



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

STEPHANIE RIBEIRO LOPES

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE UM SISTEMA ADESIVO
MODIFICADO POR UM ANTIBACTERIANO PEPTÍDICO**

2021

STEPHANIE RIBEIRO LOPES

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE UM SISTEMA ADESIVO MODIFICADO
POR UM ANTIBACTERIANO PEPTÍDICO**

Dissertação apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Dentística Linha de pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial de alterações da estrutura dental, de materiais e técnicas de prevenção e tratamento em dentística.

Orientador: Prof. Associado César Rogério Pucci

Coorientador: Profa. Dra. Karen Cristina Kazue Yui

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2021]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Lopes, Stephanie Ribeiro

Avaliação das propriedades de um sistema adesivo modificado por um antibacteriano peptídico. / Stephanie Ribeiro Lopes. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.

64 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: César Rogério Pucci

Coorientadora: Karen Cristina Kazue Yui

1. Sistema adesivo. 2. Nisina. 3. Resistência de união. 4. Antibacterianos. I. Pucci, César Rogério, orient. II. Yui, Karen Cristina Kazue, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. César Rogério Pucci (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adjunto Cláudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assistente Heleine Maria Chagas Rêgo

Western University

Schulich School of Medicine & Dentistry

London, Ontario, Canada

São José dos Campos, 9 de Agosto de 2021.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Rosana Mônica da Frota Ribeiro Lopes e Nelson Ubeda Lopes Filho**, por todo amor, dedicação, carinho e respeito com que me criaram. Pela formação, educação, valores e princípios que me passaram ao longo da vida.

Sempre serão um exemplo para mim.

Tenho muito orgulho de ser filha de vocês, meus amores, minha vida!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todos os Seus planos para minha vida serem sempre maiores que os meus sonhos.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos ICT-UNESP, na pessoa da diretora **Profa. Associada Rebeca Di Nicoló** e do vice-diretor **Prof. Associado Cláudio Antonio Talge Carvalho**.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora área Dentística, na pessoa do coordenador **Prof. Alessandra Buhler Borges**

Ao meu orientador **César Rogério Pucci**, pela oportunidade de ter sido sua orientada, por sempre ser tão gentil e atencioso. Obrigada pela dose extra de incentivo, palavras de otimismo e por acreditar no meu trabalho.

À minha coorientadora **Profa. Dra. Karen Cristina Kazue Yui**, pela oportunidade, pelos ensinamentos transmitidos e por toda paciência. Muito obrigada!

Às amigas **Tânia Mara da Silva, Amanda Guedes Nogueira Matuda e Raquel Pinto Campos**, por terem me ajudado no laboratório e nos testes tantas vezes. Obrigada pela paciência e por terem sido tão atenciosas.

Aos meus amigos de mestrado, **Alexandre, Cláudio, Tamires e Vanessa**, obrigada pelos ensinamentos, convívio, amizade, por compartilharmos muitos momentos juntos, vocês foram essenciais para que esse tempo fosse mais feliz.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora área Dentística.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), na pessoa da bióloga **Priscila Maria Sarmeyro Correa Marciano**

Leite, por ter nos cedido o espaço e os equipamentos, além de nos auxiliar na elaboração de alguns testes, agradeço imensamente.

Aos professores participantes da Banca Examinadora do Exame Geral de Qualificação, **Sérgio Eduardo de Paiva Gonçalves e Graziela Ribeiro Batista**, muito obrigada por aceitarem o convite, vocês são exemplos de pessoas e profissionais acadêmicos, tenho muita admiração por vocês.

Aos professores participantes da Banca Examinadora, **Cláudio Antonio Talge Carvalho e Heleine Maria Chagas Rêgo**, muito obrigada por aceitarem o convite prontamente e fazerem parte desse dia tão especial para mim, vocês tem todo meu carinho e admiração, Professor Cláudio o qual pude trabalhar por dois anos na graduação e ter sido minha banca no meu tcc, sou eternamente grato por todos ensinamentos, e professora Heleine, a qual não conheço pessoalmente, mas tenho certeza absoluta da incrível profissional e professora que é pela sua brilhante carreira acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado, através do processo nº 88882.434250/2019-01, no período de 01/02/2019 a 31/07/2021.

Agradeço a todos que contribuíram com esse trabalho, pela ajuda e incentivo. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Sistemas Adesivos	13
2.2 Nisina	17
3 PROPOSIÇÃO	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
3.3 Hipóteses nulas testadas	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Comitê de ética	24
4.2 Delineamento experimental	24
4.2.1 Unidade experimental	24
4.2.2 Fatores de estudo	24
4.2.3 Variável de resposta	25
4.3 Materiais utilizados	25
4.4 Seleção das amostras para teste de microtração	26
4.5 Preparo das amostras para teste de microtração	26
4.6 Divisão dos grupos experimentais	28
4.7 Incorporação da nisina no adesivo	30
4.8 Aplicação do adesivo e técnica restauradora	31
4.9 Teste de resistência a microtração	33
4.10 Grau de conversão	36
4.11 Atividade antibacteriana	38
4.11.1 Teste de difusão em ágar	39

4.11.2 Contagem da unidade formadora de colônia (UFC)	41
4.12 Análise ilustrativa por MEV	42
5 RESULTADO	43
5.1 Estatística para resistência de união.....	43
5.2 Estatística para grau de conversão	45
5.3 Estatística da atividade antibacteriana.....	48
5.3.1 Difusão em ágar.....	48
5.3.2 Unidade formadora de colônia (UFC)	49
5.2.3 Análise ilustrativa por MEV	52
6 DISCUSSÃO	48
6.1 Discussão dos resultados	55
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	62

