em placas de Petri com ágar Müller Hinton, com auxílio de pipeta e swab. Essas placas foram armazenadas em anaerobiose,

produzida com o auxílio de um gerador de atmosfera GENbox Microaer (Bio-Merieux S.A., Marcy l'Etoile, França), em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

A leitura do número de colônias formadas nas placas de Petri foi realizada após período de 48 h.

4.9 LIBERAÇÃO E RECARGA DE ÍON FLUORETO

Esta etapa foi realizada no laboratório do Programa de Pós-graduação mestrado/doutorado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para comprovar se não houve interação do digluconato de clorexidina com o íon fluoreto, foi medida a liberação de íon fluoreto a partir de cinco corpos-de-prova por material. Os corpos-de-prova foram confeccionados em matriz plástica, medindo 8,0 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura. Uma fina camada de vaselina sólida (Miyako do Brasil, São Paulo, Brasil) foi aplicada na porção interna do molde com um pincel. O molde (Figura 10) foi colocado sobre uma tira de poliéster (TDV Dental, Pomerode, Brasil) que foi fixada sobre uma placa de vidro. O material foi inserido levemente, em único incremento na matriz, com auxílio de seringa descartável Medinject 1 mL (Med Goldman, Manaus, Brasil) para que não fossem incluídas bolhas de ar no interior da amostra. Em seguida, foi colocado um pedaço de fio dental, seguido por outra tira de poliéster sobre o molde preenchido e, sobre esta foi colocada outra placa de vidro espessa, sendo feita pressão durante 1 min. O fio dental foi incluído para permitir que o corpo-de-prova ficasse suspenso durante o armazenamento, sem ter contato com as paredes do recipiente de armazenagem.

Depois da confecção dos corpos-de-prova, os mesmos foram protegidos com vaselina sólida e aguardou-se 1 h para serem armazenados em frascos individuais, identificados, com 5 mL de água deionizada. A armazenagem foi feita em estufa, regulada à temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, na qual os recipientes permaneceram durante os períodos de tempo entre as leituras. Nos tempos pré-determinados (1, 2, 7 e 14 dias), foi avaliada a concentração de íon fluoreto presente na água deionizada, sendo que a mesma foi trocada a cada tempo de análise.

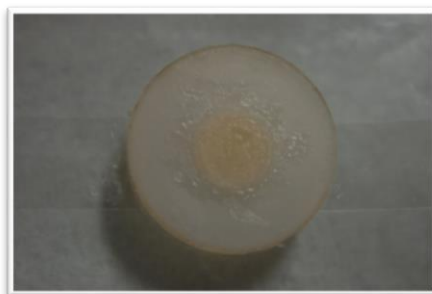


Figura 10- Molde e corpo-de-prova para a avaliação da capacidade de liberação e recarga de íon fluoreto

A mensuração da liberação de íon fluoreto foi realizada por meio de um eletrodo específico para esse íon (Orion, modelo 96-09), acoplado ao aparelho analisador de pH/fluoretos (Orion 4Star ph-Ise Thermo Electron Comporation, Marietta, OH, EUA). Previamente à realização das determinações, o equipamento foi calibrado em cinco pontos, sendo ainda, a cada medida, recalibrado com duas soluções padrão de fluoreto de sódio a 1 e 10 ppm, preparadas com TISAB II (solução tampão para ajuste da força iônica total). Nos recipientes onde os corpos-de-prova foram armazenados misturou-se 0,5 mL de TISAB II e 0,5 mL de água destilada, com o objetivo de realizar a leitura da quantidade de íon fluoreto liberado.

Após 14 dias, os corpos-de-prova foram secos com papel absorvente. Aplicou-se sobre eles gel de fluoreto de sódio neutro a 2% (DFL, Rio de Janeiro, Brasil) por 4 min, com auxílio de pinça clínica e algodão. Após esse período de tempo, os corpos-de-prova foram lavados em água deionizada, secos e imersos em 5 mL de água deionizada. Realizou-se nova leitura, após 24 h, para confirmar a capacidade de recarga de íons fluoreto dos materiais.

4.10 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ABRASÃO

Esta etapa foi realizada no laboratório do Programa de Pós-graduação mestrado/doutorado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A fim de confirmar a manutenção da qualidade dos cimentos de ionômeros de vidro, foi realizada a avaliação da resistência à abrasão por meio dos parâmetros: alteração de massa, rugosidade superficial e dureza superficial. Essas propriedades foram determinadas antes e após a escovação simulada.

Foram confeccionados 10 corpos-de-prova de cada material, medindo 5 mm de espessura e 6 mm de diâmetro (Figura 11). Para a confecção dos corpos-de-prova dos cimentos de ionômeros de vidro, o molde foi lubrificado com vaselina sólida (Miyako do Brasil, São Paulo, Brasil) e apoiou-se em uma tira de poliéster (TDV Dental, Pomerode, Brasil) sobre uma placa de vidro. A manipulação do cimento de ionômero de vidro foi realizada conforme as instruções do fabricante do material controle (Quadro 1) e a inserção sendo feita no molde em único incremento, com o auxílio de uma seringa descartável Medinject 1 mL (Med Goldman, Manaus, Brasil). Após o completo preenchimento do molde, o cimento de ionômero de vidro foi coberto com uma tira de poliéster, e, em seguida, pressionado com uma placa de vidro espessa por 1 min, para extravasar o excesso de material e padronizar a superfície, com a maior lisura possível, enquanto aguardou-se a sua geleificação.

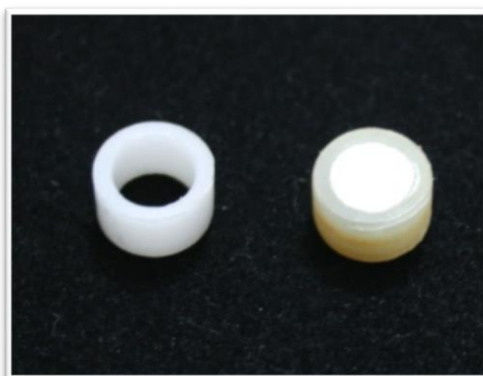


Figura 11- Molde e corpo-de-prova para a avaliação de resistência à abrasão

Os corpos-de-prova foram recobertos com vaselina sólida para a proteção dos cimentos de ionômeros de vidro, evitando a sinérese e a embebição. Após 1 h da sua confecção, os corpos-de-prova foram imersos em água destilada e mantidos em recipientes individuais, devidamente identificados. O armazenamento ocorreu em estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ até a estabilização de massa (inicial e final) dos materiais, verificada por meio de pesagens em balança de precisão modelo AW 220 (Shimadzu do Brasil, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,0002 g.

Os corpos-de-prova foram manipulados, em todas as etapas, com pinça clínica universal, evitando-se contato das mãos, as quais poderiam contaminar os mesmos com oleosidade, capaz de interferir nos resultados. Todas as etapas foram realizadas em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo utilizado um termômetro de ambiente para a sua aferição (Incoterm, Porto Alegre, Brasil).

4.10.1 ALTERAÇÃO DE MASSA

A massa dos corpos-de-prova, expressa em gramas, foi obtida utilizando-se uma balança de precisão calibrada modelo AW 220 (Shimadzu do Brasil, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,0002 g. Para esse procedimento, os corpos-de-prova foram removidos de seus moldes e pesados a cada intervalo de 24 h, até que o valor obtido entre dois dias consecutivos tivesse uma variação máxima de 0,0002 g. Esse fato demonstra que não há mais alteração da massa dos corpos-de-prova. Por convenção, o valor determinado no último dia foi considerado o valor de massa inicial.

Para a pesagem diária, os corpos-de-prova foram secos com papel absorvente por 30 s. Em seguida, cada um deles foi posicionado na extremidade direita do prato da balança, no qual havia uma marcação e, durante a pesagem, a porta de acesso ao interior da balança permaneceu fechada para evitar a interferência do meio externo. A pesagem foi realizada até alcançar a estabilidade da massa dos corpos-de-prova, com variação aceitável de, no máximo, 0,0002 g. Quando foram verificados valores estáveis no mesmo dia, após as pesagens consecutivas, registrou-se a média dos últimos três valores, como massa do respectivo dia.

O valor de massa final foi obtido, após a escovação simulada empregando o mesmo procedimento.

4.10.2 ALTERAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A rugosidade superficial inicial foi verificada após ter sido atingida a estabilidade de massa dos corpos-de-prova. Utilizou-se um rugosímetro de contato modelo Surftest-301 (Mitutoyo, Japão) que foi calibrado pelo resultado da placa padrão em 9,50 μm para rugosidade total (R_t) e 2,95 μm para R_a . Além disso, foi regulado com *cut-off* de 0,25 mm, para minimizar a interferência de ondulação da superfície e com limite de medição de 1,25 mm.

Foram realizadas cinco leituras, distribuídas sobre o corpo-de-prova, tendo como referência o centro do mesmo. Tentou-se dessa forma abranger o máximo de sua extensão para obter o valor de rugosidade média aritmética (R_a) e rugosidade total (R_t), conforme demonstrado na Figura 12. A rugosidade R_a e R_t inicial de cada

corpo-de-prova foi obtida calculando-se a média aritmética dos cinco valores de Ra e Rt, respectivamente.

Demarcou-se a superfície na qual foram realizadas as leituras iniciais e esse lado foi submetido ao contato com as cerdas das escovas dentais durante a escovação simulada. O valor da rugosidade superficial final foi obtido após a escovação simulada, da mesma forma adotada antes do procedimento de abrasão.

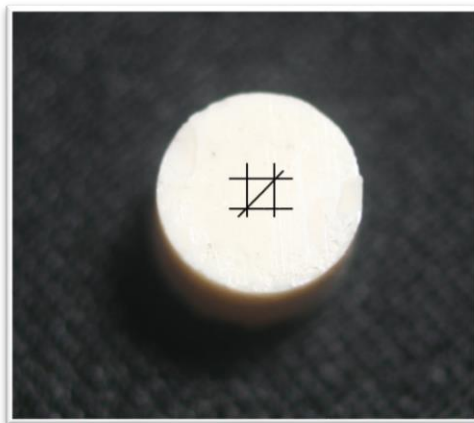


Figura 12- Esquema das leituras para a avaliação da rugosidade superficial

4.10.3 ALTERAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL

A dureza superficial foi avaliada com um microdurômetro (HNV MicroHardness tester, Shimadzu, Quioto, Japão) utilizando-se uma carga de 100 g por 20 s. Foram realizadas cinco medidas, com distância de 50 μm a partir da margem externa do corpo-de-prova, na mesma superfície em que foi realizada a leitura da rugosidade superficial, conforme o esquema da Figura 13. O valor obtido foi expresso em dureza Vickers (VHN). O valor da dureza superficial inicial de cada corpo-de-prova foi determinado pela média aritmética dos cinco resultados de VHN.

O valor da dureza superficial final foi obtido após a escovação simulada da mesma forma que descrito anteriormente.

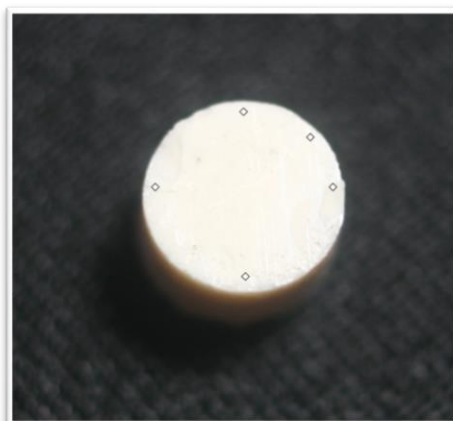


Figura 13- Esquema das indentações para a avaliação da dureza superficial

4.10.4 ESCOVAÇÃO SIMULADA

Os corpos-de-prova foram adaptados à máquina de escovação com uma saliência de 2 mm acima do molde, para permitir o contato das cerdas das escovas dentais somente com os materiais testados. Para tanto, foram encaixados em um tubo de poli(cloreto de vinila), preenchido com resina acrílica, apresentando um orifício central de 10 mm (Figura 14). Esse cuidado evitou que as escovas dentais entrassem em contato com o molde. O referido conjunto foi levado à base da máquina de escovação e os corpos-de-prova foram submetidos a 100.000 ciclos de escovação, com carga de 300 gramas de força, em uma velocidade de 4,5 ciclos por segundos, na máquina desenvolvida para esse procedimento de escovação simulada (ElQuip, São Carlos, Brasil). A quantidade de ciclos realizados no teste equivaleram a aproximadamente cinco anos de escovação dentária.



Figura 14- Dispositivo para adaptação do corpo-de-prova e fixação na matriz da máquina de escovação

A máquina de escovação apresenta dez braços metálicos, os quais fazem movimentos de vai-e-vem, onde foram fixadas as escovas dentais. Para essa

fixação, os cabos das escovas dentais foram removidos com uma serra manual de aço de 300 mm (Starrett, Itu, Brasil). Dessa forma, somente a cabeça da escova dental e 10 mm do cabo foram adaptados nos braços da máquina. Para cada corpo-de-prova, foi utilizada uma escova dental com cerdas macia (Colgate Extra Clean, Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, Brasil) (Figura 15). Os corpos-de-prova foram fixados numa base de aço inoxidável, com dez dispositivos, onde os mesmos foram posicionados. Isso possibilitou a escovação simultânea de 10 corpos-de-prova. A escovação simulada foi realizada em ambiente com temperatura a $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, o que foi possível em função da máquina ter um sensor de temperatura e uma cúpula de vidro, que manteve os corpos-de-prova e as escovas dentais em um ambiente fechado.



Figura 15- Escovas dentais e dentifrício utilizados na escovação

Os corpos-de-prova foram escovados com o dentifrício Colgate Total 12 (Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, Brasil) (Figura 15) diluído em água destilada, com auxílio de um agitador magnético sem aquecimento (Fisatom, São Paulo, Brasil), de acordo com a especificação da ISO 14569-1 (International Organization for Standardization⁹¹ 1999) na proporção de 1:2 em massa. Essa diluição foi feita para reproduzir o que ocorre na saliva. Depois de diluído, o dentifrício foi colocado em seringas descartáveis de 20 mL (Embramac, Itajaí, Brasil) que foram acopladas à máquina de escovação, sendo esta regulada para injetar 2 mL do dentifrício diluído a cada 2 min.

Ao término da escovação, os corpos-de-prova permaneceram por 10 min em uma cuba ultra-sônica (Cristófoli, Campo Mourão, Brasil) para remoção de resíduos de dentifrício que ficaram impregnados nas superfícies dos corpos-de-prova. Em seguida, foram novamente armazenados em água destilada, a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em

recipientes individuais. Esses corpos-de-prova foram então, submetidos à determinação da massa, da rugosidade superficial e da dureza superficial, como descrito anteriormente.

4.11 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Esta etapa foi realizada nos laboratórios do Programa de Pós-graduação mestrado/doutorado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa e Centro Interdisciplinar de Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Para investigar se ocorreu a manutenção da qualidade do cimento de ionômero de vidro após a incorporação das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina, foram avaliadas três propriedades mecânicas: resistência à compressão, à tração diametral e à flexão. Essas propriedades foram analisadas após 24 h e 1 mês, após o armazenamento em água destilada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em recipientes individuais, contados a partir da mistura inicial. Os ensaios foram realizados utilizando uma célula de carga de 10 kN, com uma velocidade de 0,5 mm/min até a ruptura final dos corpos-de-prova na máquina de ensaios universal (AG-I Shimadzu-Modelo Autograph, frequência de 60 Hz; Shimadzu, Quioto, Japão).

4.11.1 RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO

Para a determinação da resistência à compressão, foram confeccionados cinco corpos-de-prova de cada material para cada período de avaliação (24 h e 1 mês), com o auxílio de um molde de 6 mm de altura por 4 mm de diâmetro (Figura 16).

Para a confecção dos corpos-de-prova dos cimentos de ionômero de vidro, o molde foi lubrificado com vaselina sólida (Miyako do Brasil, São Paulo, Brasil), e apoiou-se em uma tira de poliéster (TDV Dental, Pomerode, Brasil), sobre uma placa de vidro. A manipulação dos materiais foi realizada conforme as instruções do fabricante do material controle e efetuou-se a inserção do material no molde em único incremento, com o auxílio de uma seringa descartável Medinject 1 mL (Med Goldman, Manaus, Brasil). Após o completo preenchimento do molde, o cimento de ionômero de vidro foi coberto com uma tira de poliéster e, então, pressionou-se contra uma placa

de vidro espessa, por 1 min. Isso foi realizado para extravasar o excesso de material e padronizar a superfície com maior lisura possível enquanto aguardou-se a sua geleificação. Decorrido 1 h após a manipulação dos cimentos, os corpos-de-prova foram removidos de seus moldes, protegidos com vaselina sólida, armazenados em frascos individuais contendo água destilada e mantidos na temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em uma estufa. Previamente aos ensaios mecânicos, os corpos-de-prova foram lixados manualmente com tiras de lixa de poliéster para remoção dos excessos.



Figura 16- Molde para a confecção dos corpos-de-prova para a avaliação da resistência à compressão

Os cinco corpos-de-prova de cada grupo foram posicionados individualmente, com seu eixo mais longo na posição horizontal em relação à base da máquina. Os valores máximos de resistência obtidos foram convertidos em MPa, por meio da Equação 4.

$$\text{Tensão de compressão (MPa)} = \frac{4F}{\pi d^2} \text{ (Equação 4)}$$

Onde: F = carga de ruptura (N) e d = diâmetro da amostra (mm).

4.11.2 RESISTÊNCIA À TRAÇÃO DIAMETRAL

Para a obtenção da resistência à tração diametral, foram confeccionados cinco corpos-de-prova de cada material, para cada período de avaliação (24 h e 1 mês), com o auxílio de um molde metálico de 2 mm de altura por 4 mm de diâmetro (Figura 17).

A obtenção dos corpos-de-prova dos cimentos de ionômeros de vidro, assim como a manipulação desses materiais foi realizada conforme o relatado anteriormente para a realização do teste de resistência à compressão. A única diferença foi em relação ao molde utilizado.

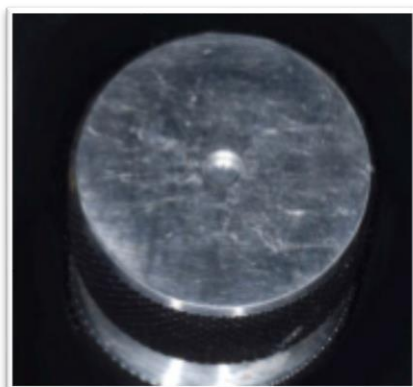


Figura 17- Molde para a confecção dos corpos-de-prova para a avaliação da resistência à tração diametral

Os corpos-de-prova foram posicionados com o seu eixo mais longo na posição vertical em relação à base da máquina. Os valores máximos de resistência obtidos foram convertidos em MPa, com o emprego da Equação 5.

$$\text{Tensão de tração diametral (MPa)} = \frac{2F}{\pi dl} \text{ (Equação 5)}$$

Onde: F = carga de ruptura (N), d = diâmetro da amostra (mm) e l = comprimento do corpo-de-prova (mm).

4.11.3 RESISTÊNCIA À FLEXÃO

Para avaliação da resistência à flexão foram confeccionados cinco corpos-de-prova retangulares de cada material para cada período de avaliação (24 h e 1 mês), com o auxílio de um molde de 17 mm de comprimento, 2 mm de largura e 2 mm de altura.

A obtenção dos corpos-de-prova dos cimentos de ionômeros de vidro, assim como a manipulação desses materiais foi realizada conforme o detalhado anteriormente, para a realização do teste de resistência à compressão. A única diferença foi em relação ao molde utilizado.

Os corpos-de-prova foram posicionados com seu eixo mais longo na posição horizontal em relação à base da máquina. Os valores máximos de resistência obtidos foram convertidos em MPa, a partir da Equação 6.

$$\text{Tensão de flexão (MPa)} = \frac{3Fl}{2bh^2} \text{ (Equação 6)}$$

Onde: F = carga de ruptura (N), l = distância entre os suportes (mm), b = largura do corpo-de-prova (mm) e h = altura do corpo-de-prova (mm).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos valores obtidos nos testes foi analisada empregando-se o teste de Shapiro-Wilks, para verificar a distribuição normal desses dados.

Os resultados da avaliação de viabilidade celular, para cada tempo, em ambos os esquemas, foram analisados com o teste ANOVA de 1 critério. Nesse caso, o critério foi cada grupo experimental. Quando detectadas diferenças significantes entre os grupos, realizou-se o pós-teste de Bonferroni. Isso foi realizado para identificar entre quais grupos ocorreram às diferenças.

Os resultados da análise de liberação de íons fluoreto foram analisados com o teste ANOVA de 2 critérios (grupos e tempos), e quando detectadas diferenças significantes, foi realizado o pós-teste para comparações múltiplas de Tukey.

Os resultados obtidos para cada parâmetro na avaliação de resistência à abrasão foram analisados separadamente. Os resultados de cada grupo foram submetidos à análise estatística para verificar se há diferenças ou não entre os valores iniciais, finais e médias das diferenças com o teste t de *Student* (amostras pareadas). O teste ANOVA de 1 critério foi usado para a comparação entre os grupos, antes e após a abrasão. Ao se detectar diferenças significativas entre os grupos, foi realizado o pós-teste para comparações múltiplas de Tukey.

Os resultados obtidos na avaliação das propriedades mecânicas para cada grupo foram submetidos à análise estatística para avaliar a ocorrência de diferenças ou não entre os valores obtidos após 24 h e 1 mês com o teste t de *Student*

(amostras pareadas). O teste ANOVA de 1 critério foi usado para a comparação entre os grupos, nos momentos 24 h e 1 mês separadamente. Quando foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, realizou-se o pós-teste para comparações múltiplas de Tukey.

O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$), sendo que todo o tratamento estatístico foi feito com o programa GraphPad Prism 5.00™ (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

Os resultados produzidos nesse estudo possibilitaram o desenvolvimento dessa Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia, Área de Concentração Clínica Integrada e a elaboração de cimento de ionômero de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas inovadoras de digluconato de clorexidina. Fato que possibilitou requerer sua patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob o número BR 1020120285860, de 08 de novembro de 2012 (Anexo 1). Além disso, parte desses resultados constituem um artigo que foi publicado no periódico Latin American Journal of Pharmacy (Anexo 2).

5.1 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

As micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg foram obtidas com sucesso para todas as formulações, apresentaram-se na forma de pó de cor branca e amarela para o Eudragit® S100 e para o Eudragit® RS100, respectivamente (Figura 18).



Figura 18- Micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

5.2 AVALIAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

5.2.1 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO

A avaliação do rendimento foi realizada após a secagem a vácuo, sendo que taxas de rendimento adequadas (mais de 80%) foram obtidas para todas as formulações.

5.2.2 QUANTIFICAÇÃO DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NAS MICROPARTÍCULAS

Todas as formulações apresentaram valores de eficácia de encapsulação média superiores a 90%, tal como indicado na Tabela 3. Além disso, as micropartículas preparadas com Eudragit® RS100 mostraram valores de eficiência de encapsulação superiores em comparação com Eudragit® S100, na mesma concentração de fármaco.

Tabela 3 – Eficácia de encapsulação e tamanho de partícula para as micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

Formulação	Teor do fármaco (mg/g)	Eficácia de encapsulação (%)	Média de diâmetro (μ m)
MS10	94,77 $\pm$ 1,46	94,77	4,12 $\pm$ 3,48
MS25	225,20 $\pm$ 2,88	90,08	2,01 $\pm$ 1,16
MRS10	96,78 $\pm$ 1,28	96,78	6,99 $\pm$ 5,80
MRS25	228,62 $\pm$ 2,39	91,45	21,07 $\pm$ 17,76

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

5.3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micropartículas obtidas utilizando o Eudragit® S100 revelaram uma forma esférica ou quase esférica e apresentaram uma superfície lisa, com agregados

de diferentes tamanhos (Figuras 19a e 19b). No entanto, agregados de forma irregular foram observados para as formulações preparadas com o Eudragit® RS100, com superfície lisa para MRS10 (Figura 19c) e superfície mais irregular para MRS25 (Figura 19d). Não foram observados poros na superfície das micropartículas.

O tamanho das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina estão indicados também na Tabela 3. Em geral, formulações de tamanho micrométrico foram registradas. Além disso, as micropartículas produzidas usando Eudragit® S100 mostraram diâmetros médios mais reduzidos do que as obtidas a partir do Eudragit® RS100.

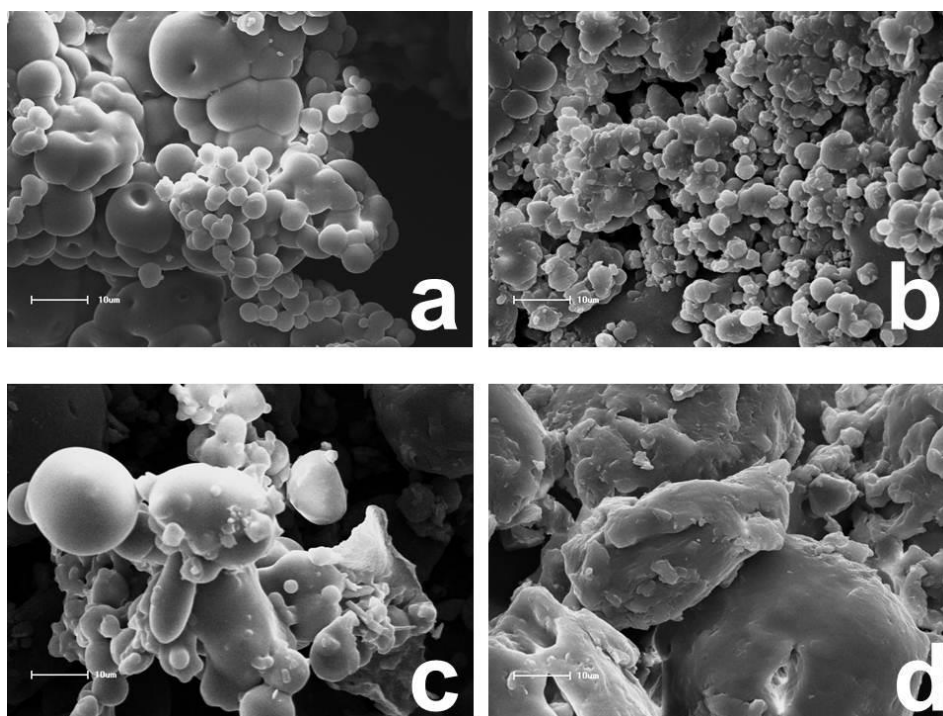


Figura 19— Imagens de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 1200 X das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina MS10 (a), MS25 (b), MRS10 (c) e MRS25 (d)

5.3.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

As amostras de digluconato de clorexidina, Eudragit® S100, Eudragit® RS100 e as micropartículas (met)acrílicas foram estudadas por difração de raios X, a fim de avaliar os seus padrões de cristalinidade (Figura 20). Os padrões iniciais do fármaco puro e dos polímeros revelaram estruturas mais amorfas/não-cristalinas, considerando que nenhum pico indicativo de cristalinidade foi observado em seus difratogramas de raios X. Os difratogramas das micropartículas (met)acrílicas de

digluconato de clorexidina também demonstraram padrões não-cristalinos e foram bastante semelhantes aos verificados para os polímeros de partida. Consequentemente, o processo de microencapsulação não alterou as estruturas não-cristalinas típicas das matérias-primas.

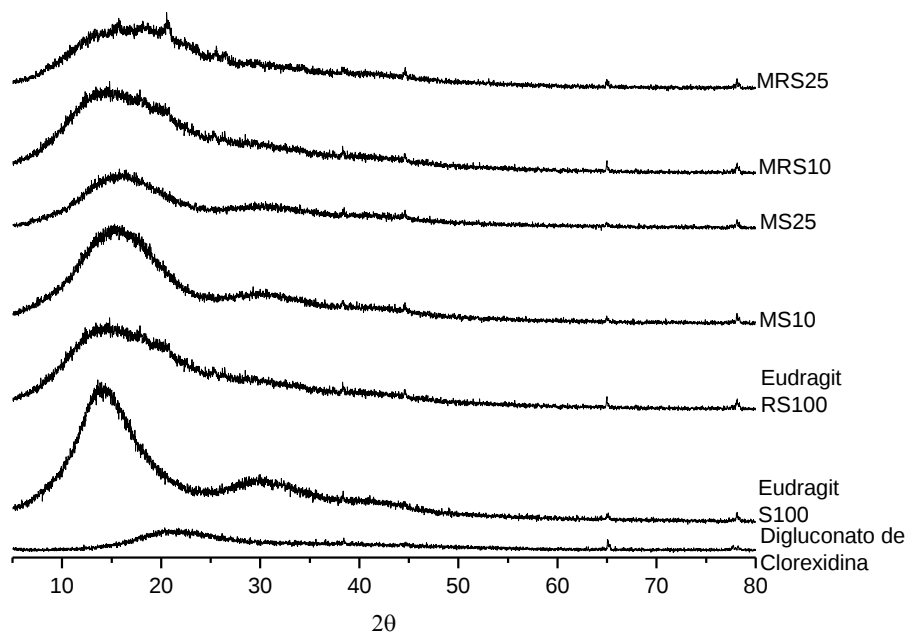


Figura 20- Padrões de difração de raios X do digluconato de clorexidina, Eudragit® S100, Eudragit® RS100 e micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

5.3.3 AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) registrados para o digluconato de clorexidina, Eudragit® S100, Eudragit® RS100 e para as micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina estão representados na Figura 21. O espectro de FTIR do digluconato de clorexidina mostrou as bandas típicas referentes às suas ligações químicas, como anteriormente relatadas na literatura (Musial⁹² 2011). A vibração de estiramento de N-H do grupo imina C=N-H ocorreu em 3320 cm^{-1} , a vibração de estiramento de C-H alifático foi atribuída em 2935 cm^{-1} , a vibração de estiramento de C=N do grupo imina C=N-H foi verificada em 1623 cm^{-1} , as bandas de estiramento de C=C aromático foram observadas em 1601 e 1580 cm^{-1} , a vibração de estiramento característica das guanidinas =N-C=N- foi registrada em 1526 cm^{-1} e a vibração de estiramento de C-Cl foi detectada em 824 cm^{-1} . O espectro de FTIR do Eudragit® S100 apresentou as bandas típicas de estiramento de

C=O de ácido carboxílico em 1705 cm^{-1} e de éster em 1730 cm^{-1} . Uma banda alargada da vibração de estiramento de O-H foi exibida entre 3100 e 3500 cm^{-1} . A vibração de estiramento de C-H alifático permitiu a formação de bandas entre 2900 e 3000 cm^{-1} . O Eudragit® RS100 revelou um espectro de FTIR semelhante ao Eudragit® S100. No entanto, as vibrações de estiramento atribuídas ao C=O de ácido carboxílico e ao grupo O-H não foram verificadas, em concordância com a sua estrutura química.

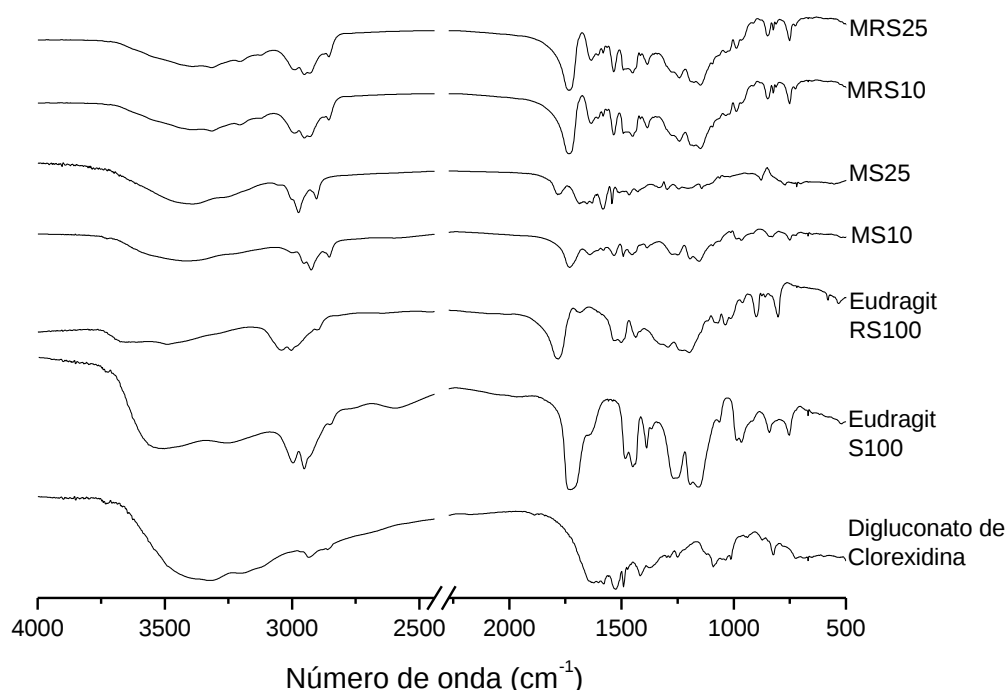


Figura 21- Espectros de FTIR do digluconato de clorexidina, Eudragit® S100, Eudragit® RS100 e micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

A interação química entre o fármaco e os polímeros geralmente leva a alterações identificáveis nos padrões de FTIR. Os espectros de FTIR das micropartículas indicaram ausência de alterações dos números de onda das bandas de absorção de infravermelho características das matérias-primas. Esse resultado sugere que não houve nenhuma ligação química entre o digluconato de clorexidina e Eudragit® S100/Eudragit® RS100 durante a microencapsulação.

5.3.4 ANÁLISE TÉRMICA

A Figura 22 resume os eventos de degradação térmica verificados para as micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina. As formulações obtidas com Eudragit® S100 (MS10 e MS25) exibiram um perfil de decomposição

térmica de três estágios. A primeira fase de perda de massa foi associada à perda de água. Na segunda e terceira fases, a perda de massa foi atribuída a uma combinação de eventos de degradação da cadeia polimérica e do fármaco, além da formação de produtos de volatilização, respectivamente. A análise térmica realizada para as micropartículas de Eudragit® RS100 (MRS10 e MRS25) mostrou uma perda insignificante de umidade. Além disso, estas formulações apresentaram eventos de degradação similares como os descritos anteriormente para MS10 e MS25, sendo, neste caso, observadas duas fases distintas de decomposição térmica.

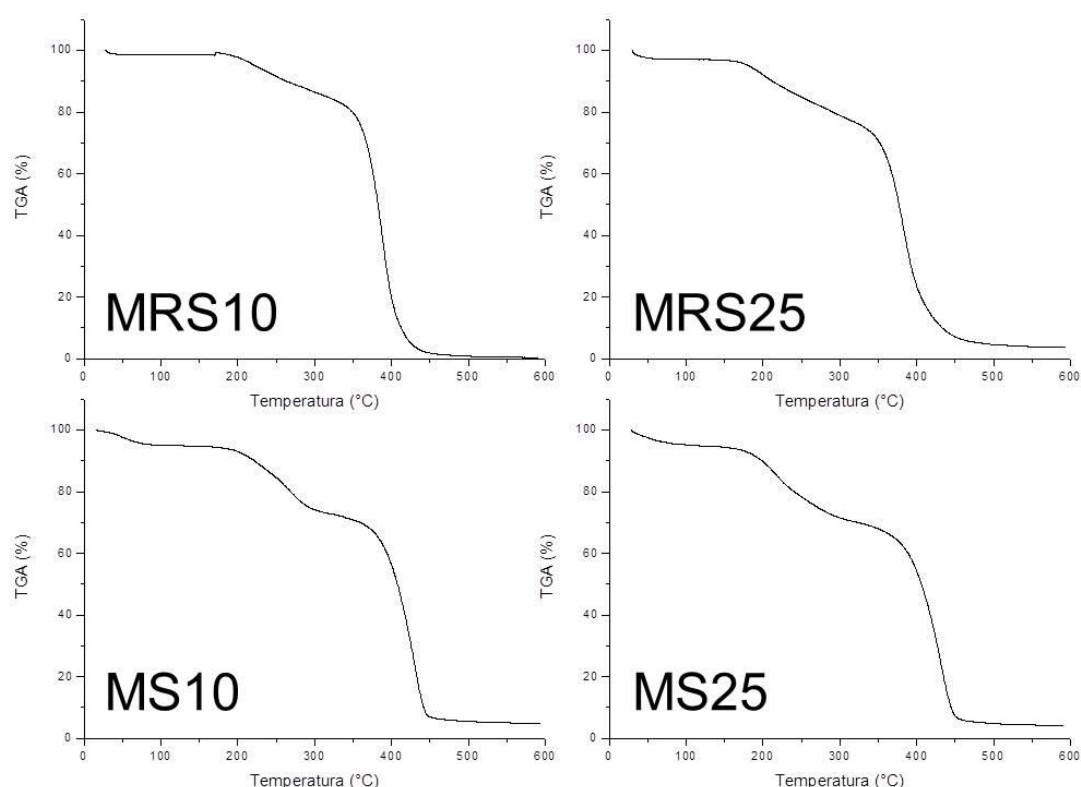


Figura 22- Termogramas das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina

Além disso, os termogramas indicaram que a temperatura de início de decomposição de todas as micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina foi superior a 145°C, sob fluxo de ar. Este resultado sugere uma estabilidade térmica adequada, considerando o seu potencial uso como antisséptico em produtos bucais.

5.3.5 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO- LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

As taxas de dissolução do digluconato de clorexidina, como fármaco puro e em micropartículas (met)acrílicas, estão demonstradas no Gráfico 1. O tempo médio para 80% de liberação do digluconato de clorexidina puro foi inferior a 5 min. No entanto, um valor de 80% de liberação do fármaco foi atingido em tempos médios de dissolução de 348, 112 e 223 min para as formulações MS10, MS25 e MRS25, respectivamente. Em particular, as micropartículas MRS10 mostraram um valor médio de dissolução de apenas 65% no tempo final de 360 min. Portanto, o digluconato de clorexidina a partir das micropartículas (met)acrílicas teve uma taxa de dissolução expressivamente mais lenta do que o fármaco puro.

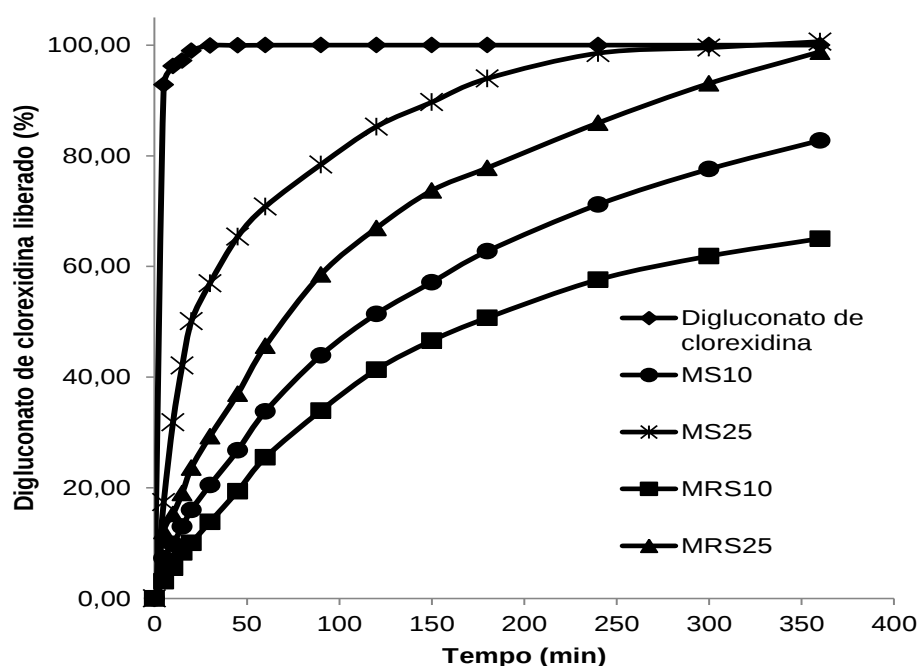


Gráfico 1- Taxas de dissolução de digluconato de clorexidina como fármaco puro e em micropartículas (met)acrílicas

5.3.5.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE LIBERAÇÃO

Os perfis de liberação foram ajustados aos modelos matemáticos e a seleção do melhor modelo foi realizada, considerando o coeficiente de correlação (r), o critério de seleção do modelo (MSC) e o ajuste gráfico. O digluconato de clorexidina como fármaco puro mostrou um perfil de dissolução segundo o modelo monoexponencial, com uma constante cinética (k) de $0,51283 \text{ min}^{-1}$ ($r = 0,9993$ e MSC

= 5,70). No entanto, as micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina foram melhor ajustadas à equação biexponencial do que aos outros modelos. A constante rápida de liberação (α) e a constante lenta de liberação (β) para as formulações de micropartículas estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4- Dados de liberação obtidos por meio do ajuste dos perfis de dissolução do digluconato de clorexidina a partir das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina frente à equação biexponencial

Formulação	Modelo Biexponencial			
	r	MSC	α (min ⁻¹)	β (min ⁻¹)
MS10	0,9996	6,53	0,02674	0,00043
MS25	0,9994	6,04	0,57491	0,09666
MRS10	0,9998	7,95	0,00799	0,00045
MRS25	0,9992	5,91	0,60242	0,00839

Em relação ao modelo Korsmeyer-Peppas, as formulações mostraram valores de n iguais a 0,62 (MS10), 0,50 (MS25), 0,62 (MRS10) e 0,60 (MRS25). Todos os comprimidos contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina tiveram expoente de liberação (n), variando entre 0,43 e 0,85, indicando um transporte anômalo. Portanto, tanto os mecanismos da difusão e erosão agiram para a liberação do digluconato de clorexidina (Siepmann, Peppas⁹³ 2001).

5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

A Tabela 5 resume a avaliação antimicrobiana das micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina, onde apresentam-se as zonas de inibição do crescimento microbiano fornecidas pelas micropartículas citadas e controles contra *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*. Em geral, após 24 h de incubação as formulações mostraram um potencial antimicrobiano semelhante em relação ao controle positivo empregado (solução aquosa comercial de digluconato de clorexidina). Nesse sentido, o processo de microencapsulação utilizando ambos os polímeros (met)acrílicos não prejudicou o desempenho antimicrobiano do digluconato de clorexidina.

Tabela 5- Zonas de inibição do crescimento* em milímetros obtidas a partir da micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina e controles contra microrganismos habituais do meio bucal

Formulação	Cepas microbiológicas			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
MS10	20,85 ± 1,37	20,69 ± 0,43	27,91 ± 1,69	17,64 ± 1,15
MS25	20,11 ± 0,40	21,10 ± 0,65	29,75 ± 1,06	18,93 ± 0,95
MRS10	21,21 ± 1,27	21,44 ± 0,40	30,31 ± 1,74	19,08 ± 1,18
MRS25	18,92 ± 1,38	21,94 ± 0,22	28,70 ± 1,49	17,16 ± 1,06
Controle positivo	20,94 ± 0,55	21,28 ± 0,37	30,62 ± 2,25	18,84 ± 1,27
Controle negativo	—	—	—	—

* Cada valor representa média ± desvio padrão de três determinações; “—”: significa um resultado negativo.

Em particular, as formulações avaliadas apresentaram zonas de inibição expressivas contra *Streptococcus mutans*. Esse tipo de bactéria apresenta-se em forma de cocos Gram-positivos e desempenha papel fundamental no desenvolvimento de infecções bucais em seres humanos, principalmente a cárie dental, onde é considerado o principal agente etiológico.

5.5 INCORPORAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (MET)ACRÍLICAS DE DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA NO CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

Após a análise dos dados de caracterização e da avaliação antimicrobiana *in vitro*, as micropartículas (met)acrílicas contendo 25% de digluconato de clorexidina formuladas com Eudragit® S100 (MS25) e Eudragit® RS100 (MRS25) foram incorporadas geometricamente ao pó do cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Ketac™ Molar Easymix, 3M Espe, St Paul, MN, EUA). Esse procedimento foi realizado com o objetivo de obter-se uma concentração de 20% de micropartículas no pó do cimento de ionômero de vidro. A escolha foi baseada na presença de resultados aceitáveis na caracterização, com a maior presença de Clx Dg nessas formulações. As micropartículas selecionadas apresentaram conforme desejado tamanho micrométrico, foram termoestáveis, amorfas/não-cristalinas, com ligação física entre fármaco e polímero, alta eficiência de encapsulação do fármaco, atividade antimicrobiana comprovada, liberação lenta e controlada do fármaco.

5.6 AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE

A avaliação da biocompatibilidade dos cimentos de ionômero de vidro contendo Clx Dg possibilitou verificar o efeito desses novos materiais direta e indiretamente sobre os fibroblastos gengivais humanos e sobre as células de polpa dental humana, nos dois esquemas propostos: dinâmico e acumulativo.

5.6.1 ESQUEMA DINÂMICO

A Figura 23 sumariza os resultados obtidos pelo esquema dinâmico, acerca da citotoxicidade indireta sobre fibroblastos gengivais humanos, nos tempos pré-determinados e decorrente da cultura de célula por 1 dia. Em geral, até 4 dias de análise os materiais avaliados apresentaram baixa citotoxicidade. Apenas no experimento de 7 dias, ocorreu redução da viabilidade celular significativa para os corpos-de-prova CIV+MS0 e CIV puro. Enquanto que para o material CIV+MRS25 verificou-se um aumento significativo na viabilidade celular.