Lopes SR. Avaliação das propriedades de um sistema adesivo modificado por um antibacteriano peptídico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar as propriedades de um sistema adesivo modificado com a incorporação de um antibacteriano peptídico, Nisina pura (Handary, Belgium), a qual é amplamente utilizada para conservação de alimentos, em duas diferentes concentrações, 0,5% e 1,0%. Foram avaliados a resistência de união da interface adesiva, o grau de conversão e a atividade antibacteriana, além da análise por meio do Estereomicroscópio e Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Os adesivos foram divididos em três grupos de acordo com a concentração de nisina (Handary, Belgium) incorporada ao sistema adesivo em cada grupo (n=10): SB – Adesivo Comercial Single Bond 2 (3M-ESPE), SBN05 – Single Bond 2 + Nisina 0,5%, SBN1 - Single Bond 2 + Nisina 1%. Para o teste de resistência de união foram utilizados 30 molares humanos hígidos (n=10). O grau de conversão foi feito por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), onde foram feitas três leituras das gotas do adesivo dos diferentes grupos. A atividade antibacteriana foi feita através dos testes de difusão em ágar e contagem da unidade formadora de colônia (UFC), realizado em triplicata, onde foram utilizados discos de adesivos polimerizados dos diferentes grupos. Os dados foram analisados estatisticamente quanto à sua normalidade. Como estes apresentaram distribuição normal, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey de 5%. Os resultados obtidos na microtração (MPa±Dp) foram SB 40,69±2,42^A, SBN05 39,20±2,21^A e SBN1 31,36±2,47^B. No grau de conversão obtivemos como resultado SB 83,50±3,42^A, SBN05 80,22±3,68^A e SBN1 78,44±0,95^A. Na atividade antibacteriana em difusão de ágar não houve diferença na formação de áreas de inibição, entretanto na unidade formadora de colônia obtivemos como resultado SB 0,51±0,02^A, SBN1 0,36±0,03^B e SBN05 0,30±0,04^B. Pode-se concluir que a incorporação da nisina não interferiu no grau de conversão e na resistência de união na porcentagem de 0,5%, não apresentou área de inibição em difusão em ágar e apresentou atividade antibacteriana no teste UFC, mostrando seu efeito antibacteriano.

Palavras-chave: Sistema adesivo. Nisina. Resistência de união. Antibacterianos.

Lopes SR. Evaluation of the properties of an adhesive system modified by a peptidic antibacterial [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the properties of a modified adhesive system with the incorporation of a peptidic antibacterial, pure Nisin (Handary, Belgium), which is widely used for food preservation, in two different concentrations, 0.5% and 1.0%. The bond strength of the adhesive interface, the degree of conversion and antibacterial activity were evaluated, in addition to analysis using the Stereomicroscope and Scanning Electron Microscope (SEM). The adhesives were divided into three groups according to the concentration of nisin (Handary, Belgium) incorporated into the adhesive system in each group (n=10): SB – Single Bond 2 Adhesive (3M-ESPE), SBN05 – Single Bond 2 + Nisin 0,5%, SBN1 - Single Bond 2 + Nisin 1%. For the microtensile bond strength test, 30 healthy human molars (n = 10) were used. The degree of conversion was made in the Fourier transform infrared (FTIR), three readings of the drops of the adhesive of the different groups were made. The antibacterial activity was performed through the agar diffusion tests and colony forming unit (CFU) counting, performed in triplicate, where polymerized adhesive discs from different groups were used. The data were analyzed statistically for normality. As these presented normal distributions, the analysis of variance test (ANOVA) and the Tukey test of 5% were performed. The results obtained in microtensile (MPa±Dp) were SB 40,69±2,42^A, SBN05 39,20±2,21^A, SBN1 31,36±2,47^B. In the degree of conversion, we got as a result SB 83,50±3,42^A, SBN05 80,22±3,68^A and SBN1 78,44±0,95^A. In the antibacterial activity there was no difference in the formation of areas of inhibition. However, in the colony forming unit we obtained as a result SB 0,51±0,02^A, SBN1 0,36±0,03^B e SBN05 0,30±0,04^B. It was concluded that the incorporation of nisin did not influence the degree of conversion of the adhesive and in the bond strength in the percentage of 0.5%, presented antibacterial activity (CFU), showing its antibacterial effect.

Keywords: Adhesive system. Nisin. Bond strength. Anti-bacterial agents.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as resinas compostas são os materiais mais utilizados para restaurações diretas, por seus diversos benefícios, tais como suas propriedades estéticas, facilidades de manipulação e modernas tecnologias adesivas (Huang et al., 2018) e os sistemas adesivos são responsáveis pela união do material restaurador ao substrato dental, portanto também são amplamente utilizados na conduta odontológica contemporânea.

Pesquisas sobre estratégias para prevenir a degradação da interface adesiva, alcançando o sucesso na adesão e resultando no aumento da longevidade das restaurações, são importantes e estão em constante evolução, pois podem representar uma sensível redução nos gastos com as trocas das restaurações adesivas (Perdigão et al., 2013) e consequente preservação da estrutura dental.

Para interrupção da espiral da morte do dente, onde acontecem restaurações convencionais, reparo dessas restaurações, troca das mesmas por falhas, sendo restaurações maiores em toda troca, levando até sua extração (Elderton, 2003; Spencer et al., 2010), é necessária o sucesso na adesão da resina composta às estruturas dentárias.