Ao avaliar os dados decorrentes da cultura celular por 4 dias, observou-se maior citotoxicidade. Porém, em nenhum momento, foi verificada uma diferença significativa entre os materiais experimentais contendo micropartículas poliméricas de Clx Dg e o cimento de ionômero de vidro sem micropartículas (Figura 24).

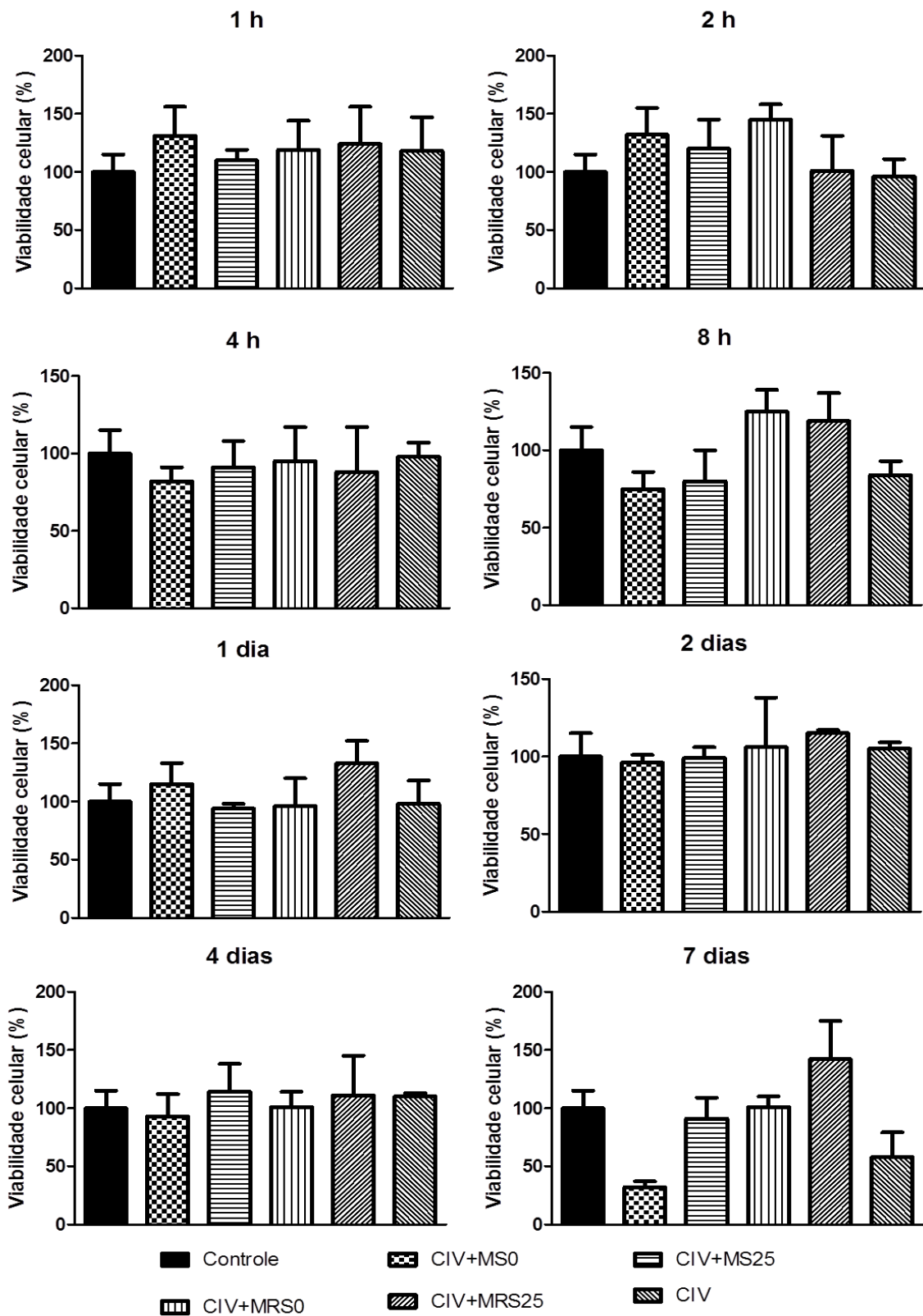


Figura 23: Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos nos tempos pré-determinados para o esquema dinâmico, método indireto, com tempo de cultura celular de 1 dia

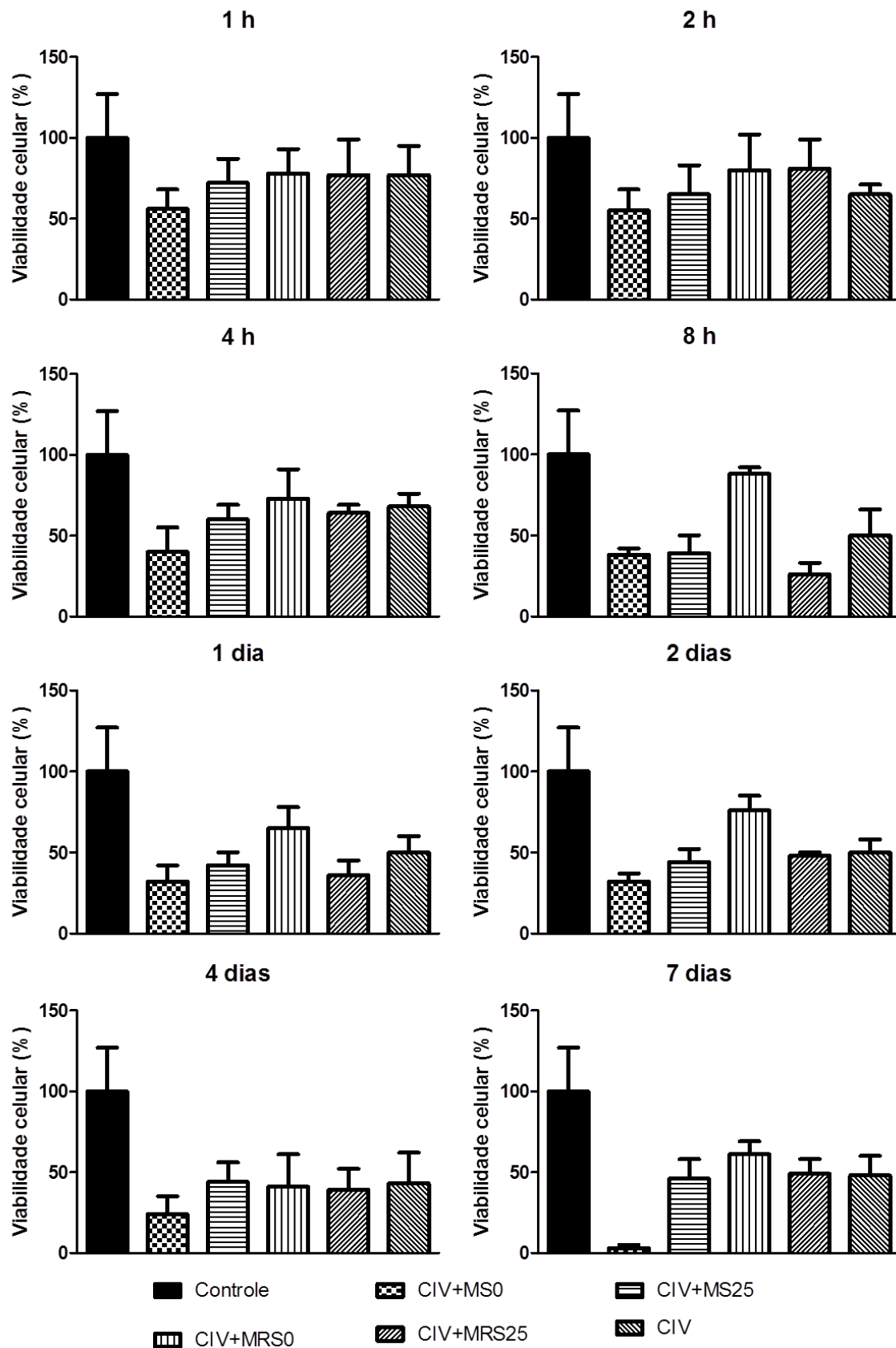


Figura 24: Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos nos tempos pré-determinados para o esquema dinâmico, método indireto, com tempo de cultura celular de 4 dias

A Figura 25 apresenta os resultados de viabilidade celular para cultura de células de fibroblastos gengivais humanos em contato direto com os corpos-de-prova. Para ambos os tempos de análise, verificou-se que o contato direto do material restaurador com as células, apresentou efeito citotóxico significativo. Porém, ao comparar os materiais restauradores, observou-se que a inclusão de micropartículas contendo clorexidina não aumentou a citotoxicidade em relação ao CIV puro. Ao contrário, em algumas situações, esses materiais apresentaram menor citotoxicidade, quando comparados com o cimento de ionômero de vidro controle.

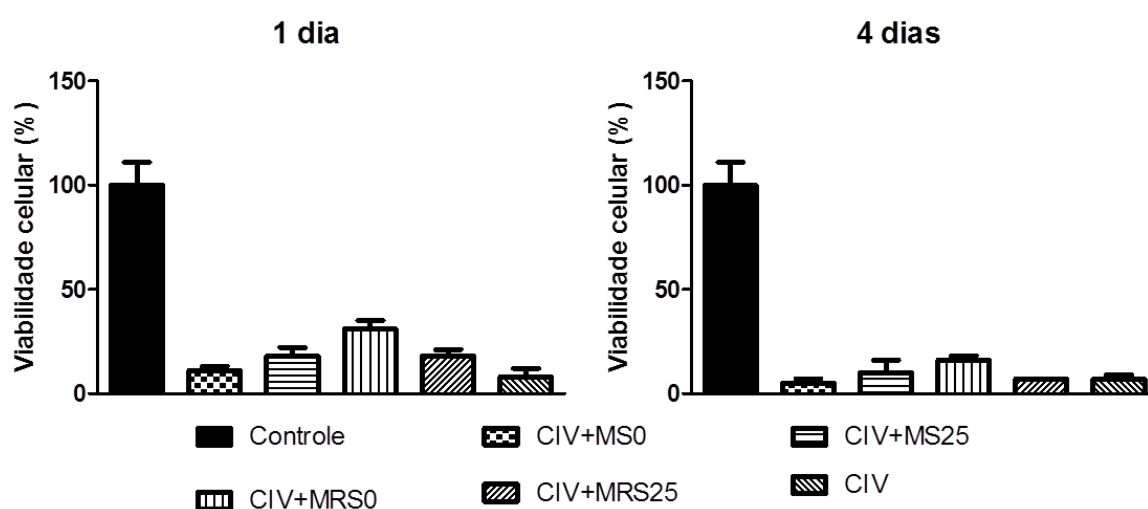


Figura 25: Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos em contato direto com os corpos-de-prova

5.6.2 ESQUEMA ACUMULATIVO

O efeito citotóxico de forma indireta sobre as células de polpa dental humana dos materiais experimentais não apresentou diferença significativa com o verificado para o cimento de ionômero de vidro sem micropartículas poliméricas (Figura 26).

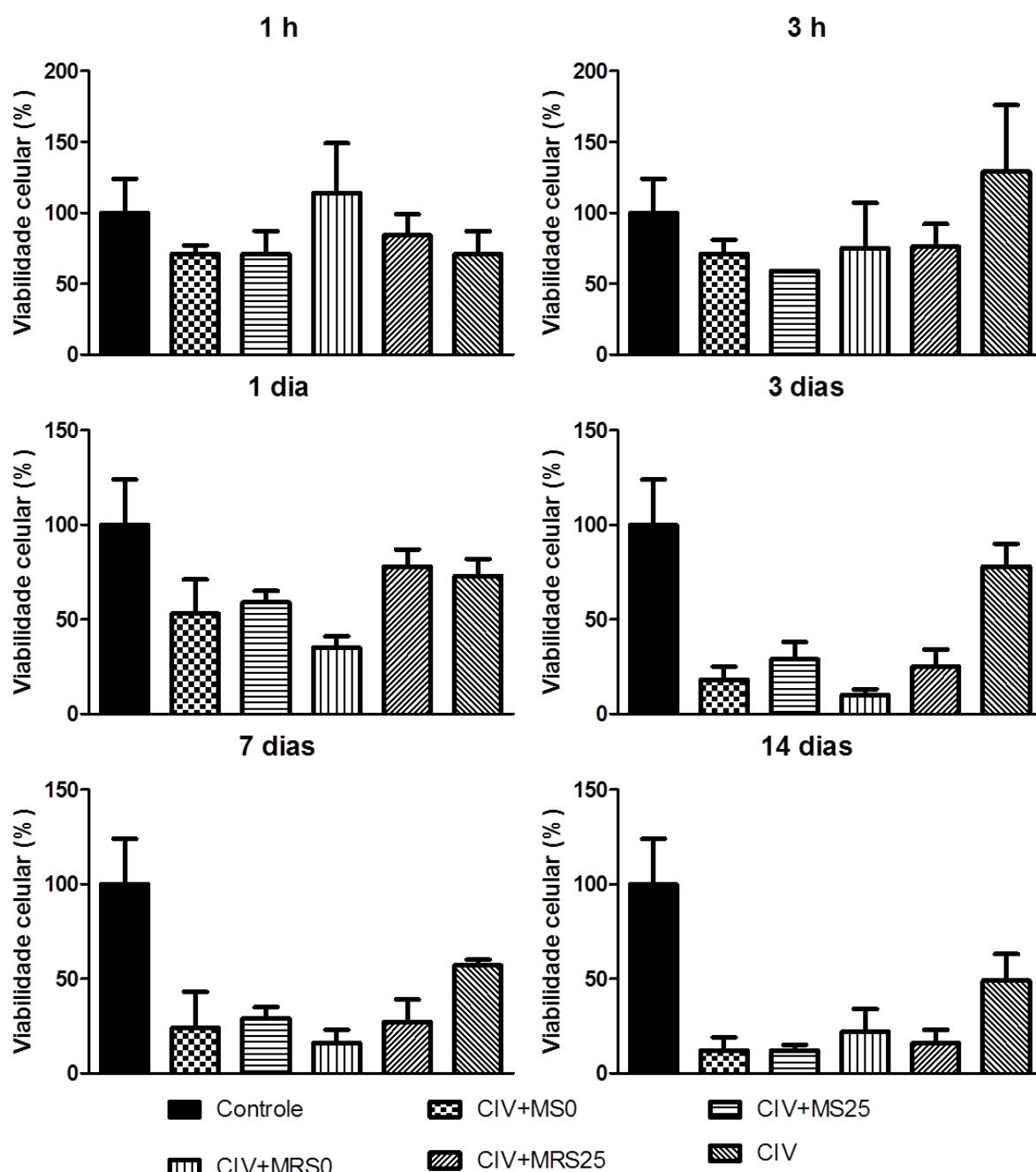


Figura 26: Viabilidade celular das células de polpa dental humana, nos tempos pré-determinados, esquema acumulativo, método indireto

Ao analisar os dados obtidos pelo esquema acumulativo, o efeito citotóxico de forma direta sobre as células de fibroblastos gengivais humanos demonstrou que todos os materiais avaliados apresentaram um efeito citotóxico alto e semelhante. Porém, o cimento de ionômero de vidro contendo as micropartículas MS25, na maioria dos tempos (1 e 3 h, 1 dia, 7 e 14 dias) foi o material que apresentou menor efeito citotóxico, sendo diferente significativamente ($p \leq 0,05$) do cimento de ionômero de vidro sem micropartículas nos tempos 3 h, 1, 3, 7 e 14 dias (Figura 27).

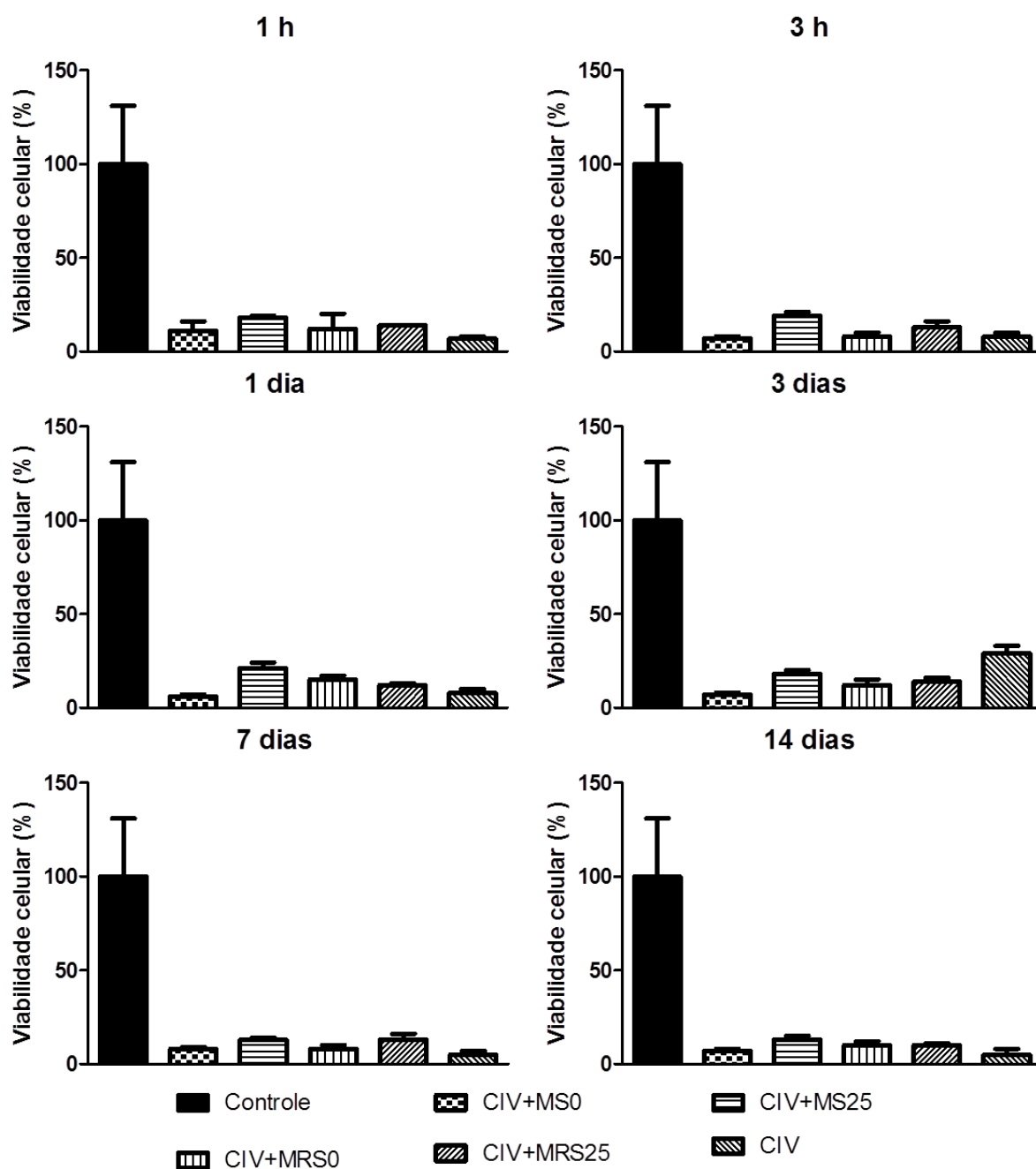


Figura 27: Viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humano, nos tempos pré-determinados para o esquema acumulativo, método direto

5.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS CIMENTOS DE IONÔMEROS DE VIDRO

Os meios de cultura armazenados para a cultura de células foram igualmente utilizados para a análise microbiológica. Os meios foram primeiramente semeados em caldo, sendo avaliados após 24 h por meio da turbidimetria visível. Neste momento, foi realizada a avaliação da turbidez do meio fresco, obtendo-se o valor do branco de 0,070, considerado para definir a turbidez visível. Ao verificar os

resultados a partir do meio armazenados, pode-se observar que o efeito antimicrobiano é maior nas duas primeiras horas, possivelmente pela presença de monômero residual, sendo que o cimento de ionômero de vidro controle e as micropartículas sem Clx Dg foram os primeiros materiais a perder a ação antimicrobiana, já em 4 h. (Gráfico 2). Os materiais contendo as micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg não apresentaram crescimento de *S. mutans* nos períodos de tempo investigados.

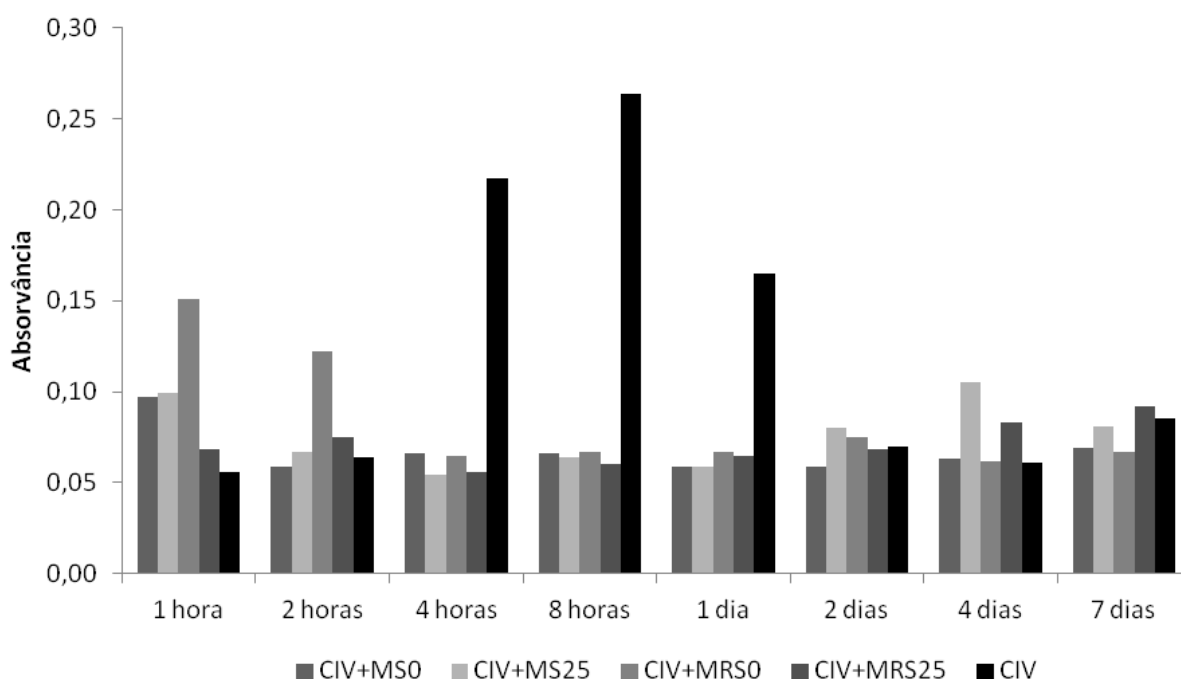


Gráfico 2: Valores obtidos por turbidimetria visível referentes ao crescimento microbiano de *Streptococcus mutans*, a partir dos meios de cultura coletados no esquema dinâmico (valor do branco=0,070)

Após avaliação por turbidimetria, os meios com valores abaixo do valor de branco, foram semeados em meio sólido (ágar Mülller Hinton) em placas de Petri, para a confirmação do efeito antimicrobiano (Tabela 6).

Tabela 6: Número de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus mutans*, obtidos após a semeadura em placa de Petri, com os meios de cultura coletados no esquema dinâmico

Tempo	CIV+ MS0	CIV+ MS25	CIV+ MRS0	CIV+ MRS25	CIV
1 h	+	0	+	0	00
2 h	1	3	+	0	01
4 h	+	4	+	0	+
8 h	+	6	+	1	+
1 dia	+	7	+	0	+
2 dias	+	4	+	2	+
4 dias	+	3	+	2	+
7 dias	+	2	+	1	+

Nota: As células da tabela preenchidas com “+” representam, que ocorreu crescimento prévio, determinado por turbimetria.

O crescimento microbiano foi ausente ou muito reduzido para os materiais com micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg, o que comprova o seu potencial antimicrobiano. O CIV puro, pela presença de monômeros residuais também teve uma baixa carga microbiológica nas duas primeiras horas.

5.8 LIBERAÇÃO E RECARGA DE ÍON FLUORETO

Para comprovar que não houve interação da clorexidina com o íon fluoreto, foi determinada a liberação desse íon contido nos materiais experimentais e no controle. Os resultados demonstraram que a maior liberação de íon fluoreto ocorreu nas primeiras 24 h, na qual o material controle liberou um valor médio (ppm) de 18,26; o cimento de ionômero de vidro contendo MS25 liberou 13,26 e o cimento de ionômero de vidro contendo MRS25 liberou 23,08. Nos períodos de tempo seguintes, uma liberação mais reduzida, mas efetiva, foi observada, sendo que todos os materiais apresentaram capacidade de recarga do íon fluoreto (Gráfico 3). Ao comparar os materiais nos diferentes tempos de avaliação, foram encontradas diferenças estatisticamente significantivas ($p \leq 0,05$) entre CIV+MS25 e CIV+MRS25 em todos os tempos e entre CIV+MRS25 e CIV nos tempos 7 dias, 14 dias e após recarga. O material com melhor desempenho na liberação de íon fluoreto foi o CIV contendo micropartículas MRS25.

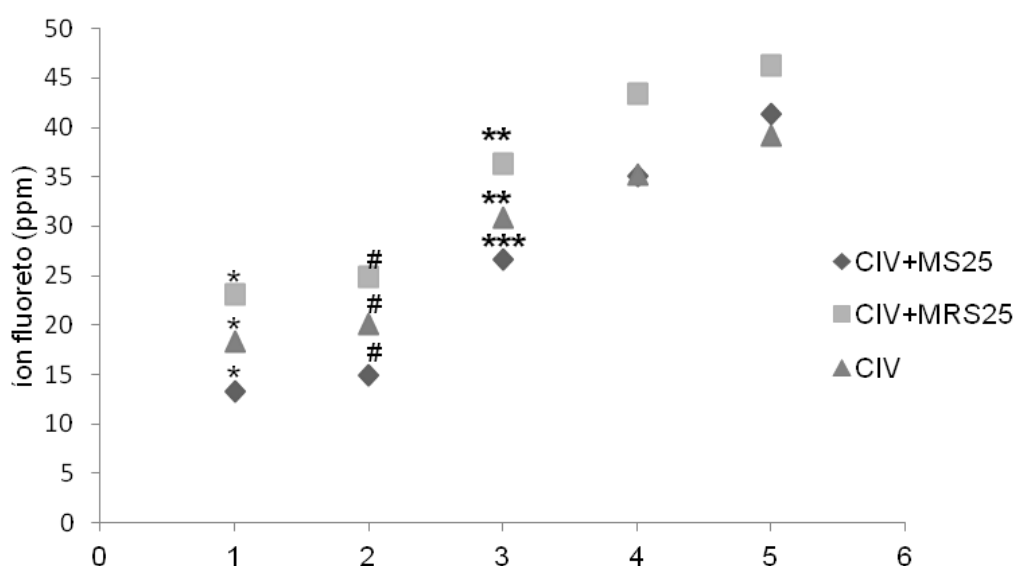


Gráfico 3: Média da liberação de íons fluoreto (ppm) dos cimentos de ionômeros de vidro, 1 dia (1), 2 dias (2), 7 dias (3), 14 dias (4) e após recarga (5). Comparações dos valores por material entre os diferentes tempos: diferença significativa (*) com 7 dias, 14 dias e após recarga; (#) com 7 dias, 14 dias e após recarga; (**) com após recarga; (***) com 14 dias e após recarga; ($p < 0,05$, ANOVA 2 critérios com pós-teste de Bonferroni)

Ao analisar cada material nos diversos períodos de tempo, foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) para todos os eles, ao comparar os tempos 1 e 2 dias comparado aos períodos de 7 dias, 14 dias e após recarga. Ao comparar os períodos de 7 dias e 14 dias, somente encontrou-se diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) para o grupo com CIV+MS25. Já ao se comparar os tempos 14 dias e após a recarga, não detectou-se diferença estatisticamente significativa. O mais importante, foi verificar que os materiais experimentais em nenhum momento apresentaram valores significativamente menores em relação ao material controle, o que demonstrou que a incorporação de micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg não alterou a capacidade de liberação e recarga de íon fluoreto do CIV.

5.9 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ABRASÃO

Para avaliar o desgaste sofrido pelos materiais restauradores após a escovação simulada foram utilizados três parâmetros diferentes: perda de massa, rugosidade superficial e dureza superficial. Foram testados os dois materiais restauradores experimentais e o controle, antes e após a escovação simulada,

empregando escovas dentais de cerdas macias (classificação fornecida pelo fabricante).

5.9.1 ALTERAÇÃO DE MASSA

A alteração de massa expressa em gramas foi analisada pela comparação dos valores obtidos antes (inicial) e após (final) o procedimento de abrasão (escovação simulada). A menor perda de massa ocorreu para o grupo controle (CIV), seguido pelo material experimental contendo micropartículas MRS25. A maior perda de massa ocorreu para o material experimental contendo micropartículas MS25. Foram detectadas diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$) entre a massa inicial e final para todos os materiais avaliados. Ao avaliar entre os materiais os valores iniciais e finais, isoladamente, encontrou-se diferenças estatisticamente significantes. Os materiais experimentais em ambos os momentos (inicial e final) apresentaram um valor de massa significativamente menor que o material controle. Sendo que, o cimento de ionômero de vidro com micropartículas MS25, teve um valor significativamente menor que o cimento de ionômero de vidro com micropartículas MRS25 (Gráfico 4).

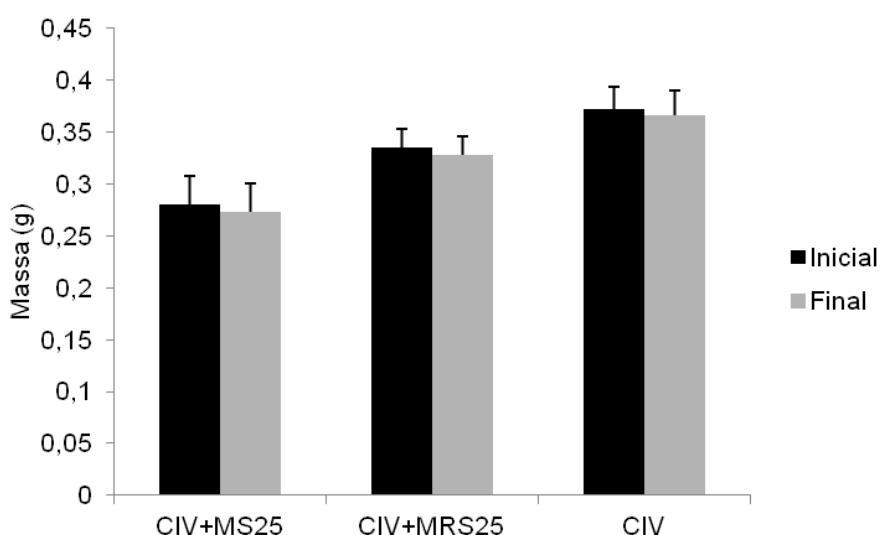


Gráfico 4: Média e desvio padrão da massa (g) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois de submetidos à abrasão. Comparações entre os valores iniciais e finais: diferenças significantes para os grupos CIV+MS25, CIV+MRS25 e CIV (teste t de *student* pareado). Comparações dos valores iniciais entre os diferentes grupos: diferença significativa entre todos ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores finais entre os diferentes grupos: diferença significativa entre todos ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey)

Comparando-se os valores obtidos para a diferença entre massa inicial e final, entre os materiais, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes (Gráfico 5). Fato que demonstrou que os materiais experimentais apresentaram resistência semelhante ao material controle.

O tempo para estabilização da massa foi igual para os três materiais, sendo necessárias 96 h.

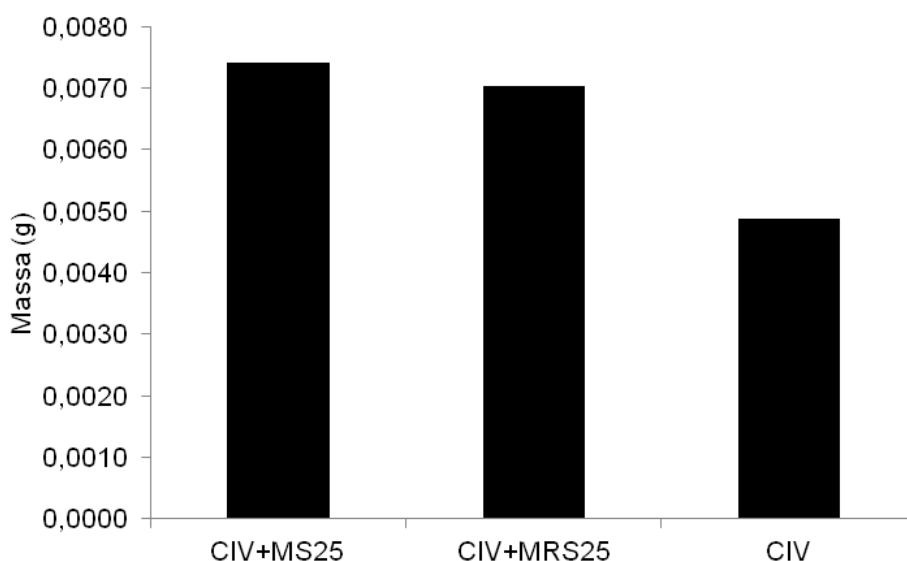


Gráfico 5: Valores das diferenças entre massa inicial e final (g) dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à abrasão. Comparações dos valores sem diferença estatisticamente significantes entre todos (ANOVA com pós-teste de Tukey)

5.9.2 ALTERAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

Os valores de alteração da Ra dos materiais foram expressos em μm e obtidos pela diferença entre a rugosidade inicial e a rugosidade final (após abrasão, escovação simulada). Os valores demonstraram que o procedimento de escovação causou um aumento da rugosidade superficial de todos os materiais restauradores (Tabela 7). Ao avaliar estatisticamente esses resultados, verificou-se diferença estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) entre os valores iniciais e finais somente para o cimento de ionômero de vidro com as micropartículas MRS25 ($p=0,0005$).

Tabela 7- Média (desvio padrão) da rugosidade Ra (μm) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois da abrasão

Material	Média Rugosidade Inicial	Média Rugosidade Final
CIV+MS25	1,03 ($\pm$ 0,93)A,a	1,20 ($\pm$ 0,47)A,b
CIV+MRS25	0,76 ($\pm$ 0,84)B,a	2,57 ($\pm$ 0,49)C,c
CIV	0,77 ($\pm$ 0,43)D,a	0,89 ($\pm$ 0,26)D,b

Nota: Horizontal: Comparações entre os valores iniciais e finais: letras (maiúsculas) diferentes significam valores estatisticamente diferentes (teste t de *student* pareado). Vertical: Comparações dos valores iniciais e finais entre os diferentes grupos: letras (minúsculas) diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey).

Comparando-se os valores obtidos para a diferença entre a rugosidade Ra inicial e final, dos materiais, foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) (Gráfico 6) entre o cimento de ionômero de vidro com micropartículas MRS25 e os outros dois materiais.

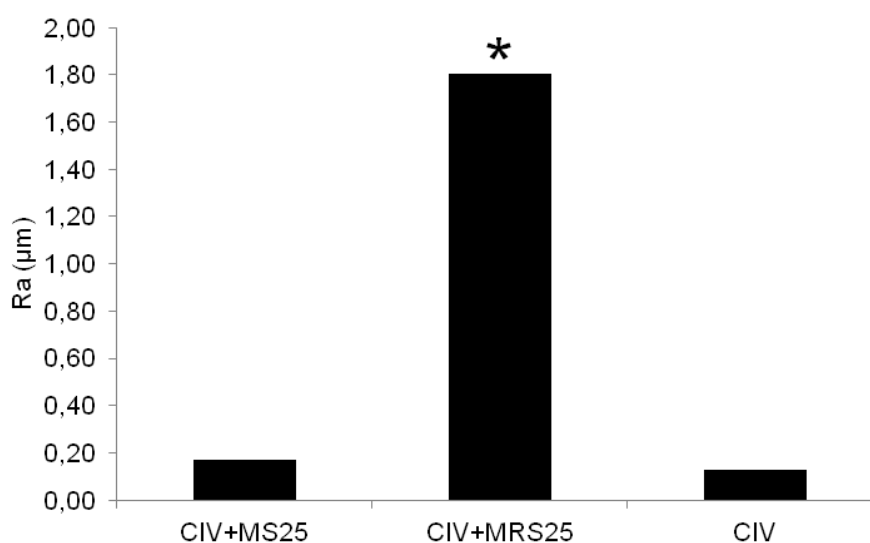


Gráfico 6- Valores das diferenças entre rugosidade Ra inicial e final (μm), dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à abrasão. Comparações dos valores: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV (ANOVA com pós-teste de Tukey)

Igualmente foi realizada a medida dos valores de Rt, sendo expressos em μm e calculado pela diferença entre a rugosidade inicial e a rugosidade final. Os valores de rugosidade total demonstraram mais enfaticamente a alteração após a abrasão, sendo essa estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) para todos os materiais (Tabela 8).

Tabela 8- Média (desvio padrão) da rugosidade R_t (μm) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois da abrasão

Material	Média Rugosidade Inicial	Média Rugosidade Final
CIV+MS25	9,41 ($\pm$ 6,63)A,a	15,09 ($\pm$ 3,99)B,a
CIV+MRS25	9,47 ($\pm$ 7,07)C,a	21,62 ($\pm$ 3,25)D,b
CIV	8,40 ($\pm$ 3,30)E,a	11,68 ($\pm$ 3,02)F,a

Nota: Horizontal: Comparações entre os valores iniciais e finais: letras (maiúsculas) diferentes significam valores estatisticamente diferentes (teste t de *student* pareado). Vertical: Comparações dos valores iniciais e finais entre os diferentes grupos: letras (minúsculas) diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey).

Ao avaliar os valores de rugosidade superficial final R_t , apenas o material com micropartículas MRS25 apresentou diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos outros dois grupos.

Comparando-se os valores decorrentes da diferença entre a rugosidade superficial R_t inicial e final, para cada material, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) (Gráfico 7), entre o cimento de ionômero de vidro com micropartículas MRS25 e os outros dois materiais.

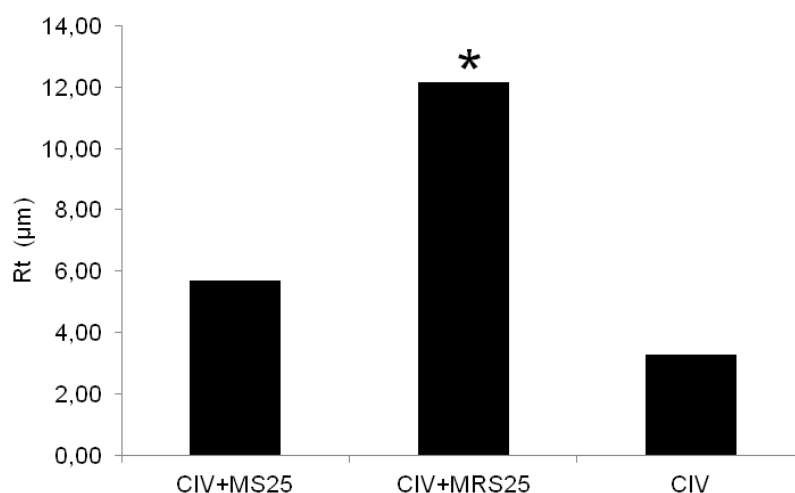


Gráfico 7- Valores das diferenças entre rugosidade R_t inicial e final (μm), dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à abrasão. Comparações dos valores: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV (ANOVA com pós-teste de Tukey)

5.9.3 ALTERAÇÃO DA DUREZA SUPERFICIAL

O resultado da dureza superficial foi calculado a partir da diferença entre a dureza antes (inicial) e após (final) os cimentos de ionômeros de vidro serem submetidos à abrasão (escovação simulada). Houve aumento do valor da dureza

superficial para todos os materiais. Os materiais experimentais apresentaram menor alteração no valor de dureza superficial, ficando com valores, após a abrasão, semelhantes ao valor inicial do material controle. O material controle foi o único a apresentar alteração significativa do valor de dureza depois da abrasão ($p=0,0002$) (Tabela 9).

Tabela 9- Média (desvio padrão) da dureza (VHN) dos cimentos de ionômeros de vidro antes e depois da abrasão

Material	Média Dureza Inicial	Média Dureza Final
CIV+MS25	25,4 ($\pm 6,2$)A,a	32,8 ($\pm 9,9$)A,c
CIV+MRS25	28,8 ($\pm 5,2$)B,a	31,5 ($\pm 7,4$)B,c
CIV	35,4 ($\pm 6,2$)C,b	62,4 ($\pm 9,1$)D,d

Nota: Horizontal: Comparações entre os valores iniciais e finais: letras (maiúsculas) diferentes significam valores estatisticamente diferentes (teste t de *student* pareado). Vertical: Comparações dos valores iniciais e finais entre os diferentes grupos: letras (minúsculas) diferentes significam valores estatisticamente diferentes ($p<0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey).

Ao analisar os dados de dureza inicial e final separadamente, entre os materiais experimentais, observou-se que ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$) entre os materiais experimentais e o material controle. Porém, não foi constatada diferença entre os materiais experimentais em ambos os momentos de avaliação.

Comparando-se os valores obtidos a partir da diferença entre a dureza superficial inicial e a dureza superficial final, dos materiais, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p\leq 0,05$) entre o CIV controle e os dois materiais experimentais (Gráfico 8).

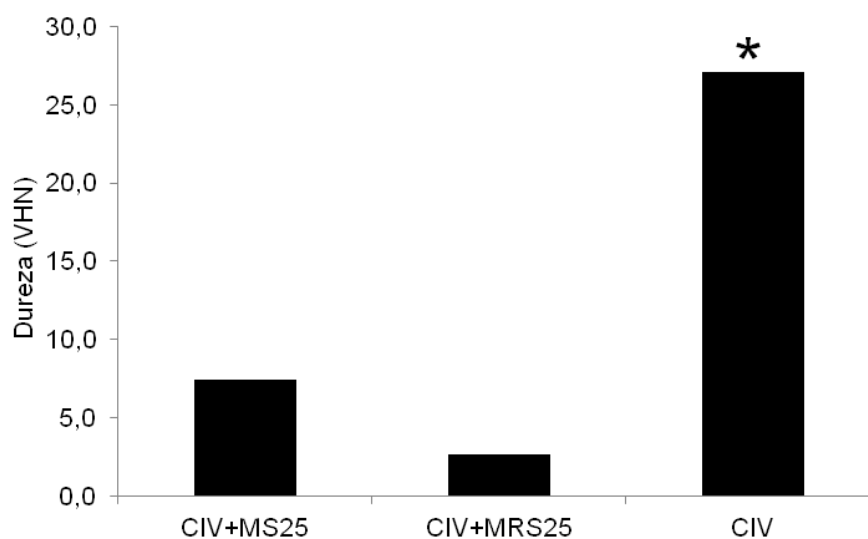


Gráfico 8- Valores das diferenças entre dureza superficial inicial e final (VHN), dos cimentos de ionômeros de vidro submetidos à abrasão. Comparações dos valores: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 (ANOVA com pós-teste de Tukey)

5.10 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Foram investigadas três propriedades mecânicas dos materiais em relação à resistência: à compressão, à tração diametral e à flexão. Para tanto os dois cimentos de ionômeros de vidro experimentais e o CIV controle foram testados, após 24 h e 1 mês de armazenamento em meio úmido.

5.10.1 RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO

Os valores de resistência à compressão dos materiais experimentais, após 24 h foram significativamente ($p \leq 0,05$) mais reduzidos em comparação ao material controle. Após 1 mês, todos os materiais apresentaram aumento do valor de resistência à compressão, o qual foi significativo para o CIV controle e para o cimento de ionômero de vidro com micropartículas MS25. Os dados de resistência à compressão após 1 mês apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre todos os grupos analisados (Gráfico 9).