Com a finalidade de aumentar a durabilidade da interface adesiva, estudos com o uso de substâncias com ação antimicrobiana e/ou de inibição de proteases, como por exemplo a Clorexidina e a amônia quaternária, mostraram resultados promissores na melhora da qualidade e aumento da durabilidade da interface adesiva (Carrilho et al., 2009; Gou et al., 2018)

A Nisina é um antibiótico peptídico amplamente utilizado na preservação de alimentos que contém lantionina (lantibiótico), e a sua atividade bactericida baseia-se na despolarização energética das membranas citoplasmáticas bacterianas, iniciada pela formação de poros transmembranares aquosos. Dessa forma, inicia-se a lise das membranas culminando com a morte celular. Adicionalmente a Nisina promove ligações cruzadas com a cysteina residual (Buchman et al., 1988) que contribuem para a degradação da interface adesiva se presentes na forma livre. Dessa forma poderemos melhorar a durabilidade das restaurações estéticas de resina composta, pois de acordo com o National Institute of Dental and Craniofacial

Research as restaurações de resina composta apresentam tempo médio de substituição de 5,7 anos devido à cárie secundária causada por falha na interface adesiva (Garcia, 2013). Portanto, tendo em vista que todos os anos, milhões de pessoas com dentes cariados ou com necessidade de substituição de restaurações procuram o serviço odontológico para receberem restaurações de resina composta, os esforços no sentido de reduzir a substituição dessas restaurações podem trazer grande economia para sociedade, não apenas no que diz respeito a parte financeira, mas também relativo ao tempo e stress dedicado a realização dos procedimentos e permanência dos elementos dentais em condições de saúde.

Diversos trabalhos mostram a efetividade da atividade antibacteriana da Nisina, com sua ampla atividade de espectro e baixa citotoxicidade celular em concentrações antimicrobianas (Shin et al., 2015), mostrando seu potencial na prevenção e tratamento de cáries (Pepperney, Chikindas, 2011; Tong et al., 2010), na inibição do crescimento de bactérias orais e desenvolvimento do biofilme (Shin et al., 2015), como de *Candida Albicans* (Le Lay et al., 2008) e *Enterococcus faecalis*, frequentemente encontrados dentro canais radiculares infectados (Turner et al., 2004), além de outras propriedades benéficas no combate às infecções, câncer, e uma série de outras enfermidades (Heunis et al., 2013; Kamarajan et al., 2015; Shin et al., 2016; van Staden et al., 2016).

Bis-GMA (metacrilato de bisfenol A-glicidil) é uma resina comumente usada em selantes, compósitos e cimentos dentais. Suportando dois grupos polimerizáveis, é propenso a formar um polímero reticulado de grande estabilidade. Para o trabalho odontológico, o bis-GMA é misturado com partículas de aluminossilicato, quartzo triturado e outros acrilatos relacionados.

A incorporação da Nisina com os componentes do adesivo começará pelo iniciador, como o peróxido de benzoíla ou persulfato de potássio, polarizando os sítios ativos das moléculas, se propagando para o Bis-GMA, dando início as reações, para posteriormente serem fotopolimerizados através da canforoquinona e serem usados na sua função de adesivo dentinário.

Baseado nos estudos analisados, a finalidade deste projeto será averiguar se a nisina em diferentes concentrações incorporado ao sistema adesivo não interfere na resistência de união, no grau de conversão do sistema adesivo; e se a nisina apresenta atividade antibacteriana em difusão em ágar e unidade formadora

de colônias, a qual se comprovada possibilitará no futuro, a confecção de uma vasta gama de produtos com a adição da Nisina, como cimentos resinosos, enxaguantes, resinas, medicações intracanal, selantes, resina acrílica para próteses totais, entre outros produtos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a compreensão, a revisão de literatura será dividida em dois tópicos principais: Sistemas adesivos e Nisina.

2.1 Sistemas Adesivos

Buonocore (1955), criou uma nova perspectiva na odontologia adesiva, introduzindo o conceito de que é possível mudar a estrutura dentária com a aplicação de ácido na sua superfície e assim torna-la mais favorável à adesão de materiais restauradores adesivos. Em seu estudo, utilizando discos de resina acrílica de 5 mm de diâmetro, e aplicando ácido fosfórico a 85% por 30 segundos no esmalte, demonstrou que a adesão era superior aos que não foram aplicados o ácido. O autor comprovou que a retenção de resina aplicada sobre a área de esmalte tratada com o ácido era muito maior se comparada com a área de esmalte não tratado.

Fusayama et al. (1979) afirmava que para conseguir adesão consistente, era necessário condicionar esmalte e dentina simultaneamente com ácido fosfórico em concentrações que variam entre 30 a 37%, removendo assim completamente a smear layer e expondo as fibras colágenas que seriam infiltradas pelo primer e posteriormente realizar a aplicação do adesivo.

Nakabayashi et al. (1982), realizaram um estudo que constatavam que o condicionamento em dentina era necessário para conseguir uma ligação entre o substrato e material restaurador, onde demonstraram que as resinas poderiam se infiltrar na dentina condicionada, e formar uma nova estrutura composta por uma matriz resinosa reforçada com fibras de colágeno, denominada de camada híbrida. A camada híbrida é conhecida como uma camada funcional de proteção e retenção, responsável por altos valores de união, portanto conhecer o conceito de camada híbrida foi imprescindível para a tentativa de melhoria nas propriedades dos sistemas adesivos contemporâneos além da incorporação do conceito de adesão à

dentina úmida.