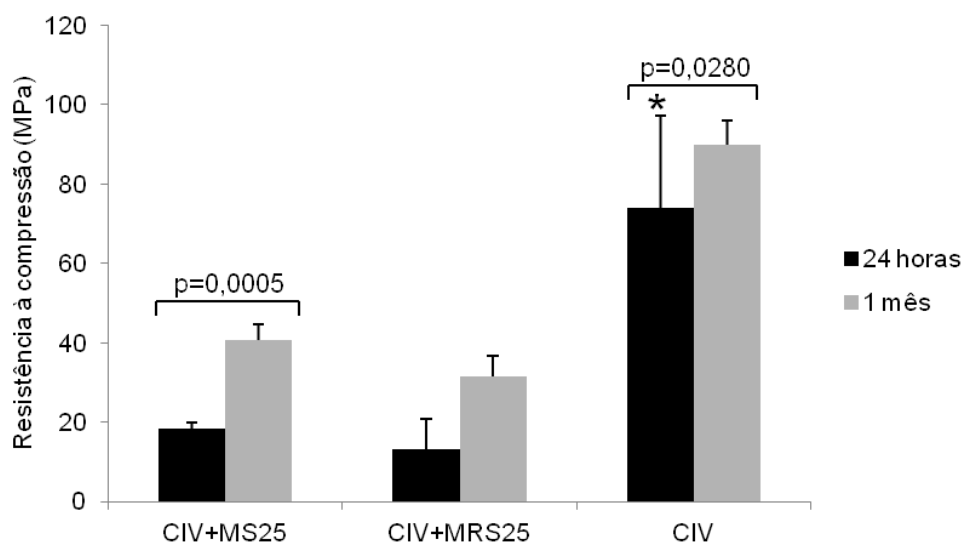


Gráfico 9: Média e desvio padrão dos valores de resistência à compressão (MPa) após 24 horas e 1 mês de armazenamento em meio úmido dos cimentos de ionômeros de vidro. Comparações entre os valores 24 horas e 1 mês: diferenças significativas para os grupos CIV+MS25 e CIV (teste t de *student* pareado). Comparações dos valores de 24 horas entre os diferentes grupos: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores de 1 mês entre os diferentes grupos: diferença significativa entre todos os grupos ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey)

5.10.2 RESISTÊNCIA À TRAÇÃO DIAMETRAL

Os dados revelaram que em ambos os momentos de avaliação, os valores de resistência à tração diametral foram semelhantes entre os materiais experimentais. Porém, foram significativamente menores que os valores do material controle. Após 1 mês de armazenamento, nenhum material apresentou aumento significativo no valor de resistência a tração diametral (Gráfico 10).

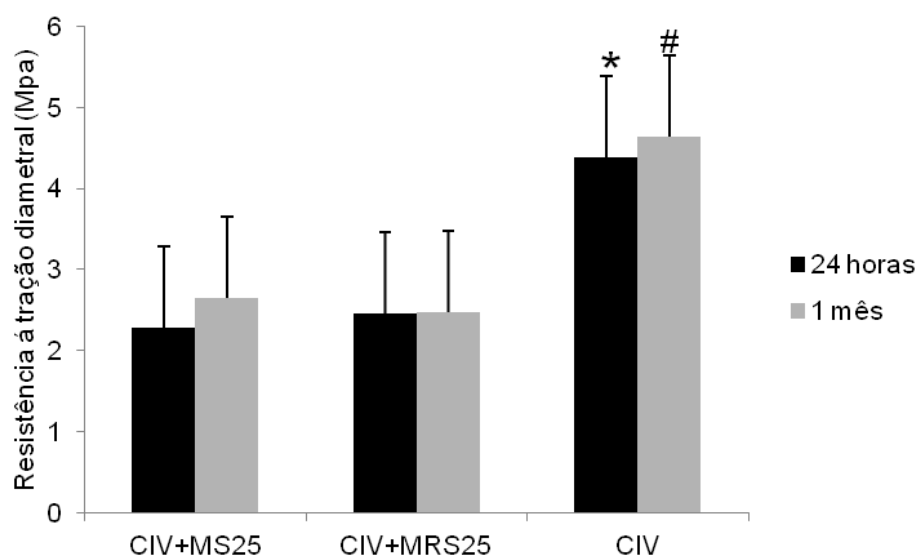


Gráfico 10: Média e desvio padrão dos valores de resistência à tração diametral (MPa) após 24 horas e 1 mês de armazenamento em meio úmido dos cimentos de ionômeros de vidro. Comparações entre os valores 24 horas e 1 mês: sem diferenças significativas para todos os grupos (teste t de *student* pareado). Comparações dos valores de 24 horas entre os diferentes grupos: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores de 1 mês entre os diferentes grupos: diferença significativa (#) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey)

5.10.3 RESISTÊNCIA À FLEXÃO

Os valores de resistência à flexão, dos materiais experimentais, após 24 h, foram significativamente reduzidos, em comparação ao material controle. No entanto, após 1 mês, o material controle apresentou uma redução nesta propriedades, enquanto que os materiais experimentais apresentaram aumento. Após 1 mês, houve diferença significativa somente entre os valores do CIV controle com o cimento de ionômero de vidro com micropartículas MS25. A alteração entre os valores de resistência à flexão após 24 h e 1 mês demonstrou tendência a aumentar nos materiais experimentais, atingindo valores aceitáveis. Embora, esse aspecto não tenha sido significativo para todos os materiais (Gráfico 11).

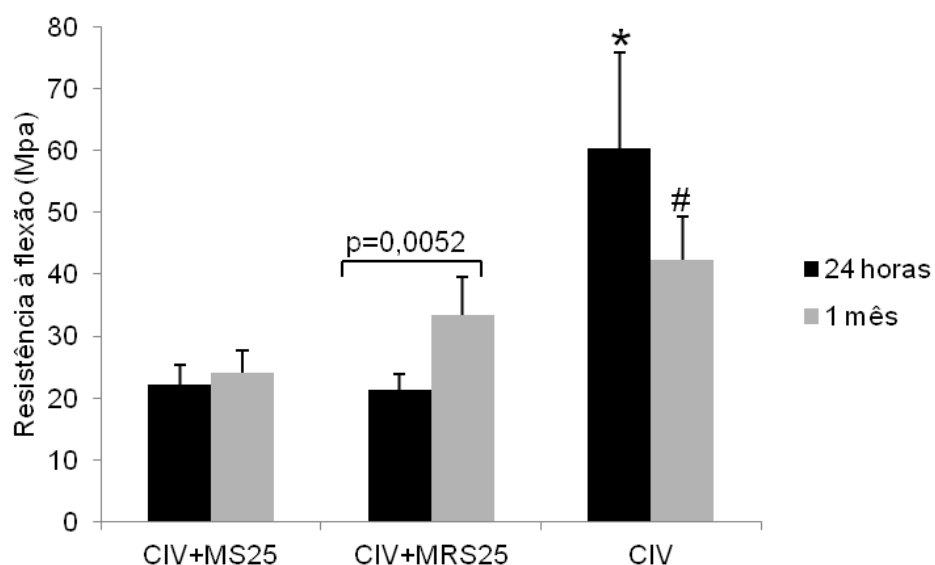


Gráfico 11: Média e desvio padrão dos valores de resistência à flexão (MPa) após 24 horas e 1 mês de armazenamento em meio úmido dos cimentos de ionômeros de vidro. Comparações entre os valores 24 horas e 1 mês: diferenças significativas no grupo CIV+MRS25 (teste t de *student* pareado). Comparações dos valores de 24 horas entre os diferentes grupos: diferença significativa (*) com CIV+MS25 e CIV+MRS25 ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey). Comparações dos valores de 1 mês entre os diferentes grupos: diferença significativa (#) com CIV+MS25 ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey)

6 DISCUSSÃO

O cimento de ionômero de vidro tem sido indicado amplamente como material restaurador, desde o início do seu uso na década de 1970. Isso deve-se ao fato de apresentar uma ação anticariogênica e adesividade à estrutura dentária (Mc Lean et al.¹ 1989, Mount² 1996). Sua capacidade anticariogênica está relacionada, principalmente, a capacidade de liberação do íon fluoreto, o que contribui para a remineralização de superfícies dentárias acometidas por lesão de cárie incipiente. Porém, a capacidade antibacteriana desse material é mínima (Yap et al.⁹⁴ 1999).

Considerando o elevado interesse em melhorar a capacidade antimicrobiana do cimento de ionômero de vidro, diversos autores têm sugerido a incorporação de um agente antimicrobiano ao material (Takahashi et al.²⁵ 2006, Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012). O objetivo dessa inclusão é auxiliar na redução das bactérias viáveis remanescentes nas cavidades cariosas. Esse fato, permitiria reduzir a possibilidade de surgimento de lesões de cárie secundárias em dentes que tenham sido restaurados, além disso, nos casos em que fosse utilizado o procedimento minimamente invasivo preconizado pelo tratamento restaurador atraumático. Nestes casos onde apenas a dentina desorganizada é removida e a dentina infectada deve ser mantida na cavidade dentária produzida. O que deixa muitos profissionais receosos com essa prática, já que haverá microrganismos remanescentes abaixo das restaurações feitas com essa técnica. Com a inclusão de substâncias antimicrobianas no material, seria possível reduzir essa preocupação, pois a ação antimicrobiana inviabilizaria a ação desses microrganismos. Por fim, a melhora da capacidade antimicrobiana do material possibilitaria reduzir a produção de MMPs o que tornaria a interface adesiva menos degradante. Todos esses fatores possibilitariam que as restaurações apresentassem maior longevidade, mesmo que isso gerasse uma redução da resistência mecânica do material.

Em função da ampla capacidade antibacteriana da clorexidina sobre o biofilme dental, a qual impede o crescimento dos microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento da cárie dental, bem como sua ação inibidora sobre as MMPs (Jones²⁴ 1997, Carrilho et al.²⁰ 2007, Carrilho et al.²¹ 2007, Imazato²³ 2009), surgiu a perspectiva de promover a inclusão desse fármaco no cimento de ionômero de vidro convencional de alta viscosidade assim como outros estudos propuseram (Takahashi

et al.²⁵ 2006, Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012). Todavia, deve-se salientar que em alguns estudos os antimicrobianos foram incluídos ao pó (Takahashi et al.²⁵ 2006; Yesilyurt et al.²⁹ 2009; Tüzüner et al.²⁶ 2011; Tüzüner, Ulusu³¹ 2012; Castilho et al.³⁰ 2012), inclusive a clorexidina (Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Tüzüner, Ulusu³¹ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Em outro estudo, os autores preferiram incorporar o antimicrobiano ao líquido (Tüzüner, Ulusu³¹ 2012).

Para a realização desse estudo, optou-se pela clorexidina pelas mesmas razões consideradas pelos diversos estudos com esse material. Trata-se de uma substância efetiva como agente antimicrobiano para o meio bucal (Jones²⁴ 1997, Yue et al.⁴² 2004, McCoy et al.⁶¹ 2008). Outro aspecto importante para ser salientado, é que nesse estudo optou-se pela incorporação da clorexidina por meio de micropartículas, diferentemente dos demais estudos que usaram na forma pura (Tüzüner et al.²⁶ 2011, Castilho et al.³⁰ 2012).

A perspectiva de microencapsulação da clorexidina visava permitir a partir das micropartículas, uma liberação lenta do antimicrobiano, associada à manutenção das características físicas e de desempenho do material odontológico. Para tanto, este estudo laboratorial foi constituído em duas etapas: (1) formulação e avaliação das micropartículas (met)acrílicas inovadoras de Clx Dg para serem adicionadas em cimentos de ionômeros de vidro e (2) investigação das propriedades citotóxicas, antimicrobianas e mecânicas desse material.

As micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg foram preparadas com sucesso para todas as formulações, apresentando rendimentos semelhantes e adequados para ambos os polímeros, Eudragit® S100 e Eudragit® RS100. Foram obtidas taxas médias de eficácia de encapsulação superiores a 90%. Porém, as micropartículas preparadas com Eudragit® RS100 mostraram uma melhor eficiência de encapsulação, na mesma concentração de fármaco, possivelmente por uma maior afinidade química entre o Eudragit® RS100 e o Clx Dg.

Esses resultados que foram considerados adequados estão, principalmente, relacionados ao procedimento de microencapsulação adotado. O método de emulsão em meio não-aquoso/evaporação do solvente proporcionou uma condição anidra crucial, a qual foi necessária para impedir a migração do Clx Dg à fase contendo óleo mineral, o qual foi previamente selecionado como fase externa para este fármaco. Em particular, os resultados do presente estudo são mais elevados

do que os relatados por Yue et al.⁴² (2004). Esses autores obtiveram micropartículas de Clx Dg usando poli(ácido láctico-co-ácido-glicólico) e sua associação com ciclodextrinas pelo método sólido/emulsão óleo em água/evaporação do solvente, resultando em valores de eficácia de encapsulação inferiores a 12%. Portanto, considerando os excelentes resultados encontrados nesta investigação e a elevada carga de bisbiguanida catiônica presente nas micropartículas (met)acrílicas, é possível propor a incorporação ao material assim como em outras formulações, como antisséptico para pele e produtos bucais, devido ao seu potencial como sistemas de liberação de fármaco.

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg, para ambos os polímeros, foi verificada a presença de agregados, estando esse resultado relacionado, novamente, ao método de obtenção escolhido. É bem conhecido que o método de emulsão em meio não-aquoso/evaporação do solvente tende a conduzir à agregação as partículas, resultando em aglomerados de maior tamanho (Deasy⁹⁵ 1984). Uma alternativa para evitar estes agregados é voltar a suspender as micropartículas, utilizando hidrocarbonetos alifáticos tais como pentano, hexano, heptano ou octano. No entanto, uma vez que o interesse está centrado na liberação controlada do fármaco, os agregados podem fornecer um desempenho melhorado, devido à redução da área de superfície exposta.

Os resultados de difração de raio X e FTIR demonstraram que as micropartículas apresentaram um perfil amorfo/não cristalino, sem a presença de microdomínios do Clx Dg, condizente ao tipo microesferas e resultante da interação apenas física entre fármaco e polímero. A ausência de reação química entre fármaco e polímero é o resultado esperado após a microencapsulação, pois viabiliza a liberação do Clx Dg a partir das matrizes poliméricas. Assim como a estabilidade térmica apresentada pelas micropartículas era o esperado, pois confirma que não ocorrerá degradação das mesmas frente a mudanças de temperatura.

Em relação ao ensaio de dissolução, os resultados demonstraram que ambos os polímeros, Eudragit® S100 e Eudragit® RS100, desempenharam um papel importante no controle da liberação do fármaco, o qual pode ser associado a diferentes aspectos, como razão polímero:fármaco e tipo de polímero (met)acrílico utilizado. Para ambos os polímeros, as formulações MS10 e MRS10 obtidas em uma razão polímero:fármaco de 9:1 (10% de fármaco) mostraram uma liberação mais lenta do

Clx Dg. Possivelmente, a maior quantidade de Eudragit® nessas formulações foi mais efetiva no controle da taxa de liberação do fármaco. Além disso, formulações à base de Eudragit® RS100 apresentaram uma liberação mais lenta de Clx Dg em comparação com as preparadas utilizando Eudragit® S100, na mesma razão polímero:fármaco. Esse resultado pode ser justificado pelo fato do Eudragit® RS100 ser um polímero insolúvel, com baixa permeabilidade e reduzida hidratação, independente do pH (Labarre et al.⁴⁹ 2011), diminuindo a liberação de Clx Dg. Por outro lado, o Eudragit® S100 é um polímero (met)acrílico solúvel a pH superior a 7,0 (Labarre et al.⁴⁹ 2011). Nesse sentido, o mesmo também permitiu a liberação controlada do fármaco, uma vez que foi usada uma saliva artificial com pH 6,5 como meio de dissolução, o que manteve esse polímero insolúvel.

A análise do comportamento de liberação demonstrou que a microencapsulação com Eudragit® S100 e Eudragit® RS100 reduziu a taxa de dissolução e alterou o perfil inicial de liberação do fármaco a um modelo cinético biexponencial, o que pode ser considerado um efeito interessante. Pois, a liberação imediata pode ajudar a atingir a concentração eficaz de Clx Dg rapidamente na cavidade bucal, ao passo que a liberação controlada pode manter a concentração eficaz do fármaco durante um longo período de tempo (Mendes et al.⁹⁶ 2012).

Os resultados do potencial antimicrobiano comprovaram que as micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg, após 24 h, apresentam um potencial semelhante a solução aquosa comercial de Clx Dg utilizada para bochecho, que nesse estudo foi usada como controle positivo. Com isso, comprovou-se que o processo de microencapsulação não prejudicou o desempenho antimicrobiano do Clx Dg.

Uma vez que as micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg foram preparadas com sucesso pelo método de emulsão em meio não-aquoso/evaporação do solvente, com as características de: partículas de tamanho micrométrico, termoestáveis, amorfas/não-cristalinas, com alta eficiência de encapsulação do fármaco e atividade antimicrobiana comprovada, a segunda etapa deste trabalho consistiu na incorporação dessas formulações em um cimento de ionômero de vidro comercial, Ketac™ Molar Easymix. A escolha desse cimento foi baseada por ser um material com reconhecimento internacional. Além disso, por ser um material amplamente indicado para uso no tratamento restaurador atraumático (Frencken, Holmgren⁶ 2001). Com base nas características das micropartículas, sobretudo o teor de fármaco incorporado, e a capacidade de liberação controlada do mesmo, optou-se

pela utilização das micropartículas com maior concentração de Clx Dg de ambos os polímeros (met)acrílicos.

A incorporação das micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg ocorreu de forma adequada não interferindo na manipulação e geleificação do material, fato que pode ser verificado pelo uso do material nas etapas subsequentes, onde houve necessidade de manipulação do mesmo no preparo de corpos-de-prova.

Assim como um potencial antimicrobiano é interessante para os materiais odontológicos, informações sobre seu efeito irritativo aos tecidos biológicos também são importantes. Dessa forma, a biocompatibilidade do cimento de ionômero de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg foi investigado por meio dos ensaios de citotoxicidade, afim de fornecer evidências complementares referentes à sua interação com a polpa dental e os tecidos moles adjacentes (Six et al.⁶³ 2000, Wataha⁷⁰ 2001, Lessa et al.⁶⁷ 2008).

Os resultados obtidos nos ensaios em células de tecidos moles, fibroblastos gengivais humanos, demonstraram que os materiais experimentais não apresentaram maior citotoxicidade do que o material comercial, sem as micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg. Isso indica que o seu uso não causará maior injúria aos tecidos moles da cavidade bucal que porventura entrem em contato com o material restaurador (Six et al.⁶³ 2000, Lessa et al.⁶⁷ 2008). Para reproduzir a maioria das possibilidades clínicas, duas formas diferentes de ensaio foram realizadas, uma delas foi contato indireto, a qual engloba a maioria dos casos, onde o material restaurador não fica em contato com os tecidos moles, exemplo disso são as restaurações em cavidades tipo classe I (envolvendo somente superfícies oclusais). Nesse caso, utilizou-se o meio de cultura obtido no esquema dinâmico, que objetivava reproduzir a ação da saliva em alterar o meio frequentemente. O ensaio de contato direto, utilizando o próprio material restaurador, reproduz casos clínicos onde há contato do material restaurador e os tecidos moles, exemplo típico são as restaurações de cavidades tipo classe V (envolvem superfícies vestibular e/ou lingual na cervical, geralmente próximas ao tecido gengival) ou classe II (envolvendo superfícies proximais).

Ao comparar os valores de viabilidade celular obtidos com o controle de meio de cultura fresco, verificou-se que no esquema acumulativo em ambos os ensaios, contato indireto e contato direto, os materiais experimentais e o material controle apresentaram grande efeito citotóxico. O que está fortemente relacionado à

presença de monômeros residuais no material e não em função das micropartículas. Deve-se salientar que o efeito acumulativo dificilmente ocorre, como resultado da ação da saliva. Os dados encontrados devem servir de alerta e contraindicar o uso dos materiais em restaurações onde ocorra o contato direto com os tecidos moles e em cavidades profundas.

Ao analisar os dados do ensaio indireto, esquema dinâmico, observou-se que eles corroboram com os resultados disponíveis na literatura científica, para cimentos de ionômero de vidro já comercializados. Há maior citotoxicidade nas primeiras horas, após a sua manipulação, possivelmente relacionado ao baixo pH inicial ocasionado pela reação de presa e/ou pela liberação de produtos tóxicos, resultantes da reação de presa do material (Lessa et al.⁶⁷ 2008, Castilho et al.²⁸ 2013). Porém, assim como verificado por Castilho et al.²⁸ 2013, a clorexidina apresentou uma tendência a estimular o metabolismo celular, o que se torna mais um ponto positivo para o uso de cimentos de ionômero de vidro com clorexidina.

Os resultados obtidos para a análise da atividade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* estão de acordo com os verificados na literatura para outros estudos de incorporação de diferentes agentes antimicrobianos em cimentos de ionômeros de vidro (Hoszek, Ericson⁵⁹ 2008, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Tüzüner et al.²⁶ 2011, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). O que demonstrou que a incorporação de micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg foram eficazes para dar ao cimento de ionômero de vidro uma ação antimicrobiana sobre as bactérias cariogênicas. A permanência da ação antimicrobiana por um longo período de tempo ficou de acordo com os estudos de Hoszek, Ericson⁵⁹ (2008) e Tüzüner et al.²⁶ (2011), que verificaram essa ação por mais de 48 h. O que torna-se muito importante pelo fato dos cimentos de ionômeros de vidro já comercializados terem apenas um efeito antimicrobiano, nas primeiras horas, possivelmente resultante dos monômeros residuais da reação de presa.

A capacidade de liberação de íon fluoreto do cimento de ionômero de vidro é o principal fator responsável pela ação cariostática do material, interagindo no processo des-remineralização (Pedrini et al.⁷⁸ 2001, Bombonatti et al.⁸³ 2003, Wiegand et al.⁵⁴ 2007), o que torna essa propriedade de extrema importância para ser avaliada quando se desenvolvem novos materiais. A manutenção dessa capacidade foi comprovada neste estudo, demonstrando que a incorporação de micropartículas

(met)acrílicas não prejudicou a ação cariostática do material. Verificou-se ainda que os materiais experimentais apresentaram melhores valores de liberação de íon fluoreto em comparação com o material controle, possivelmente pela modificação das ligações resultantes do processo de reação de presa e permeabilidade do material (Wiegand et al.⁵⁴ 2007). Tüzüner et al.²⁶ (2011) verificaram a redução da capacidade de liberação de íon fluoreto após incorporação de diacetato de clorexidina+cetrimida (2,5 / 2,5%), possivelmente porque os antimicrobianos foram incorporados na forma pura. Assim como, Hoszek, Ericson⁵⁹ (2008), verificaram redução dessa capacidade após incorporação de 10% de Clx Dg. Um dos objetivos da microencapsulação foi redução dos efeitos de interação dos antimicrobianos (clorexidina e íon fluoreto) no CIV, o qual foi atingido com sucesso.

Um dos objetivos primordiais das restaurações de dentes com lesões de cárie cavitadas é possibilitar um melhor controle do biofilme dentário por meio da higienização bucal. Normalmente, usa-se escova dental e dentifrício para que esse controle de biofilme dentário seja eficaz. Dessa forma, esse procedimento provoca alterações nas superfícies dentais bem como nos materiais restauradores devido ao uso diário da escova dental e dos dentifrícios. Essas alterações ocorrem em virtude da abrasividade dos dentifrícios e pela ação das cerdas das escovas dentais. Esses aspectos devem ser considerados e avaliados quando se elaboram novos materiais. Deve-se reforçar que essas informações são importantes no ato da escolha do material restaurador e dos agentes mecânicos de higiene bucal (Momoi et al.⁹ 1997, Mondelli et al.¹¹ 2005). Salienta-se que a resistência à abrasão é um fator importante para garantir maior longevidade às restaurações. A resistência à abrasão dos materiais experimentais foi avaliada por meio do teste de escovação simulada utilizando três parâmetros: massa, rugosidade superficial e dureza superficial.

Por ser um material que possui água na sua composição, e apresentar uma grande afinidade com a mesma, o procedimento de avaliação de massa foi muito criterioso e padronizado. Caso contrário, a perda de massa causada pela abrasão poderia ser mascarada pela desidratação do material. Ao realizar as pesagens iniciais de todos os materiais, verificou-se comportamento semelhante quanto ao tempo necessário para estabilizar a massa dos corpos-de-prova. Ao avaliar os valores antes e após o procedimento abrasivo (escovação simulada), verificou-se que todos os materiais apresentaram perda de massa significativa. A qual foi menor no material controle. Porém, ao compararem-se os valores de perda de massa, diferença entre

os valores iniciais dos finais, não foram encontradas diferenças significativas entre os materiais controle e os experimentais. Isso permite comprovar que a incorporação das micropartículas (met)acrílicas não causaram perdas significativas nessa propriedade. A literatura científica mostra que materiais já comercializados apresentaram valores de massa semelhantes aos materiais experimentais desse estudo, o que demonstrou que os valores dos mesmos são aceitáveis (Rios et al.¹⁰ 2002, Reinke et al.¹⁵ 2011). O cimento de ionômero de vidro com micropartículas MRS25 teve melhores resultados que o cimento de ionômero de vidro contendo micropartículas MS25. Esse fato pode estar relacionado a uma melhor afinidade do polímero Eudragit® RS100 com os componentes do cimento de ionômero de vidro.

A rugosidade superficial é outro parâmetro demonstrativo de resistência à abrasão dos materiais restauradores. A principal consequência do aumento da rugosidade superficial é o aumento no acúmulo de biofilme dental, o que pode levar ao desenvolvimento de lesões de cárie secundárias (Quirynen et al.¹⁶ 1990, Bollen et al.¹⁸ 1997). Ao comparar os dados de rugosidade superficial obtidos neste estudo, foi constatado que nenhum dos materiais avaliados apresentou valores de rugosidade superficial inicial dentro do preconizado por Bollen et al.¹⁸ (1997), que sugeriram que o valor máximo para a rugosidade superficial deveria ser de 0,2 μm . Valores acima desse poderiam propiciar maior predisposição à colonização bacteriana. O interessante é que o material com menor rugosidade superficial inicial foi o cimento de ionômero de vidro contendo micropartículas MRS25, cujo valor atingiu 0,76 μm . Salienta-se que esse valor é três vezes mais alto que o valor aceitável de rugosidade superficial, o que reforça a necessidade da realização de acabamento e polimento das superfícies das restaurações, conforme citado por Peres et al.⁹⁷ (2009).

As diferenças nos valores da rugosidade superficial estão relacionadas principalmente ao tamanho das partículas (Gladys et al.¹³ 1997, Rios et al.¹⁰ 2002, Mondelli et al.¹¹ 2005). No caso do cimento de ionômero de vidro Ketac™ Molar Easymix, o fabricante menciona que são menores de 14 μm enquanto as micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg MS25 apresentaram valores médios de 2,01 μm e as MRS25 valores médios de 21,07 μm . O maior valor final e o aumento significativo da rugosidade superficial, observados somente para o cimento de ionômero de vidro contendo as micropartículas MRS25 deve-se, possivelmente, a abrasão ocasionada pelas cerdas das escovas dentais, ter causado a exposição das micropartículas (met)acrílicas que possuem um diâmetro mais elevado. Porém, esse

aspecto não inviabiliza o uso do material, já que Reinke et al.¹⁵ (2011) observaram valores semelhantes para cimentos de ionômero de vidro já comercializados. Os valores de rugosidade iniciais de todos os materiais e após abrasão do material controle e do cimento de ionômero de vidro contendo micropartículas MS25 estão de acordo com os valores encontrados no estudo de Rios et al.¹⁰ (2002), Wang et al.¹⁴ (2009) e Reinke et al.¹⁵ (2011) para os cimentos de ionômero de vidro.

Os valores de R_t demonstraram um perfil semelhante a R_a . Foi possível verificar que a abrasão causou um desgaste da matriz formada em torno e sobre as partículas de vidro e micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg expondo as mesmas. Assim como, pode ter ocorrido o deslocamento dessas partículas, causando cavidades as quais tornaram-se responsáveis pelo aumento da rugosidade superficial. A exposição de possíveis bolhas de ar formadas no interior do material durante a manipulação também contribui para esse aumento (Gladys et al.¹³ 1997, Wang et al.¹⁴ 2009).

A última propriedade testada relacionada à resistência à abrasão, foi a dureza superficial. Esse parâmetro por si só, é capaz de demonstrar a qualidade do material restaurador, possibilitando avaliar seu comportamento frente ao contato com outro material restaurador ou com o esmalte dental. O que pode influenciar no desgaste que o CIV irá sofrer ou causar (Gladys et al.¹³ 1997, Xie et al.⁴ 2000, Ellakuria et al.⁵⁶ 2003, Reinke et al.¹⁵ 2011). Diferentes estudos efetuaram alterações na composição do cimento de ionômero de vidro e detectaram uma redução do valor de dureza superficial. Igualmente verificou-se no presente estudo, que em todos os períodos (antes e após a abrasão), os materiais experimentais apresentaram valores significativamente menores (Gladys et al.¹³ 1997, Xie et al.⁴ 2000, Ellakuria et al.⁵⁶ 2003, Tüzuner et al.²⁶ 2011, Tüzuner, Ulusu³¹ 2012).

Estudos com a adição de antimicrobianos aos cimentos de ionômeros de vidro, os quais analisaram os valores de dureza, porém sem o procedimento de abrasão, encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo, com uma perda significativa dos valores de dureza (Tüzuner et al.²⁶ 2011, Tüzuner, Ulusu³¹ 2012). Nesses trabalhos foi verificada uma relação entre o aumento da concentração do antimicrobiano e a perda nos valores de dureza, assim como observaram que, após sete dias, os materiais experimentais apresentaram redução do valor de dureza, enquanto o material controle continuou a aumentar (Tüzuner et al.²⁶ 2011, Tüzuner, Ulusu³¹ 2012). Ellakuria et al.⁵⁶ (2003) comprovaram que o cimento de ionômero de

vidro, após diferentes períodos de tempo de armazenamento, apresentaram um aumento do valor de dureza superficial. Acredita-se que esse fator é resultante da maturação da matriz e completa reação ácido-base (Ellakuria et al.⁵⁶ 2003). Sendo assim, a camada superficial do material apresenta menor valor de dureza, porque durante a sua reação de pressa, permanece exposta ao meio. Como essa camada será removida após a abrasão por escovação acredita-se que o material apresente um maior valor de dureza superficial. Com base nessas informações, é possível questionar se o baixo valor de alteração da dureza superficial dos materiais experimentais, após o procedimento abrasivo (escovação simulada), é resultante de um material mais resistente à abrasão, ou de uma menor reação de pressa nas camadas mais internas do material. Deve-se salientar que o importante é que nesse estudo, os valores relatados para os materiais experimentais são semelhantes a alguns cimentos de ionômero de vidro já comercializados (Reinke et al.¹⁵ 2011).

Neste estudo, optou-se pelo uso de três parâmetros para avaliar a resistência à abrasão, por acreditar-se que, assim, mais subsídios seriam fornecidos para concluir sobre a qualidade dos materiais experimentais em comparação com o material controle, e se estes valores são aceitáveis em relação aos dados da literatura.

A avaliação dos materiais experimentais completou-se com a realização de avaliação de três propriedades mecânicas: resistência à compressão, à tração diametral e à flexão. Testes que permitem reproduzir as forças mastigatórias que incidem sobre o material restaurador quando encontra-se na cavidade bucal. Esta avaliação é de extrema importância, já que diversos estudos que avaliaram modificações nos cimentos de ionômeros de vidro encontraram diferenças de outros parâmetros já relatados, e ao avaliar algumas destas propriedades mecânicas relatam uma melhora (Xie et al.⁴ 2000, Cefaly et al.⁵⁵ 2003, Kaliex et al.⁵⁷ 2004).

Os estudos que realizaram a incorporação de antimicrobianos no cimento de ionômero de vidro optaram, principalmente, pela avaliação da resistência à compressão (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Ahluwalia et al.²⁷ 2012, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). No presente estudo, verificou-se que houve redução dos valores de resistência à compressão nos materiais experimentais, o que foi observado na maioria dos trabalhos que promoveram a incorporação de antimicrobianos (Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009, Castilho et al.³⁰ 2012, Castilho et al.²⁸ 2013). Somente Ahluwalia et al.²⁷ (2012), que incorporou 1% de diacetato de clorexidina ao cimento de ionômero de vidro modificado por resina, não

verificou diferenças significativas na resistência à compressão e à tração diametral. Nesta investigação todos os materiais apresentaram aumento do valor de resistência à compressão após 1 mês de análise. Assim como, foi verificado nos estudos anteriores encontrados na literatura científica (Corrêa, Ogasawara⁸⁸ 2006, Takahashi et al.²⁵ 2006, Yesilyurt et al.²⁹ 2009). Este aumento não foi significativo, somente, para o cimento de ionômero de vidro contendo micropartículas MRS25.

Os resultados de resistência à tração diametral demonstraram que, em ambos os momentos testados os materiais experimentais foram semelhantes entre si e diferentes estatisticamente do material controle. Além disso, após 1 mês de análise, não houve aumento significativo desses valores. Esses dados diferem dos verificados por Yesilyurt et al.²⁹ (2009), Ahluwalia et al.²⁷ (2012), Castilho et al.³⁰ (2012) e Castilho et al.²⁸ (2013). Possivelmente, isso se deve ao fato desses pesquisadores terem empregado concentração menor de antimicrobiano, no máximo 4,5%. Entretanto esses autores verificaram que, quanto maior a concentração do antimicrobiano, menor a resistência à tração diametral.

Seguindo a mesma lógica dos dados de resistência à compressão e à tração diametral, nos resultados de resistência à flexão, foi observado que os materiais experimentais apresentaram valores significativamente menores que o controle, após 24 h. Porém, após 1 mês, o material controle apresentou queda desse valor, enquanto os experimentais revelaram um aumento. Esse aumento foi significativo para o cimento de ionômero de vidro contendo as micropartículas MRS25. O aumento tardio sugeriu haver um possível atraso na reação de presa do material, o que demonstrou que com o passar do tempo, os materiais tendem a alcançar um valor ideal.

Os valores de resistência à compressão e flexão verificados para os cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg, mesmo baixos, encontram-se dentro dos valores aceitáveis para os cimentos de ionômero de vidro. O que pode ser verificado em relatos na literatura científica (Xie et al.⁴ 2000). Deve-se salientar que nesses estudos inclusive empregando materiais já comercializados.

A redução da qualidade nas propriedades mecânicas é um possível resultado da ação das micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg, as quais podem dificultar a reação do poli(ácido acrílico) com o vidro. Relacionada também a alteração na proporção pó:líquido resultante da incorporação das micropartículas (met)acrílicas

seria uma justificava que está de acordo com o que já foi extensivamente descrito na literatura. (Rios et al.¹⁰ 2002, Billington et al.⁹⁷ 2004).

Nesse estudo, foi possível verificar que a incorporação de micropartículas (met)acrílicas causou alterações positivas e negativas no cimento de ionômero de vidro. Fato que está relacionado a composição e às características do material final, como já detalhado. Como esperado, o cimento de ionômero de vidro (controle) apresentou melhores propriedades mecânicas que os materiais experimentais. Mas, entre os materiais experimentais, em um contexto geral, o cimento de ionômero de vidro com micropartículas MRS25 teve resultados bem interessantes e seria o de primeira escolha. Contudo, estudos *in vivo* adicionais são necessários para demonstrar que as micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg podem constituir uma nova abordagem promissora, a fim de manter uma atividade antimicrobiana bucal durante um longo período de tempo e, conseqüentemente, diminuir a reincidência de lesões cariosas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- ✓ As formulações propostas foram preparadas com sucesso pelo método de emulsão em meio não-aquoso/evaporação do solvente, obtendo-se micropartículas (met)acrílicas inovadoras de digluconato de clorexidina;
- ✓ O teor de digluconato de clorexidina presente nas micropartículas (met)acrílicas apresentou valores elevados, caracterizando uma alta eficiência de encapsulação do fármaco;
- ✓ As micropartículas (met)acrílicas de Clx Dg revelaram tamanho micrométrico, foram termoestáveis e amorfas/não-cristalinas;
- ✓ As micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina provocaram uma liberação lenta e controlada do fármaco;
- ✓ As micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina exerceram atividade antimicrobiana comprovadamente elevada;
- ✓ Pelo método de incorporação geométrica, as micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina foram adicionadas com sucesso ao cimento de ionômero de vidro;
- ✓ Os cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina, por meio de testes de cultura de células humanas, tiveram baixo valor de citotoxicidade, sendo semelhante ao do cimento de ionômero de vidro comercial;
- ✓ Os cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina apresentaram elevada atividade microbiológica;
- ✓ Os cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina mantiveram a capacidade de liberação e recarga do íon fluoreto;
- ✓ Os cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina, conduziram a valores de resistência à abrasão semelhantes ao do cimento de ionômero de vidro comercial;
- ✓ Os cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas de digluconato de clorexidina apresentaram propriedades mecânicas reduzidas quando comparados ao cimento de ionômero de vidro comercial. Porém, dentro

dos limites aceitáveis para a resistência à compressão e resistência à flexão.

Conclui-se que foi possível desenvolver, caracterizar e avaliar cimentos de ionômeros de vidro contendo micropartículas (met)acrílicas inovadoras. Os quais apresentaram alterações positivas e negativas quando comparados ao cimento de ionômero de vidro comercial. Entretanto, os pontos positivos se sobrepõem aos negativos, o que caracteriza esses novos materiais experimentais como promissores ao uso clínico.

REFERÊNCIAS *

1. Mc Lean J, Wilson HJ, Brown D. Materiais dentários e suas aplicações. São Paulo:Santos, 1989.
2. Mount GJ. Atlas de cimentos de ionômero de vidro. 2ª ed. São Paulo:Santos, 1996.
3. Weerheijm KL, Groen HJ. The residual caries dilemma. Community Dent Oral Epidemiol. 1999 Dec;27(6):436-41.
4. Xie D, Brantley WA, Culbertson BM, Wang G. Mechanical properties and microstructures of glass-ionomer cements. Dent Mater. 2000 Mar;16(2):129-38.
5. Smales RJ, Gao W. *In vitro* caries inhibition at the enamel margins of glass ionomer restoratives developed for the ART approach. J Dent. 2000 May;28(4):249-56.
6. Frencken JE, Holmgren C. Tratamento restaurador atraumático (ART) para a Cárie Dentária. São Paulo:Santos, 2001.
7. Heath JR, Wilson HJ. Abrasion of restorative materials by toothpaste. J Oral Rehabil. 1976 Apr;3(2):121-38.
8. Forss H, Seppä L, Lappalainen R. *In vitro* abrasion resistance and hardness of glass-ionomer cements. Dent Mater. 1991 Jan;7(1):36-9.
9. Momoi Y, Hirotsaki K, Kohno A, McCabe JF. *In vitro* toothbrush-dentifrice abrasion of resin-modified glass ionomers. Dent Mater. 1997 Mar;13(2):82-8.
10. Rios D, Honório HM, de Araújo PA, Machado MA. Wear and superficial roughness of glass ionomer cements used as sealants, after simulated toothbrushing. Pesqui Odontol Bras. 2002 Oct-Dec;16(4):343-8.
11. Mondelli RFL, Wang L, Garcia FCP, Prakki A, Mondelli J, Franco EB, et al. Evaluation of weight loss and surface roughness of compomers after simulated toothbrushing abrasion test. J Appl Oral Sci. 2005 Jun;13(2):131-5.
12. Kielbassa AM, Gillmann L, Zantner C, Meyer-Lueckel H, Hellwig E, Schulte-Mönting J. Profilometric and microradiographic studies on the effects of toothpaste and acidic gel abrasivity on sound and demineralized bovine dental enamel. Caries Res. 2005 Sep-Oct;39(5):380-6.
13. Gladys S, Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative physico-mechanical characterization of new hybrid restorative materials with conventional glass-ionomer and resin composite restorative materials. J Dent Res. 1997 Apr;76(4):883-94.
14. Wang L, Cefaly DF, Dos Santos JL, Dos Santos JR, Lauris JR, Mondelli RF, et al. *In vitro* interactions between lactic acid solution and ART glass-ionomer cements. J Appl Oral Sci. 2009 Aug;17(4):274-9.

* De acordo com a norma do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da UEPG, baseada no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

15. Reinke SMG, Rastelli MCS, Santos FA, Wambier DS. Ação de escovas dentais de diferentes texturas em cimentos de ionômero de vidro indicados para o tratamento restaurador atraumático. *Pesq Bras Clin Integr*. 2011 Abr-Jun;11(2):151-8.
16. Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An *in vivo* study in man. *J Clin Periodontol*. 1990 Mar;17(3):138-44.
17. 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.
18. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent Mater*. 1997 Jul;13(4):258-69.
19. Cho S, Cheng AC. A review of glass a ionomer restorations in the primary dentition. *J Can Dent Assoc*. 1999 Sep;65(9):491-5.
20. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res*. 2007 Jan;86(1):90-4.
21. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. *In vivo* preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007 Jun;86(6):529-33.
22. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol*. 2008 Feb;53(2):109-16.
23. Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J*. 2009 Jan;28(1):11-9.
24. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*. 1997 Oct;15:55-62.
25. Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater*. 2006 Jul;22(7):647-52.
26. Tüzüner T, Kusgöz A, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent*. 2011 Feb;23(1):46-55.
27. Ahluwalia P, Chopra S, Thomas AM. Strength characteristics and marginal sealing ability of chlorhexidine-modified glass ionomer cement: an *in vitro* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2012 Jan-Mar;30(1):41-6.
28. Castilho AR, Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA et al. *In vitro* and *in vivo* investigation of the biological and mechanical behaviour

- of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent.* 2013 Feb;41(2):155-63.
29. Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent.* 2009 Jan-Feb;34(1):18-23.
 30. Castilho AR, Duque C, Negrini TC, Sacono NT, de Paula AB, Sacramento PA, et al. Mechanical and biological characterization of resin-modified glass-ionomer cement containing doxycycline hyclate. *Arch Oral Biol.* 2012 Feb;57(2):131-8.
 31. Tüzüner T, Ulusu T. Effect of antibacterial agents on the surface hardness of a conventional glass-ionomer cement. *Appl Oral Sci.* 2012 Feb;20(1):45-9.
 32. Ahmad M, Madni A, Usman M, Munir A, Akhtar N, Khan HMS. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. *World Acad Sci Eng Technol.* 2011 Mar;51:384-7.
 33. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986 Jun;57(6):370-7.
 34. Gupta R, Chandavarkar V, Galgali SR, Mishra M. Chlorhexidine. A medicine for all the oral diseases. *GJMEDPH* 2012 Abr;1(2):43-8.
 35. Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Oct;62(4):730-7.
 36. Campbell AA, Song L, Li XS, Nelson BJ, Bottoni C, Brooks DE et al. Development, characterization, and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization. *J Biomed Mater Res.* 2000 Abr;53(4):400-7.
 37. Mohammadi, Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009 Abr;42(4):288-302.
 38. Arnold RR, Wei HH, Simmons E, Tallury P, Barrow DA, Kalachandra S. Antimicrobial activity and local release characteristics of chlorhexidine diacetate loaded within the dental copolymer matrix, ethylene vinyl acetate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Aug;86(2):506-13.
 39. Ng SM, Choi JY, Han HS, Huh JS, Lim JO. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: hydrogen peroxide as a candidate compound. *Int J Pharm.* 2010 Jan 15;384(1-2):120-7.
 40. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm.* 2008 Nov 3;363(1-2):26-39.
 41. Farago PV, Raffin RP, Pohlmann AR, Guterres SS, Zawadzki SF. Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *J Braz Chem Soc.* 2008

Aug;19(7):1298-305.