A base dos agentes adesivos contemporâneos foi construída levando em consideração o conceito de condicionamento ácido total, proposto por Fusayama et al. (1979), aliado à hibridização da dentina, sugerido por Nakabayashi et al. (1982). Portanto, os sistemas convencionais de adesão propõem a remoção completa da smear layer pelo uso de ácidos, ocasionando a desmineralização da superfície dentinária, expondo as fibras colágenas para serem infiltradas por monômeros hidrofílicos. Os materiais utilizados, portanto, são um gel ácido, o primer, e o adesivo.

Pashley (1991), observou alguns inconvenientes na técnica de adesão, como a exposição das fibrilas colágenas que se mostravam ressecadas decorrente da secagem, o que ocasionava o seu colapso, diminuindo os valores de resistência de união à interface resina-dentina. Portanto, para solucionar esse problema, surgiram os adesivos autocondicionantes, sistemas adesivos que não necessitam de condicionamento prévio com ácido fosfórico, obtendo assim um maior controle da umidade no substrato dentinário. Suas formulações incorporam monômeros resinosos ácidos que desmineralizam e infiltram os tecidos dentais simultaneamente. Por conseguinte, não devem ser lavados da superfície das paredes cavitárias. Os sistemas adesivos autocondicionantes podem ser de dois passos, no qual o condicionador e o primer estão juntos em um único frasco e o adesivo está em outro frasco, sendo aplicado separadamente, ou de passo único, onde há a junção de ácido, primer e adesivo em um mesmo frasco, logo, numa mesma aplicação.

Quando comparados aos sistemas convencionais, são menos sensíveis às questões de umidade superficial da dentina e evitam sensibilidade pós-operatória, assim como, a nanoinfiltração. Estes adesivos também apresentam um pH ácido e não são removidos do substrato dental após sua aplicação, provocando assim desmineralização limitada dos tecidos dentários. Desta maneira, pode se esperar uma menor efetividade desses materiais sobre o esmalte, devido ao alto conteúdo inorgânico existente neste tecido (Ruschel et al., 2018) e, por isso, o condicionamento seletivo do esmalte com ácido fosfórico está indicado sempre que este tecido estiver fazendo parte do procedimento.

Com o objetivo de solucionar o problema da necessidade do condicionamento seletivo do sistema autocondicionante, surgiu no mercado um novo

sistema adesivo denominado universal, que teoricamente poderiam ser utilizados com ou sem condicionamento, seja em esmalte ou dentina. Contudo, o condicionamento seletivo de margens de esmalte também tem sido recomendado por alguns autores, antes da aplicação destes novos sistemas adesivos autocondicionantes universais, pela capacidade do ácido fosfórico de aumentar significativamente a resistência de união dos adesivos autocondicionantes ao esmalte.

Existem várias marcas que apresentaram ao mercado os adesivos universais, entre eles o adesivo Single Bond Universal (3M Espe) o qual demonstra bons resultados clínicos e tem sido amplamente estudado. O adesivo universal é um produto que pode ser utilizado como adesivo convencional, como autocondicionante de passo único, ou como condicionante seletivo para esmalte. Kose et al. (2013), relataram que após 6 meses de uso clínico, o Single Bond Universal se mostrou confiável para ser utilizado, independentemente do modo pelo qual foi aplicado: condicionamento ácido total – dentina úmida; condicionamento ácido total – dentina seca; condicionamento seletivo em esmalte e autocondicionante.

Segundo Van Meerbeek et al. (1998), para os sistemas adesivos serem considerados eficazes, devem reter a restauração por um período de tempo significativo e selar por completo as margens da cavidade, prevenindo, assim, manchamento marginal, cárie recorrente e possível patologia pulpar, que são os sinais e sintomas mais comuns associados ao fracasso clínico das restaurações adesivas.

A adesão ao esmalte é uma técnica considerada confiável por alguns autores, porém a adesão à dentina ainda é um desafio. Perdigão (2010), concluiu que as variações morfológicas e físicas na dentina humana, fazem dela um substrato difícil para a obtenção de uma união durável entre resina e dentina. O aumento na procura pelos pacientes por restaurações estéticas, levou a um aumento nas pesquisas sobre novos materiais restauradores estéticos e sua adesão ao substrato dentário. (Van Meerbeek et al., 1998; Perdigão et al., 2013)

De acordo com Baratieri (2010), cada material tem um papel importante. O ácido tem como função principal na dentina, a remoção da lama dentinária e exposição de fibras colágenas. O primer serve de elo entre a superfície úmida da dentina condicionada e o agente adesivo, estabilizando a rede de fibras colágenas e

promovendo a evaporação do excesso de água, aumentando a energia livre de superfície da dentina, tornando-a então apta a interagir com o agente adesivo. E por último, o adesivo tem função de atuar como agente intermediário entre a estrutura dental e materiais restauradores, formando a camada híbrida. Portanto, como os cirurgiões dentistas procuram obter a melhor adesão possível e uma maior longevidade de suas restaurações, é necessário o aumento da resistência de adesão, conseguindo maior longevidade. (Jacker-Guhr et al., 2019).

Spencer et al. (2010), produziram uma revisão de literatura, onde observaram os aspectos clínicos que impactam a adesão, e os fatores físico químicos que afetam a integridade e durabilidade da interface adesiva. Os autores iniciaram o trabalho levantando estudos que comparavam as restaurações de resina composta com as restaurações de amálgama. Eles observaram que as restaurações em resina composta apresentam uma maior necessidade de troca, menor longevidade e que as causas estão relacionadas a fendas marginais, que permitem a infiltração de enzimas bacterianas, fluídos orais e bactérias, levando a queda das restaurações, hipersensibilidade dentinária e inflamação pulpar.