42. Yue IC, Poff J, Cortés ME, Sinisterra RD, Faris CB, Hildgen P, et al. A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3743-50.
43. Naik JB, Lokhande AB, Mishra S, Kulkarni RD. Development of sustained release micro/nano particles using different solvent emulsification techniques: a review. *Int J Pharm Bio Sci*. 2012 Oct-Dec;3(4):573-90.
44. Raffin RP, Colomé LM, Pohlmann AR, Guterres SS. Preparation, characterization, and in vivo anti-ulcer evaluation of pantoprazole-loaded microparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006 Jun;63(2):198-204.
45. Akhtar M, Ahmad M, Khan SA, G. Murtaza G. Novel modified release tableted microspheres of ibuprofen and misoprostol in a combined formulation: Use of software DDSolver®. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2012 Sep;6(36):2613-20.
46. Garud, N, Garud A. Preparation and *in-vitro* evaluation of metformin microspheres using non-aqueous solvent evaporation technique. *Trop J Pharm Res*. 2012 Aug;1(4):577-83.
47. Nath B, Nath LK, Kumar P. Preparation and in vitro dissolution profile of zidovudine loaded microspheres made of Eudragit RS 100, RL 100 and their combinations. *Acta Pol Pharm*. 2011 May-Jun;68(3):409-15.
48. Kibbe A. Handbook of pharmaceutical excipients. 3^a ed. Washington:American Pharmaceutical Association, 2000.
49. Labarre D, Ponchel G, Vauthier C. Biomedical and pharmaceutical polymers. Londres:Pharmaceutical Press, 2011.
50. United States Pharmacopéia: National Formulary 2005. EUA:US Pharmacopeial Convention, 2005.
51. Haznedar S, Dortunç B. Preparation and *in vitro* evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *Int J Pharm*. 2004 Jan 9;269(1):131-40.
52. Wu PC, Huang YB, Chang JS, Tsai MJ, Tsai YH. Design and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared by Eudragit®. *Eur J Pharm Sci*. 2003 Jun;19(2-3):115-22.
53. Rodrigues LA, Marchi GM, Serra MC, Hara AT. Visual evaluation of *in vitro* cariostatic effect of restorative materials associated with dentifrices. *Braz Dent J*. 2005 May-Aug;16(2):112-8.
54. 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.
55. Cefaly DF, Franco EB, Mondelli RF, Francisconi PA, Navarro MF. Diametral tensile strength and water sorption of glass-ionomer cements used in atraumatic restorative

- treatment. J Appl Oral Sci. 2003 Jun;11(2):96-101.
56. Ellakuria J, Triana R, Mínguez N, Soler I, Ibaseta G, Maza J, et al. Effect of one-year water storage on the surface microhardness of resin-modified versus conventional glass-ionomer cements. Dent Mater. 2003 Jun;19(4):286-90.
 57. Kalix AP, Dias AR, Oliveira ARB, Dias KR. Avaliação de propriedades mecânicas e liberação de flúor de dois ionômeros de vidro e de um compômero. Rev Bras Odontol. 2004;61(3/4):152-4.
 58. Kunzelmann KH, Bürkle V, Bauer C. Two-body and three-body wear of glass ionomer cements. Int J Paediatr Dent. 2003 Nov;13(6):434-40.
 59. Hoszek A, Ericson D. *In vitro* fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine gluconate. Oper Dent. 2008 Nov-Dec;33(6):696-701.
 60. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine-incorporated polymethyl methacrylate-based resin cement. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010 Jul;94(1):134-40.
 61. McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR, Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use. Results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. JADA. 2008 Feb;139:178-83.
 62. Leyhausen G, Abtahi M, Karbakhsch M, Sapotnick A, Geurtsen W. Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. Biomaterials. 1998 Mar;19(6):559-64.
 63. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. *In vivo* study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. J Dent. 2000 Aug;28(6):413-22.
 64. de Souza Costa CA, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. *In vitro* cytotoxicity of five glass-ionomer cements. Biomaterials. 2003 Sep;24(21):3853-8.
 65. Aranha AMF, Giro EM, Souza PP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer lining cements applied to an odontoblast-cell line. Dent Mater. 2006 Sep;22(9):864-9.
 66. de Souza Costa CA, Hebling J, Randall RC. Human pulp response to resin cements used to bond inlay restorations. Dent Mater. 2006 Oct;22(10):954-62.
 67. Lessa FCR, Cidade CPV, Nogueira I, Hebling J, Souza Costa CA. Efeito citotóxico de um novo cimento de ionômero de vidro modificado por resina aplicado sobre células odontoblastóides. Robrac 2008 Jun;17(43):46-56.
 68. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. Toxicol *in vitro*. 2008 Mar;22(2):308-17.
 69. Bakopoulou A, Mourelatos D, Tsiftoglou AS, Giassin NP, Mioglou E, Garefis P. Genotoxic and cytotoxic effects of different types of dental cement on normal

- cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 2009 Jan 31;672(2):103–12.
70. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.* 2001 Aug;86(2):203-9.
 71. Baratieri LN, Andrade MAC, Monteiro Júnior S, Cardoso AC, Polidoro JS, Andrada RC et al. *Dentística – Procedimentos preventivos e restauradores*. 2ª ed. São Paulo: Ed. Santos, 1995.
 72. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tay FR. Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine-incorporated polymethyl methacrylate-based resin cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Jul;94(1):134-40.
 73. Ten Cate JM. *In vitro* studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res.* 1990 Feb;69 Spec No:614-9; discussion 634-6.
 74. Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991 Jul-Sep;2(3):283-96.
 75. Chaves SCL, Vieira-da-Silva LM. A efetividade do dentifrício fluoretado no controle da cárie dental: uma meta-análise. Efeito anticárie do dentifrício fluoretado. *Rev Saúde Pública.* 2002 Out;36(5):598-606.
 76. Neelakantan P, John S, Anand S, Sureshbabu N, Subbarao C. Fluoride release from a new glass-ionomer cement. *Oper Dent* 2011 Jan-Feb;36(1):80-5.
 77. Markovic DL, Petrovic BB, Peric TO. Fluoride content and recharge ability of five glass ionomer dental materials. *BMC Oral Health.* 2008 Jul 28;8:21.
 78. Pedrini D, Gaetti-Jardim Jr E, Mori GG. Influência da aplicação de flúor sobre a rugosidade superficial do ionômero de vidro Vitremer e adesão microbiana a este material. *Pesqui Odontol Bras.* 2011 Jan-Mar;15(1):70-6.
 79. Aguiar DA, Silveira MR, Ritter DE, Locks A, Calvo MCM. Avaliação das propriedades mecânicas de quatro cimentos de ionômero de vidro convencionais utilizados na cimentação de bandas ortodônticas. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2008 Mai-Jun;13(30):104-1.
 80. Sá LT, González-Cabezas C, Cochran MA, Fontana M, Matis BA, Moore BK. Fluoride releasing materials: their anti-cariogenic properties tested *in vitro* caries models. *Oper Dent.* 2004 Sep-Oct;29(5):524-31.
 81. Silva FDSCM, Duarte RM, Sampaio FC. Liberação e recarga de flúor por cimentos de ionômero de vidro. *Rev Gaúcha Odontol.* 2010 Out-Dez; 58(4): 437-43.
 82. Bombonatti JFS, Navarro MFL, Elias ER, Buzalaf MAR, Lauris JRP, Delbem ACB. Liberação de flúor do Vitremer em diferentes proporções pó/líquido, em comparação com dois selantes de fóssulas e fissuras. *Rev. Ci. Méd. Biol.* 2003 Jul-Dez;2(2):201-7.
 83. Heintze SD, Cavalleri A, Forjanic M, Zellweger G, Rousson V. A comparison of three different methods for the quantification of the *in vitro* wear of dental materials. *Dent*

- Mater. 2006 Nov;22(11):1051-62.
84. Voronets J, Jaeggi T, Buergin W, Lussi A. Controlled toothbrush abrasion of softened human enamel. *Caries Res.* 2008 Jul;42:286–90.
 85. Attin T, Buchalla W, Hellwig E. Effect of topical fluoride application on toothbrushing abrasion of resin composites. *Dent Mater.* 2006 Apr;22(4):308-13.
 86. Silva RC, Zuanon AC. Surface roughness of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment (ART). *Braz Dent J.* 2006 Apr-Jun;17(2):106-9.
 87. Perez CR, Hirata RJ, da Silva AH, Sampaio EM, Miranda MS. Effect of a glaze-composite sealant on the 3-D surface roughness of esthetic restorative materials. *Oper Dent.* 2009 Nov-Dec;34(6):674-80.
 88. Corrêa LGP, Ogasawara T. Estudos comparativos de alguns cimentos ionoméricos convencionais. *Rev Matéria.* 2006 Jul-Sep;11(3):297-305.
 89. International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: methodology. London: ICH, 1996 (ICH Harmonised Tripartite Guideline).
 90. Appel, Réus 2003. *Formulações aplicadas a Odontologia.* São Paulo:RCN, 2005.
 91. *International Organization for Standardization.* Technical specification 14569-1. Dental Materials - guidance on testing of wear resistance - Part I: wear by tooth brushing. Switzerland: ISO. 1999.
 92. Musial W. The deposition of chlorhexidine on chemically modified thermosensitive polyNIPA microgels assessed by EDXS in scanning electron microscopy. *Lat. Am. J. Pharm.* 2011Aug;30(8):1481-6.
 93. Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Jun 11;48(2-3):139-57.
 94. Yap AU, Khor E, Foo SH. Fluoride release and antibacterial properties of new-generation tooth-colored restoratives. *Oper Dent.* 1999 Sep-Oct;24(5):297-305.
 95. Deasy P. *Microencapsulation and related drug processes.* 20^a ed. Nova Yorque:Marcel Dekker, 1984.
 96. Mendes JBE, Riekens MK, Oliveira VM, Michel MD, Stulzer HK, Khalil NM, et al. PHBV/PCL microparticles for controlled released of resveratrol: physicochemical characterization. Antioxidant potential and effect on hemolysis of human erythrocytes. *ScientificWorldJournal.* 2012; 2012:542937
 97. Billington RW, Williams JA, Pearson GJ. Variation in powder/liquid ratio of a restorative glass-ionomer cement used in dental practice. *Br Dent J.* 1990 Sep 22;169(6):164-7.

ANEXOS

ANEXO 1- Depósito de patente.....	123
ANEXO 2- Artigo publicado no periódico Latin American Journal of Pharmacy....	125

ANEXO 1- Depósito de patente



Espaço reservado para protocolo

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

1.2 CNPJ/CPF: 80257355000108

1.3 Endereço completo: AV GAL CARLOS CAVALCANTI, 4748 - PONTA GROSSA - PR

1.4 CEP: 84030900

1.5 Telefone: (42) 32203000

1.6 Fax: (42) 32203263

1.7 E-mail: agipi@uepg.br

☐ continua em folha anexa2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de AdiçãoEscreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO****3. Título da Invenção, Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):****PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO DE MICROPARTÍCULAS METACRÍLICAS
CONTENDO CLOREXIDINA PARA A INCORPORAÇÃO EM CIMENTOS DE
IONÔMEROS DE VIDRO.**☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° : Data de Depósito: / /

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s)

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

6. Inventor (72):☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: PAULO VITOR FARAGO

6.2 Qualificação: DOCENTE DE ENSINO SUPERIOR

6.3 CPF: 02688357999

6.4 Endereço completo: AV GAL CARLOS CAVALCANTI, 4748 - PONTA GROSSA - PR

6.5 CEP: 84030900

6.6 Telefone: (42) 99716641

6.7 Fax: (42) 32203263

6.8 E-mail: pvfarago@gmail.com

☒ continua em folha anexa



Chlorhexidine Digluconate-Loaded (Meth)Acrylic Microparticles: High Encapsulation Efficiency and Prolonged Release

Stella M.G. REINKE¹, Márcio C.S. RASTELLI^{1,2}, Rafaela GARCIA³, Luis A. ESMERINO⁴,
Josiane P. DE PAULA³, Fábio A. DOS SANTOS¹ & Paulo V. FARAGO^{1,3,*}

¹ State University of Ponta Grossa, Post graduate Program in Dentistry, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

² Regional University of Blumenau, Department of Dentistry, Blumenau, Santa Catarina, Brazil

³ State University of Ponta Grossa, Department of Pharmaceutical Science,
4748, Carlos Cavalcanti Ave., Zip Code 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

⁴ State University of Ponta Grossa, Department of Clinical
and Toxicological Analysis, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

SUMMARY. The goal of this paper was to prepare (meth)acrylic microparticles containing chlorhexidine digluconate, a widely used antiseptic, by the non-aqueous emulsion/solvent evaporation method in order to achieve high encapsulation efficiency and a controlled drug release profile. Micrometer-sized, heat-stable and amorphous/non-crystalline formulations with drug-loading efficiencies higher than 90% were obtained. No change in FTIR assignments was recorded after the microencapsulation procedure. Drug-loaded (meth)acrylic microparticles as compressed tablets provided a remarkable decrease of dissolution rate of chlorhexidine digluconate changing the initial drug release profile to a biexponential kinetic model. In addition, microencapsulation did not compromise the antimicrobial activity of chlorhexidine digluconate. Therefore, these formulations are feasible carriers for controlled release of chlorhexidine digluconate and can be used into further innovative skin and oral products intended for a long-lasting antiseptic effect.

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue la preparación de micropartículas (met)acrílicas que contienen digluconato de clorhexidina, un antiséptico muy utilizado, por el método de evaporación de emulsión/solvente no acuoso, con el fin de lograr una alta eficiencia de encapsulación y un perfil de liberación controlada del fármaco. Se obtuvieron formulaciones de tamaño micrométrico, estables al calor, amorfas/no cristalinas, con eficiencia de carga de fármaco mayor al 90 %. No se registraron cambios en las asignaciones de FTIR después del procedimiento de microencapsulación. Las micropartículas (met)acrílicas portando drogas como tabletas comprimidas proporcionan una notable disminución de la velocidad de disolución de digluconato de clorhexidina al cambiar el perfil inicial de liberación del fármaco a un modelo cinético biexponencial. Además, la microencapsulación no comprometió la actividad antimicrobiana del digluconato de clorhexidina. Por lo tanto, estas formulaciones son portadoras factibles para la liberación controlada de digluconato de clorhexidina y se pueden utilizar en producciones orales y dérmicas más innovadoras destinadas a lograr un efecto antiséptico de larga duración.

INTRODUCTION

Chlorhexidine (Fig. 1) is a synthetic cationic bisbiguanide that consists of two symmetric 4-chlorophenyl rings and two biguanide groups connected by a central hexamethylene chain¹. Because its amphipathic structure, chlorhexidine affects membrane integrity at low concentrations and provide a remarkable antimicrobial effect². This drug has long been used as antiseptic in skin and oral products due to its broad antibacterial properties. Bacterial resistance to chlorhexidine is extremely rare which makes long-term prophylactic use less dangerous³. Chlorhexidine is usually available in three chemical for-

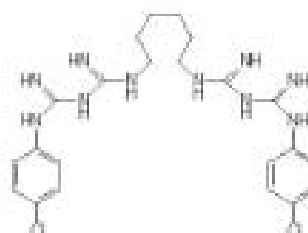


Figure 1. Chemical structure of chlorhexidine.

mulas: digluconate, acetate and hydrochloride⁴. Regarding the oral formulations, most studies were carried out using digluconate form due to

KEY WORDS: Antiseptic, Controlled release, Microencapsulation, *Streptococcus*.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: pfarago@uepgma.com

It is stable, water-soluble and readily dissociates at physiologic pH releasing the positively charged structure ⁵. However, when used as a aqueous solution, chlorhexidine shows incompatibility with some substances as fluoride and can cause long-term damage to the oral cavity, e.g. gustatory disorder, oral mucosa erosion, and brown discoloration of teeth and some restorative materials. Chlorhexidine also has a bitter taste which is difficult to mask completely ^{4,6}.

Polymeric microparticles are multiple-unit pharmaceutical dosage forms that allow protection of the drug from other substances or the environment, elimination of incompatibilities, or masking of unpleasant taste. Microparticles are particularly interesting for the development of controlled or prolonged release dosage forms. They play an important role as drug delivery systems aiming at improved bioavailability of conventional drugs and minimizing side effects ⁷. Various methods are readily available for microencapsulation of drugs and one of the most commonly used is the emulsion/solvent evaporation ⁸. This procedure can be performed via various protocols and the selection for best option depends on the property of the compounds that are intended to be encapsulated ⁹. In general, water-soluble compounds including peptides and proteins are entrapped by double emulsion/solvent evaporation technique. However, low encapsulation efficiencies are obtained using this particular procedure for drugs having low molecular weight and/or high hydrophilic nature due to a substantial migration of the drug from the primary emulsion to the external aqueous phase during emulsification and/or solvent evaporation ¹⁰.

Taking all the above into account, only a previous paper was devoted to investigate the microencapsulation of chlorhexidine digluconate. Yue *et al.* ¹¹ prepared microparticles of poly(lactic-co-glycolic acid) containing chlorhexidine digluconate and its association into inclusion complexes with cyclodextrins by emulsion/solvent evaporation. Low encapsulation efficiency values of 10.2, 11.5, and 6.1% were achieved for microparticles obtained with chlorhexidine digluconate and inclusion complexes of chlorhexidine digluconate/methylated- β -cyclodextrin and chlorhexidine digluconate/hydroxypropyl- β -cyclodextrin, respectively.

In this paper, our research group proposes the use of the non-aqueous emulsion/solvent evaporation method as an enhancing process for microencapsulating chlorhexidine diglu-

conate. By this method, polymer and drug are dissolved in a volatile organic solvent and this resulting phase is emulsified into an oil phase (mineral oil, cotton seed oil or triglyceride) which should be non-solvent for both polymer and drug and usually contains an appropriate emulsifier. The volatile solvent is then removed from such emulsion by extraction to continuous phase and/or evaporation ¹². This procedure is a suitable method to prepare microparticles of a wide range of hydrophilic drugs as pantoprazole sodium sesquihydrate ¹³, ibuprofen ¹⁴, misoprostol ¹⁴, metformin hydrochloride ¹⁵, and zidovudine ¹⁶.

In that sense, the aim of this study was to prepare (meth)acrylate-based microparticles containing chlorhexidine digluconate to achieve high encapsulation efficiency and a controlled drug release profile suitable for a prolonged antibacterial effect.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) with ratio of 1:2 and $M_w = 135,000$ g/mol (EudragitTM S100) and poly(ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammonioethyl methacrylate chloride) with ratio of 1:2:0.1 and $M_w = 150,000$ g/mol (EudragitTM RS100) were kindly provided by Röhm Pharma Polymers (Darmstadt, Germany). Chlorhexidine digluconate was supplied as a 20% (w/v) aqueous solution by Polyorgânica Tecnologia (São Paulo, Brazil). Other chemicals were of analytical grade and were used as received.

Preparation of microparticles

The poly(meth)acrylate-derived microparticles containing chlorhexidine digluconate were prepared by non-aqueous emulsion/solvent evaporation procedure ¹³. A total of four different formulations (Table 1) were obtained using EudragitTM S100 or EudragitTM RS100 with a theoretical chlorhexidine digluconate loading of 10 and 25% (w/w). Briefly, the volatile organic phase was added into the mineral oil phase and kept under mechanical stirring (1,000 rpm) at room temperature for 6 h. After evaporation, microparticles were separated by vacuum filtration, washed twice with cyclohexane (50 mL) and dried under vacuum at 40 ± 2 °C for 4 h. The samples were stored into a desiccator under vacuum at room temperature. All formulations were obtained in triplicate. Unloaded-microparticles were also prepared as negative controls.

Composition	Formulation			
	M1	M2	M3	M4
Volatile organic phase				
Chlorhexidine digluconate (g)	0.10	0.25	0.10	0.25
Eudragit™ S100 (g)	0.90	0.75	—	—
Eudragit™ RS100 (g)	—	—	0.90	0.75
Methanol (mL)	20.0	20.0	—	—
Acetone (mL)	20.0	20.0	40.0	40.0
Mineral oil phase				
Sorbitan monoleate (Span® 80) (g)	0.63	0.63	0.63	0.63
Mineral oil (USP grade) (mL)	200.0	200.0	200.0	200.0

Table 1. Composition of chlorhexidine digluconate-loaded microparticles.

In order to provide a comparative analysis, physical mixtures between chlorhexidine digluconate and polymers were also prepared using 1:1 (drug: polymer) in weight proportion.

Characterization of microparticles

Drug loading and encapsulation efficiency

An amount of microparticles, equivalent to 30 mg of chlorhexidine digluconate, was weighed and magnetic stirred (1,000 rpm) with 7 mL of purified water for 12 h. The volume was completed to 10 mL and filtered through a poly(vinylidene fluoride) membrane filter (Dura-pore™ membrane, 0.22 µm pore size, Millipore, Bedford, MA, USA). After suitable dilution, the drug concentration was spectrophotometrically determined at 255 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) in triplicate. The validation of this UV method was previously performed through the following parameters: specificity, linearity, range, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, precision, and robustness¹⁷. The concentration range varied from 3.0 to 30.0 µg/mL. Linearity was 0.9992 and the detection limit was 82.06 ng/mL. The encapsulation efficiency (EE) was obtained using Eq. [1].

$$EE = \left(\frac{\text{mass of drug in microparticles}}{\text{theoretical mass of drug}} \right) \times 100 \quad [1]$$

Scanning electron microscopy and particle size

The samples were mounted on copper stubs and sputtered with gold (Shimadzu IC-50 ion coater, Kyoto, Japan) and analyzed using a scanning electron microscope (Shimadzu scanning microscope SSX-550, Kyoto, Japan) at an accelerating voltage of 10 or 15 kV with different magnifications. The particle size distribution

was estimated from the measurement of about 200 particles, assuming spherical shape, found in an arbitrary chosen area in enlarged micrographs by Image-Pro Plus software (version 3.0, Silver Springs, MD, USA).

Fourier-transformed infrared spectroscopy

The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra were recorded from 4000 to 400 cm⁻¹ on a Shimadzu IR Prestige 21 spectrophotometer (Kyoto, Japan) using KBr pellets with 32 scans and resolution of 4 cm⁻¹.

X-ray diffraction

Wide-angle powder X-ray diffraction (XRD) was performed with a Shimadzu X-ray diffractometer (Shimadzu XRD-6000, Kyoto, Japan). The 2θ was increased from 5 to 50° at a scan rate of 2°/min using a Cu-K α source (λ = 1.5418 Å) at 40 kV and 40 mA.

Thermogravimetric Analysis

Thermal degradation was investigated by dynamic thermogravimetry (TGA). TGA measurements were carried out with a Shimadzu TGA-50 thermogravimetric analyzer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The mass of each sample was 10 mg. Thermogravimetric analysis (TGA) curves were recorded in the course of heating from room temperature to 600 °C at a rate of 20 °C/min using synthetic air atmosphere.

In vitro drug release

In vitro release experiments were carried out in triplicate for pure drug and chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles as compressed tablets containing no other pharmaceutical filler²⁰. Dissolution assays were per-

formed in Nova Elica dissolution tester (299/6, Vargem Grande Paulista, Brazil) equipped with paddles (apparatus II) in 350 mL of artificial saliva (pH = 6.5) which was previously prepared using NaF 0.0044 g/L, MgCl₂ 0.06 g/L, CaCl₂ 0.17 g/L, KCl 0.62 g/L, NaH₂PO₄·H₂O 4.82 g/L, Na₂HPO₄·7H₂O 4.04 g/L, and H₂O to make 1 L. System was kept for 6 h at a thermostatically controlled temperature of 37 ± 0.5 °C and stirred at 50 rpm. At predetermined time intervals, samples were collected (5 mL), filtered (0.45 µm pore size), diluted (if necessary), and analyzed spectrophotometrically at 255 nm (Genesys 10 UV Scanning, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA). The dissolution value was obtained from the amount of drug released. A correction factor was applied to the cumulative dilution caused by replacement of the sample with an equal volume of fresh medium.

Analysis of release behavior

Dissolution profiles were investigated by model-dependent methods using the MicroMath Scientist® 2.01 software (Salt Lake City, UT, USA). Data were tested to fit first-order, biexponential, zero-order and Weibull equations (Table 2). The selection of model-dependent method was based on the best correlation coefficient (*r*), the best model selection criteria (MSC), and the best graphic adjustment.

Model	Equation
First-order	%D = 100 (1 - e ^{-kt})
Biexponential	%D = 100 [(Ae ^{-αt}) + (Be ^{-βt})]
Zero-order	%D = kt
Weibull	%D = 100 [1 - e ^{-(t/τ)^{1/b}}]

Table 2. Mathematical models related to dissolution experiments. %D = dissolved percentage, *b* = shape parameter, *τD* = time interval necessary to release 63.2% of the drug, *k*, *α* and *β* = kinetic constants, *t* = dissolution time, *A* and *B* = initial drug concentrations that contribute for the two dissolution stages.

In order to have some insight into the drug release mechanism, a very simple and semi-empirical equation to describe drug release from polymeric systems, the power law or Korsmeyer-Peppas model, was also applied (Eq. [2]).

$$f = at^n \quad [2]$$

where *f* is the drug dissolved fraction at time *t*, *n* is the release exponent, indicative of the

mechanism of the drug release and *a* is the constant incorporating structural and geometric characteristics of the drug dosage form.