Perdigão et al. (2021) escreveram um artigo o qual o objetivo era revisar os avanços recentes em adesivos, discutir sua aplicação clínica e analisar as evidências por trás de alguns dos conceitos atualmente defendidos por fontes que não são baseadas em evidências clínicas existentes. Com base na evidência clínica disponível, adesivos dentários clássicos que incluem uma etapa de resina de ligação hidrofóbica, isto é, adesivos convencionais de três etapas e adesivos autocondicionantes de duas etapas, são mais estáveis e resultam em restaurações mais duráveis do que suas contrapartes simplificadas. Adesivos simplificados têm várias deficiências, incluindo resultados clínicos inferiores em lesões cervicais não cáries e restaurações compostas posteriores. Apesar de seu desempenho clínico inferior, adesivos simplificados se tornaram muito populares, pois os dentistas tendem a selecionar materiais que são mais fáceis de usar. No entanto, pesquisas clínicas e laboratoriais demonstraram que há um trade-off entre a simplificação de adesivos dentais e respectivos resultados.

A literatura científica frequentemente mostra que a ligação resina-dentina obtida com sistemas adesivos atuais é propensa à degradação ao longo do tempo (Pucci et al., 2018) incentivando o desenvolvimento de novos estudos nesse campo.

Como por exemplo no estudo de Gou et al. (2018), onde um novo metacriloxissilano de amônio quaternário (QAMS) preparado a partir da química sol-gel foi incorporado em adesivos experimentais para examinar seu efeito antimicrobiano e potencial antiproteolítico. Os testes antibacterianos realizados foram o teste de difusão em ágar, coloração de bactérias vivas/mortas e contagens de unidades formadoras de colônia, os quais indicaram que os adesivos contendo QAMS mataram *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii* de uma maneira dependente da dose, por meio de um mecanismo de eliminação por contato. A atividade gelatinolítica dentro das camadas híbridas criadas por esses adesivos foi examinada usando zimografia in situ. Camadas híbridas criadas com 0% de QAMS no adesivo, exibiram intensa fluorescência verde emitida pela gelatina conjugada com fluorescência hidrolisada, com aumento de 4 vezes na atividade enzimática em comparação com um adesivo experimental contendo 5% de QAMS. Portanto, a incorporação de 5% de QAMS no adesivo experimental fornece atividades antimicrobianas e antiproteolíticas simultâneas que são cruciais para a manutenção da integridade da ligação resina-dentina a longo prazo.

2.2 Nisina

A cárie é uma doença multifatorial e é uma preocupação mundial. A doença cárie ocorre quando tipos específicos de bactérias produzem ácidos que destroem o esmalte do dente e a camada logo abaixo dela, a dentina. Existem pesquisas para descobrir produtos que possam tratar essa doença, e que não apresentem sabor desagradável, não causem irritabilidade e manchamento das estruturas dentais, além da crescente demanda pública por produtos naturais e seguros para sua higiene pessoal.

Os peptídeos antibacterianos foram imensamente estudados nas últimas três décadas para servir em diferentes usos terapêuticos. Existem atualmente centenas de peptídeos antibacterianos caracterizados em todo o espectro evolutivo, e entre estes, muitos demonstram propriedades físicas e/ou biológicas que podem ser adequados para uma abordagem mais direcionada para o controle ou eliminação

de patógenos da cárie. Além disso, muitos peptídeos, como a nisina, são inodoros, incolores, sem gosto e não causam irritação ou manchas (Pepperney, Chikindas, 2011).

O principal foco de interesse na nisina tem sido para uso em alimentos preservação e mais recentemente como um antibiótico contra uma série de doenças infecciosas. Inúmeros pedidos de patentes também foram apresentados, reivindicando a eficácia da nisina em formulações de goma de mascar contra cáries e outras doenças bucais. Os microrganismos relacionados à cárie dentária são em sua maioria Gram-positivos, e o peptídeo antimicrobiano nisina geralmente tem efeito inibitório sobre este tipo de bactéria, o que estabelece a possibilidade de aplicação da nisina na prevenção da cárie dentária. (Pepperney, Chikindas, 2011)

Tong et al. 2010, realizaram um estudo onde investigaram se a nisina poderia ser usada como um antibiótico peptídico eficaz contra os nove microrganismos cariogênicos comuns (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermenti*) e se sua atividade antimicrobiana poderia ser afetada pelos componentes da saliva na cavidade oral. Na concentração inibitória mínima (MIC) e na concentração bactericida mínima (MBC) e no ensaio local, a nisina apresentou diferentes MIC, MBC e atividade antimicrobiana contra as nove cepas testadas. Houve diferença estatística entre os diâmetros da zona inibitória de nisina contra as diferentes bactérias testadas ($p < 0,05$). Os resultados sugeriram que a nisina tem um potencial considerável para a prevenção e tratamento da cárie dentária.

Tong et al. 2011, realizaram um estudo com o objetivo de investigar a ação sinérgica da nisina com o fluoreto de sódio ou clorexidina contra o *Streptococcus mutans*, um patógeno cariogênico primário. No ensaio antibacteriano, o efeito assinérgico em *S. mutans* foi encontrado entre nisina e fluoreto de sódio, mas não houve interação entre nisina e clorexidina, nem na concentração inibitória fracionária (FIC) e nos testes de concentração bactericida fracionada (FBC). As taxas de sobrevivência de *S. mutans* mostraram uma diminuição significativa após o tratamento com uma combinação de nisina e fluoreto de sódio em um estudo de time-kill (teste realizado para avaliar um material antimicrobiano e avalia a redução in vitro de uma população microbiana). A microscopia eletrônica de varredura

mostrou que o dano a *S. mutans* com o tratamento combinado com nisina e fluoreto de sódio foi o mais severo entre todos os diferentes tratamentos antimicrobianos únicos e combinados. Além disso, no teste de antibiofilme, a nisina em combinação com fluoreto de sódio produziu efeito bactericida mais forte em um biofilme de *S. mutans* por 4 e 16 h em comparação com fluoreto de sódio sozinho por microscopia de varredura confocal laser. A nisina em combinação com fluoreto de sódio exerceu um alto efeito bactericida sobre *S. mutans* e, portanto, tem o potencial de ser usada como uma combinação de medicamentos eficaz para prevenir cáries dentárias.

Shin et al. (2015), realizaram um estudo onde seu objetivo era investigar os efeitos da Nisina ZP (pureza > 95% de pureza) em bactérias diversificadas que se encontram na cavidade oral humana e descobrir a toxicidade da nisina em células existentes na cavidade oral. Para avaliar o efeito da nisina no biofilme dois modelos de sistemas foram utilizados: um sistema de microfluidos estático e de fluxo controlado. Os biofilmes foram inoculados com saliva humana acumulada e alimentado por saliva esterilizada por filtro por 20–22 horas a 37°C. O efeito da nisina na apoptose celular e na proliferação foram avaliados usando a coloração fluorescente de laranja de acridina/brometo de etídio com ensaios de hidrogeneatividade lactada. Obtiveram como resultados que a nisina inibiu o crescimento de bactérias orais em baixas concentrações (2,5–50 µg / ml). A nisina também retardou o desenvolvimento de múltiplas espécies do biofilme em concentrações ≥1 µg / ml. Especificamente, sob condições de modelo de biofilme, a nisina interferiu no desenvolvimento do biofilme e reduziu a massa e espessura de biofilme. Células humanas relevantes para a cavidade oral não foram afetadas pelo tratamento da nisina e não apresentaram sinais de alterações apoptóticas, a menos que tratadas com concentrações muito mais altas (> 200 µg / ml). E concluíram que a nisina tem alto potencial para inibir o crescimento de bactérias orais e o desenvolvimento de biofilmes relacionados a doenças orais.

Su et al. (2018), realizaram um estudo onde incorporaram o peptídeo antibacteriano nisina em um adesivo para avaliar a atividade antibacteriana do adesivo modificado contra *Streptococcus mutans* e a resistência de união. Single Bond 2 foi usado como controle negativo, e nisina foi incorporada a 1%, 3% e 5%. A atividade antibacteriana contra *S. mutans* foi avaliada por meio do teste de difusão em ágar, ensaios XTT (ensaio XTT é usado para medir a atividade metabólica

celular como um indicador de viabilidade celular) e microscopia confocal de varredura a laser. A resistência de união à microtração (μ TBS) do adesivo dentário modificado também foi avaliada. O adesivo dental com incorporação de nisina exibiu um efeito inibitório significativo sobre o crescimento de *S. mutans* ($P < 0,05$), e o efeito inibitório foi fortalecido com o aumento da concentração de nisina ($P < 0,05$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas no teste de difusão em ágar para os adesivos com incorporação de nisina em comparação com o grupo controle. Com base nos resultados do XTT e nas imagens de microscopia confocal, o adesivo fotopolimerizado com incorporação de nisina interferiu na aderência de *S. mutans* e na integridade de seus biofilmes ($P < 0,05$). Em comparação com o grupo controle, o grupo de nisina a 1% não exibiu uma diferença significativa na resistência de união ($P > 0,05$), enquanto os grupos de nisina a 3% e 5% apresentaram diminuição da força de união ($P < 0,05$).

Zhao et al. (2020), com a finalidade de aumentar a atividade antibacteriana de um adesivo universal, o peptídeo antimicrobiano nisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nas quantidades de 1%, 2% e 3%, foi incorporado em Single Bond Universal e seu efeito antibacteriano em biofilmes de *Streptococcus mutans* e derivados de saliva biofilmes multiespécies foram estudados. A nisina foi incorporada ao Single Bond Universal e a atividade antibacteriana foi examinado por microscopia confocal de varredura a laser. As propriedades de adesão foram testadas por resistência de ligação à microtração e grau de conversão. Os dados foram analisados por análise de variância unilateral (ANOVA) e testes de comparação múltipla de diferença mínima significante ($P < 0,05$). O Single Bond Universal incorporado com 3% de nisina, pode inibir significativamente o crescimento dos biofilmes monoespecíficos de *S. mutans* ($P < 0,01$). O adesivo com 3% de nisina incorporada ao Single Bond Universal também pode inibir o crescimento de biofilmes multiespécies derivados da saliva ($P < 0,05$). A força de união de adesivos com incorporação de nisina foi testada usando microtração. Para os grupos de nisina de 1–3%, a força de união não diminuiu significativamente em comparação ao grupo controle ($P > 0,05$). Contudo, os resultados caem rapidamente quando a concentração excede 3%, sugerindo que a concentração inferior a 3% não colocará em risco a adesão do Single Bond Universal (três concentrações experimentais de nisina [1, 2 e 3%] e um grupo de controle foram selecionados para

os testes adicionais). O grau de conversão para o controle, 1%, 2% e 3% foram $47,52 \pm 0,82\%$, $58,99 \pm 0,93\%$, $41,54 \pm 0,95\%$ e $36,84 \pm 0,52\%$, respectivamente. A concentração de nisina dentro de 3% tem pouco efeito sobre o valor do grau de conversão.