Antimicrobial activity

In order to confirm their antimicrobial potential, chlorhexidine digluconate-loaded microparticles were evaluated by agar-well diffusion method. In brief, plates containing solid culture medium were inoculated with strains of *Candida albicans* ATCC 10231, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, and *S. pyogenes* ATCC 19615 by swab streaking from previously standardized suspensions at a concentration of 5 × 10⁸ CFU/mL that match the turbidity of the 0.5 McFarland standard (1.5 × 10⁸ CFU/mL). Wells of 7 mm diameter were cut into agar plates and a mass equal to exactly 300 µg of chlorhexidine digluconate from each formulation was added to each well. Plates were incubated for 24 h at 35 ± 0.5 °C under microaerophilic conditions for *S. mutans* and *S. pyogenes*. The zone of growth inhibition was measured in mm. Tests were carried out in triplicate. A solution of 0.12% chlorhexidine digluconate (Periogard™, Colgate-Palmolive, São Paulo, Brazil) and sterile saline were used as positive and negative controls, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles were successfully obtained as white and pale yellow powders for Eudragit™ S100 and Eudragit™ RS100, respectively. After vacuum drying, appropriate yield rates (over 80%) were achieved for all formulations.

Drug loading and encapsulation efficiency

All formulations presented mean encapsulation rates higher than 90% as presented in Table 3. In addition, microparticles prepared with Eudragit™ RS100 showed better encapsulation ef-

Formulation	Drug content (mg/g)	Encapsulation efficiency (%)	Mean diameter (µm)
M1	94.77 ± 1.46	94.77	4.12 ± 3.48
M2	226.20 ± 2.88	90.08	2.01 ± 1.16
M3	96.78 ± 1.28	96.78	6.99 ± 5.80
M4	228.62 ± 2.39	91.45	21.07 ± 17.76

Table 3. Encapsulation efficiency and particle size for chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles.

iciencies as compared to Eudragit™ S100 at the same drug concentration which may be due to an improved chemical affinity between chlorhexidine digluconate and Eudragit™ RS100.

These suitable values are mainly related to the performed microencapsulation procedure. The non-aqueous emulsion/solvent evaporation method provided a crucial anhydrous condition that was required for preventing the migration of chlorhexidine digluconate to the external phase (mineral oil) which was the previously chosen non-solvent for this drug. In particular, the present results are higher than that reported for Yue *et al.*¹¹. These authors obtained chlorhexidine digluconate-loaded microparticles using poly(lactic-co-glycolic acid) and its association with cyclodextrins by solid in oil/water emulsion/solvent evaporation technique resulting in encapsulation efficiencies lower than 12%.

Thus the high loading of this cationic bisbiguanide into the meth(acrylic) microparticles can be purposed as a great outcome regarding the use of these formulations as antiseptic in skin and oral products due to its potential as drug release systems.

Scanning electron microscopy and particle size

The microparticles obtained using Eudragit™ S100 were spherical or nearly spherical in shape and had a smooth surface as different sized aggregates (Figs. 2a and 2b). However, shape-irregular aggregates were observed for the formulations prepared with Eudragit™ RS100 with

smooth surface for M3 (Fig. 2c) and rough surface for M4 (Fig. 2d). No pore was observed on the surface of all microparticles.

It is well known that the non-aqueous emulsion/solvent evaporation method tends to particle aggregation resulting in clusters of larger size¹⁸. An alternative to avoid this process is to resuspend the microparticles using aliphatic hydrocarbons such as pentane, hexane, heptane or octane. However, since the interest is focused on controlling the drug release, aggregation may provide enhanced performance due to the reduction of surface area.

The particle size of chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles are also indicated in Table 3. In general, micrometer-sized formulations were recorded. Moreover, microparticles produced using Eudragit™ S100 showed lower mean diameters than that obtained from Eudragit™ RS100.

Fourier-transformed infrared spectroscopy

The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra recorded for chlorhexidine digluconate, Eudragit™ S100, Eudragit™ RS100, and (meth)acrylic microparticles are represented in Fig. 3. The FTIR spectrum of chlorhexidine digluconate showed the typical assignments as previously reported¹⁹. The N-H stretching vibration of the imine group C=N-H occurred at 3320 cm⁻¹, the aliphatic C-H stretching vibrations was assigned at 2935 cm⁻¹, the C=N stretching vibration of the imine group C=N-H was verified at 1623 cm⁻¹, the aromatic C=C stretching bands were observed at 1601 and 1580 cm⁻¹, the stretching vibration characteristic

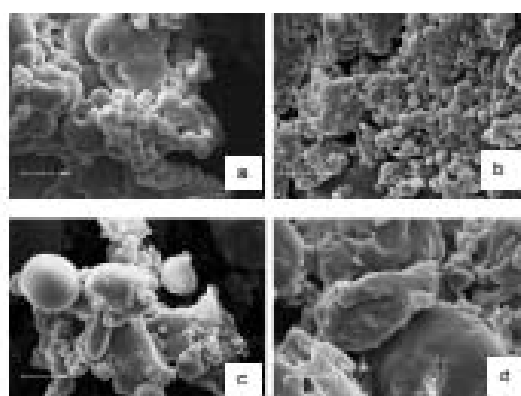


Figure 2. SEM photomicrographs at 1200 x magnification of chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles M1 (a), M2 (b), M3 (c) and M4 (d).

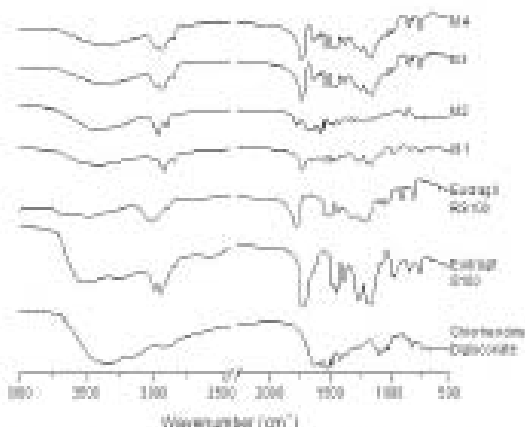


Figure 3. FTIR spectra of chlorhexidine digluconate, Eudragit™ S100, Eudragit™ RS100, and (meth)acrylic microparticles.

for the guanidines $=N-C-N=$ was recorded at 1526 cm^{-1} , and the C-Cl stretching vibration was detected at 824 cm^{-1} . FTIR spectrum of EudragitTM S100 presented typical bands of C=O stretching vibrations of carboxylic acid at 1705 cm^{-1} and of ester group at 1730 cm^{-1} . A broadened band of O-H stretching vibration was displayed between 3100 and 3500 cm^{-1} . The aliphatic C-H stretching vibration led to bands at $2900\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. EudragitTM RS100 showed a similar FTIR spectrum to EudragitTM S100. However the stretching vibrations assigned to C=O of carboxylic acid and O-H group were not verified in agreement with its chemical structure.

Chemical interaction between drug and polymers commonly lead to identifiable changes in the FTIR patterns. The FTIR spectra of microparticles indicated absence of changes in the wavenumber of the characteristic infrared absorption bands of raw materials. This result suggests that there was no chemical bond between chlorhexidine digluconate and EudragitTM S100/EudragitTM RS100 during microencapsulation.

X-ray diffraction

Samples of chlorhexidine digluconate, Eu-

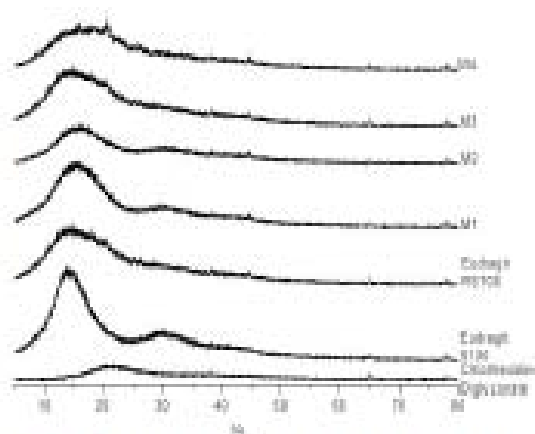


Figure 4. Wide-angle XRPD patterns of chlorhexidine digluconate, EudragitTM S100, EudragitTM RS100, and (meth)acrylic microparticles.

dragitTM S100, EudragitTM RS100, and (meth) acrylic microparticles were studied by wide-angle powder X-ray diffraction (XRD) in order to evaluate their crystallinity patterns (Fig. 4). The initial patterns of pure drug and polymers revealed amorphous/non-crystalline structures considering that no distinguished peak in their X-ray diffractograms was observed. XRD data of

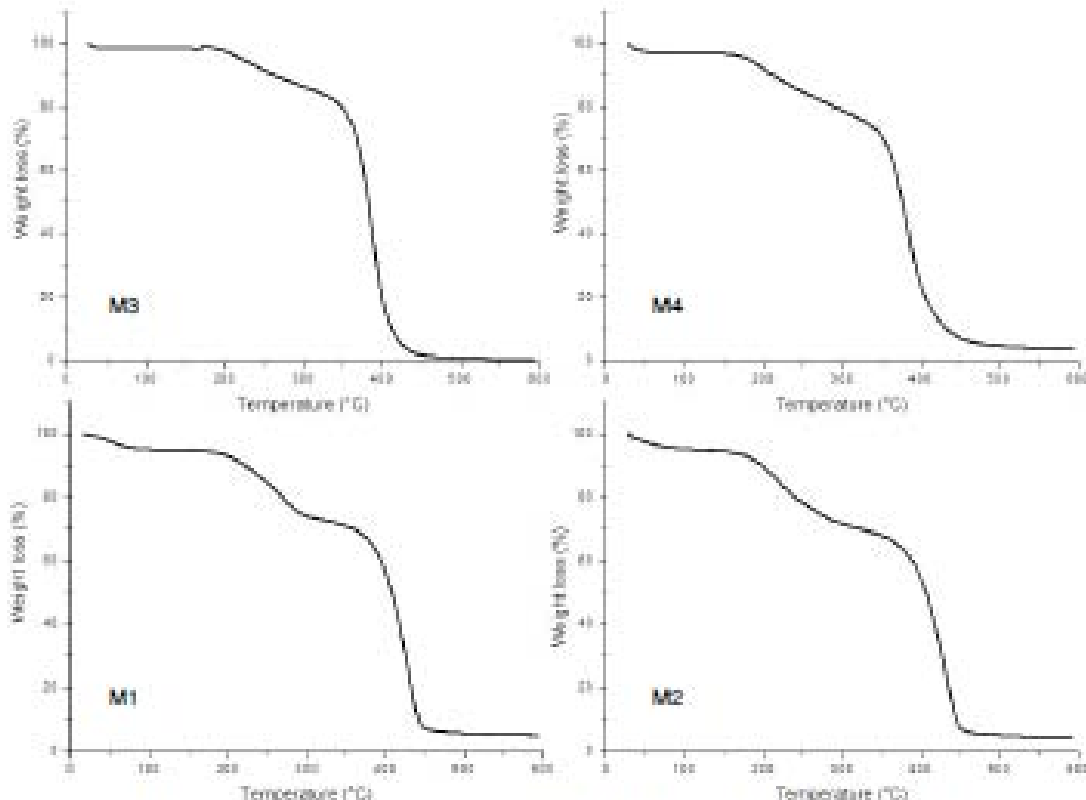


Figure 5. TGA curves of chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles.

the investigated (meth)acrylic microparticles also demonstrated non-crystalline patterns and were quite similar to those verified for pure polymers. Consequently, the microencapsulation procedure did not change the typical non-crystalline structure of raw materials.

Thermogravimetric Analysis

Fig. 5 summarizes the steps of thermal degradation verified for chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles. Formulations based on EudragitTM S100 (M1 and M2) displayed a three-stage thermal decomposition profile. The first step of mass loss was associated to water loss. The second and third stages were attributed to a combination of side and main polymer chain ²⁰ and drug degradation and volatilization of their decomposition products, respectively. TGA analysis performed for the microparticles of EudragitTM RS100 (M3 and M4) showed a negligible loss of moisture. In addition, these formulations presented similar degradation events as previously described for M1 and M2 in which two distinct thermal decomposition steps were observed.

Moreover the thermograms indicated that the onset decomposition temperature of all these chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles was above 145 °C under air flux. This result suggests a suitable thermal stability, considering their potential use as antiseptic in skin and oral products.

In vitro drug release

The dissolution rates of chlorhexidine digluconate as pure drug and from tablets of drug-loaded (meth)acrylic microparticles are demonstrated in Fig. 6. The mean time for 80% release of pure chlorhexidine digluconate was less than 5 min. However, a value of 80% drug release was achieved in mean dissolution times of 348, 112, and 223 min for formulations M1, M2, and M4, respectively. In particular, formulation M3 showed a mean dissolution value of only 63% in the final time of 360 min. Therefore chlorhexidine digluconate from tablets of drug-loaded (meth)acrylic microparticles showed a remarkable slower dissolution rate than pure drug.

These results demonstrate that EudragitTM S100/EudragitTM RS100 played an important role on the delay of drug dissolution which can be associated with different aspects as polymer:drug ratio and the (meth)acrylic polymer type used. For both EudragitTM S100/EudragitTM RS100, formulations M1 and M3 ob-

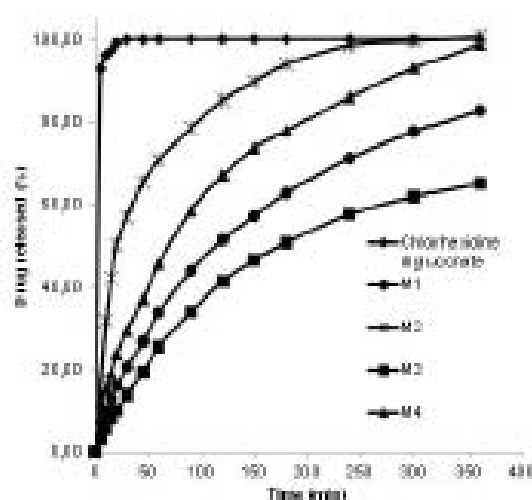


Figure 6. *In vitro* release profiles of pure drug and chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles.

tained at a polymer:drug ratio of 9 : 1 (10% drug) showed slower release of chlorhexidine digluconate. Probably the greater amount of EudragitTM in these formulations had a remarkable effect on controlling the drug release rate. Moreover formulations based on EudragitTM RS100 presented a slower release of chlorhexidine digluconate than that prepared using EudragitTM S100 at the same polymer:drug ratio. This result can be justified because EudragitTM RS100 is an insoluble polymer with low permeability and a pH-independent swelling ²¹ which was more effective in prolonging chlorhexidine digluconate release. On the other hand, EudragitTM S100 is a methacrylic polymer soluble at pH above 7.0 ²¹. In that sense, this particular behavior may have favored the drug release since an artificial saliva with pH 6.5 was used as dissolution medium.

Analysis of release behavior

The release profiles were fitted to mathematical models and the selection of the best model considered the correlation coefficient (*r*), the model selection criteria (MSC), and the graphic adjustment. Chlorhexidine digluconate as pure drug showed a dissolution profile based on the first-order model with a kinetic constant (*k*) of 0.51283 min⁻¹ (*r* = 0.9993 and MSC = 5.70). However, chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles were better fitted to the biexponential equation than other models. The burst-release apparent rate constant (*α*) and the slow-release apparent rate constant (*β*) for these formulations are summarized in Table 4.

Formulation	Biexponential model			
	<i>r</i>	MSE	<i>a</i> (min ⁻¹)	<i>β</i> (min ⁻¹)
M1	0.9996	6.53	0.02674	0.00043
M2	0.9994	6.04	0.57491	0.09666
M3	0.9998	7.95	0.00799	0.00045
M4	0.9992	5.91	0.60242	0.00839

Table 4. Release data obtained by fitting the dissolution profiles of chlorhexidine digluconate from (meth)acrylic microparticles to the biexponential equation.

These results demonstrate that Eudragit™ S100/Eudragit™ RS100 microparticles reduced the dissolution rate and changed the initial drug release profile to a biexponential kinetic model which can be considered an interesting effect. The burst release may help to reach the effective concentration of chlorhexidine digluconate rapidly in skin or oral cavity, whereas the controlled release might maintain the effective concentration of drug for a long time ²¹.

Concerning the Korsmeyer-Peppas model, formulations showed *n* values of 0.62 (M1), 0.50 (M2), 0.62 (M3), and 0.60 (M4). All tablets of drug-loaded (meth)acrylic microparticles had release exponent (*n*) ranging between 0.43 and 0.85 indicating an anomalous transport. Therefore both diffusion and erosion mechanisms play role in chlorhexidine digluconate release ²¹.

Antimicrobial activity

Table 5 resumes the zones of microbial inhibition provided by chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles and controls against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *S. pyogenes*. In general, formulations showed a similar antimicrobial

potential after 24 h of incubation than that achieved by the positive control, a commercial aqueous solution of chlorhexidine digluconate. In that sense, microencapsulation procedure using both (meth)acrylate-based polymers did not impaired the antimicrobial performance of chlorhexidine digluconate.

In particular, the investigated formulations showed remarkable inhibition zones against *S. mutans*, a Gram-positive coccus-shaped bacterium that plays the major role in human oral infections and is the principal etiological agent of dental caries ²⁶. These data pave the way for a further development of innovative oral products containing chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles intended for a controlled drug release.

However, additional *in vivo* studies using a suitable semisolid dosage form are needed for demonstrating that (meth)acrylic microparticles may constitute a promising approach in order to maintain a topical/buccal antimicrobial activity for a long period of time and, consequently, to decrease the reiteration of antiseptic applications.

CONCLUSION

Chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles were successfully prepared by the non-aqueous emulsion/solvent evaporation method. Micrometer-sized, heat-stable and amorphous/non-crystalline formulations with high drug-loading efficiencies were obtained. No changes in FTIR assignments were recorded after the microencapsulation procedure. Tablets of drug-loaded (meth)acrylic microparticles provided a remarkable decrease of dissolution rate of chlorhexidine digluconate changing the initial drug release profile to a biexponential kinetic model. These results support

Formulation	Microbial strains			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10241	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
M1	20.85 ± 1.37	20.69 ± 0.43	27.91 ± 1.69	17.64 ± 1.15
M2	20.11 ± 0.40	21.10 ± 0.65	29.75 ± 1.06	18.93 ± 0.95
M3	21.21 ± 1.27	21.44 ± 0.40	30.31 ± 1.74	19.08 ± 1.18
M4	18.92 ± 1.38	21.94 ± 0.22	28.70 ± 1.49	17.16 ± 1.06
Positive control	20.94 ± 0.55	21.28 ± 0.37	30.62 ± 2.25	18.84 ± 1.27
Negative control	–	–	–	–

Table 5. Zones of growth inhibition* in millimeters provided by chlorhexidine digluconate-loaded (meth)acrylic microparticles and controls against usual microorganisms of skin and oral cavity * Each value is the mean ± standard deviation of three determinations; – means a negative result.

an experimental basis for the use of these multiple unit dosage forms as a promising approach for prolonging the drug release. In addition, microencapsulation did not compromise the antimicrobial activity of chlorhexidine digluconate. In summary, these formulations are feasible carriers for controlled release of chlorhexidine digluconate and can be used into further innovative skin and oral products intended for a long-lasting antiseptic effect.

Acknowledgements. The authors are grateful to Fundação Araucária for financial support.

REFERENCES

1. Greenstein, G., C. Berman & R. Jaffin (1986) *J. Periodontol.* **57**: 370-6.
2. Zorko, M. & R. Jerala (2008) *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 730-7.
3. Campbell, A.A., L. Song, X.S. Li, B.J. Nelson, C. Bottoni, D.E. Brooks *et al.* (2000) *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **53**: 400-7.
4. Gupta, R., V. Chandavarkar, S.R. Galgali & M. Mishra (2012) *CGM2012* **1**: 43-8.
5. Mohammadi, Z. (2008) *Iranian Ends. J.* **1**: 113-25.
6. Arnold, R.R., H.H. Wei, E. Simmons, P. Tallury, D.A. Barrow & S. Kalachandra (2008) *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **86B**: 506-13.
7. Ahmad, M., A. Madni, M. Usman, A. Murir, N. Akhtar & H.M.S. Khan (2011) *W. Acad. Sci. Eng. Technol.* **51**: 384-7.
8. Ng, S.M., J.-Y. Choi, H.-S. Han, J.S. Huh & J.O. Lim (2010) *Int. J. Pharm.* **384**: 120-7.
9. Li, M., O. Bruneau & D. Poncelet (2008) *Int. J. Pharm.* **363**: 26-39.
10. Parago, P.V., R.P. Raffin, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres & S.F. Zawadzki (2008) *J. Braz. Chem. Soc.* **19**: 1298-1305.
11. Yue, L.C., J. Poff, M.E. Coriês, R.D. Strieter, C.B. Paris, P. Hildgen, *et al.* (2004) *Biomater.* **25**: 3743-50.
12. Naik, J.B., A.B. Lokhande, S. Mishra & R.D. Kulkarni (2012) *Int. J. Pharm. Bio Sci.* **3**: 573-90.
13. Raffin, R.P., L.M. Colomé, A.R. Pohlmann & S.S. Guterres (2006) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63**: 198-204.
14. Akhtar, M., M. Ahmad, S.A. Khan & G. Murtaza (2012) *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **6**: 2613-20.
15. Garud, N. & A. Garud (2012) *Trop. J. Pharm. Res.* **11**: 577-83.
16. Nath, B., L.K. Nath & P. Kumar (2011) *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* **68**: 409-15.
17. International Conference on Harmonisation (1996) "Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)", ICH, London.
18. Deasy, P. (1984) "Microencapsulation and related drug processes", Twentieth Edition, Marcel Dekker, New York, 361 p.
19. Mustaf, W. (2011) *Lat. Am. J. Pharm.* **30**: 1481-6.
20. Hughey, J.R., J.C. DiNunzio, R.C. Bennetti, C. Brough, D.A. Miller, H. Ma, *et al.* (2010) *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **11**: 760-74.
21. Labarre, D., G. Porchel & C. Vauthier (2011) "Biomedical and Pharmaceutical Polymers", First Edition, Pharmaceutical Press, London.
22. Mendes, J.B.E., M.K. Biekes, V.M. Oliveira, M.D. Michel, H.K. Stulzer, N.M. Khalil, *et al.* (2012) *ScientificWorldJournal* **2012**: 1-13.
23. Siepmann, J. & N.A. Peppas (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48**: 139-57.
24. Napimoga, M.H., J.F. Höfling, M.I. Klein, R.U. Kamiya & R.B. Gonçalves (2005) *J. Oral Sci.* **47**: 59-64.