Le Lay et al. (2008), tinham como objetivo em seu trabalho investigar a eficácia da nisina Z contra o crescimento de *Candida albicans*. *Candida albicans* foi cultivada na presença da nisina Z em várias concentrações (1000, 500 e 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) observados em diferentes tempo. A transição da levedura da forma de blastóporo para a forma hifal foi avaliada através de observações no microscópio óptico. O efeito da nisina Z na ultraestrutura de *C. albicans* foi seguido por microscopia eletrônica de varredura e transmissão. Os resultados mostram que a nisina Z inibiu o crescimento de *C. albicans* começando em 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Esta inibição foi dependente do tempo e da dose. Nisina Z também foi efetiva contra a transição de *C. albicans* por inibir significativamente a transformação de *C. albicans* de blastóporo para a forma hifal. Tratamentos com nisina Z leva a distúrbios ultraestruturais de *C. albicans*. Tiveram como conclusão que a nisina Z reduziu significativamente crescimento e a transição da *Candida Albicans*. Esses resultados, portanto, sugerem que a nisina Z pode ter propriedades antifúngicas e pode ser usada como uma molécula antifúngica.

A nisina foi também utilizada em diferentes tipos de estudos, como para tratar infecções cutâneas induzidas por *Staphylococcus aureus* em camundongos no estudo de Heunis (2013). *Staphylococcus aureus* é um patógeno virulento e um dos principais agentes causadores de infecções superficiais e invasivas da pele e tecidos moles. A resistência aos antibióticos em *S. aureus*, entre outros patógenos bacterianos, aumentou rapidamente, e tem sérias implicações para indivíduos infectados, especialmente pacientes imunocomprometidos. Tratamentos alternativos, portanto, precisam ser explorados para continuar a tratar com sucesso as infecções causadas por *S. aureus*, incluindo cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos. Neste estudo, foi desenvolvido um curativo antimicrobiano de nanofibras de nisina, gerado por eletrofiação (Nisaplin) em uma mistura de poli (óxido de etileno) e poli (D, L-lactídeo) (50:50). Nisina foi ativamente difundida nos curativos de nanofibra por pelo menos 4 dias in vitro, conforme mostrado por transferências consecutivas para placas semeadas com cepas de *S. aureus* resistente à metilina

(MRSA). Os curativos de nanofibra contendo nisina reduziram significativamente *S. aureus* in vivo e números de células viáveis em um modelo de infecção cutânea excisional. Além disso, os curativos estimulavam fechamento de feridas excisionais, e nenhum efeito adverso foi observado pela análise histológica. A nanofibra contendo nisina para feridas têm o potencial de tratar infecções de pele por *S. aureus* e potencialmente acelerar a cicatrização de feridas excisionais.

Kamarajan et al. (2015), utilizou a nisina para tratar o câncer, o qual é uma nova abordagem que é muito promissora. Nisina tem sido usado com segurança em humanos por muitos anos como conservante de alimentos, e recentemente em laboratório, estudos apoiam seu potencial antitumoral no câncer de cabeça e pescoço. Os estudos atuais exploraram uma variante natural de nisina (nisina ZP; 95%, alto teor) por seus efeitos antitumorais in vitro e in vivo. Nisin ZP induziu o maior nível de apoptose em células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço (HNSCC) em comparação com nisina de baixo teor. Células HNSCC tratadas com concentrações crescentes de nisina ZP exibiram níveis crescentes de apoptose e níveis decrescentes de proliferação celular, capacidade clonogênica e formação de esferas. Nisina ZP induziu apoptose em células de HNSCC mas não em queratinócitos orais humanos. Nisina ZP reduziu a tumorigênese in vivo e o tratamento de longo prazo com nisina ZP causou uma sobrevida prolongada. Além disso, os camundongos tratados com nisina exibiram histologia de órgão normal, sem evidência de inflamação, fibrose ou necrose. Em resumo, a nisina ZP exibe maiores efeitos antitumorais do que nisina em baixa porcentagem e, portanto, tem o potencial de servir como uma nova terapêutica para HNSCC.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades de um sistema adesivo modificado com a incorporação de nisina (Handary, Belgium) em duas diferentes concentrações (0,5 e 1%).

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a resistência de união da interface adesiva;
- b) Avaliar o grau de conversão;
- c) Avaliar a atividade antibacteriana.

3.3 Hipóteses nulas testadas

A inclusão de nisina incorporada ao sistema adesivo em duas diferentes concentrações (0,5 e 1%):

- H01 – Não interfere na resistência de união da interface adesiva;
- H02 – Não altera o grau de conversão do material;
- H03 – Não possui atividade antibacteriana no teste de difusão de ágar
- H04 – Não possui atividade antibacteriana no teste de unidade formadora de colônias

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP, através da Plataforma Brasil do Ministério da Saúde, CAAE: 17729519.5.0000.0077, conforme anexos A e B.

4.2 Delineamento experimental

4.2.1 Unidade experimental

- a) Espécimes de dentina obtidos de dentes humanos;
- b) Gotas do adesivo;
- c) Discos de adesivo polimerizados.

4.2.2 Fatores de estudo

Tratamento em 3 níveis:

- a) Adesivo Comercial Single Bond 2
- b) Adesivo Comercial Single Bond 2 + Nisina 0,5%
- c) Adesivo Comercial Single Bond 2 + Nisina 1%

4.2.3 Variável de resposta

- a) Resistência de união (Microtração).
- b) Grau de conversão.
- c) Atividade antibacteriana (Difusão em ágar e Unidade formadora de colônia).

4.3 Materiais utilizados

Todos os materiais, fabricantes e composições estão listados no Quadro 1.

Quadro 1 - Materiais utilizados no estudo

Material	Marca Comercial	Fabricante	Composição
Ácido fosfórico	Etch-37%	Bisco Inc., Schaumburg, IL, USA	Ácido fosfórico 37%
Sistema Adesivo	Single Bond 2	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	Bis-GMA, HEMA, dimetacrilato, água, etanol, fotoiniciador, nanopartículas de sílica, copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenóico
Resina Composta	Filtek-Z 350XT	3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA, Bis-EMA, nanosílica filler, zircônia/ partículas de sílica.
Nisina	Nisin	Handary, Belgium	Pó de cor branca a esbranquiçada, inodoro, antibiótico peptídico amplamente utilizado na preservação de alimentos que contem lantionina (lantibiótico) obtida pela cultura do <i>L. Lactis</i> com substratos naturais não é sintetizado quimicamente.

Fonte: Elaborado pelo autor.

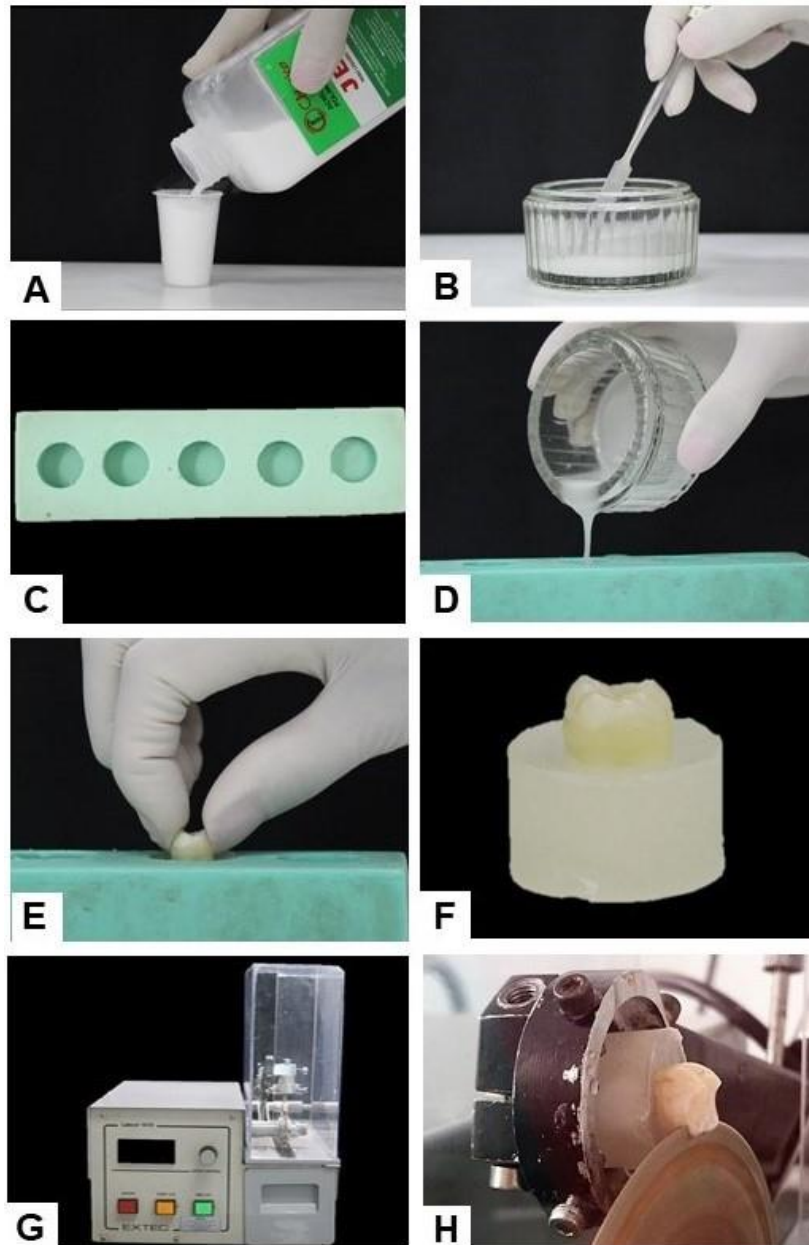
4.4 Seleção das amostras para teste de microtração

Os espécimes foram obtidos de 30 molares humanos extraídos e doados por consentimento livre e esclarecido dos pacientes, seguindo os seguintes critérios: precisavam estar hígidos e livres de alterações em esmalte e dentina. Os dentes foram armazenados em água destilada a 4° C até o momento do uso.

4.5 Preparo das amostras para o teste de microtração

Os dentes foram fixados em resina acrílica autopolimerizável (Jet-Artigos Odontológicos, Clássico, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1A e 1B) com o auxílio de um molde de silicone Rhodorsil (Artigos Odontológicos Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil) (Figura 1C e 1D), onde toda a coroa permaneceu exposta e a superfície oclusal paralela à base da resina acrílica (Figura 1E e 1F), logo em seguida o esmalte oclusal foi removido na máquina de cortes seriados Labcut 1010 (Extec Technologies Inc., Enfield, CT, EUA) (Figura 1G) em um corte paralelo aproximadamente 4 mm acima da junção amelo-cementária para expor a dentina (Figura 1H).

Figura 1 – Preparo das amostras

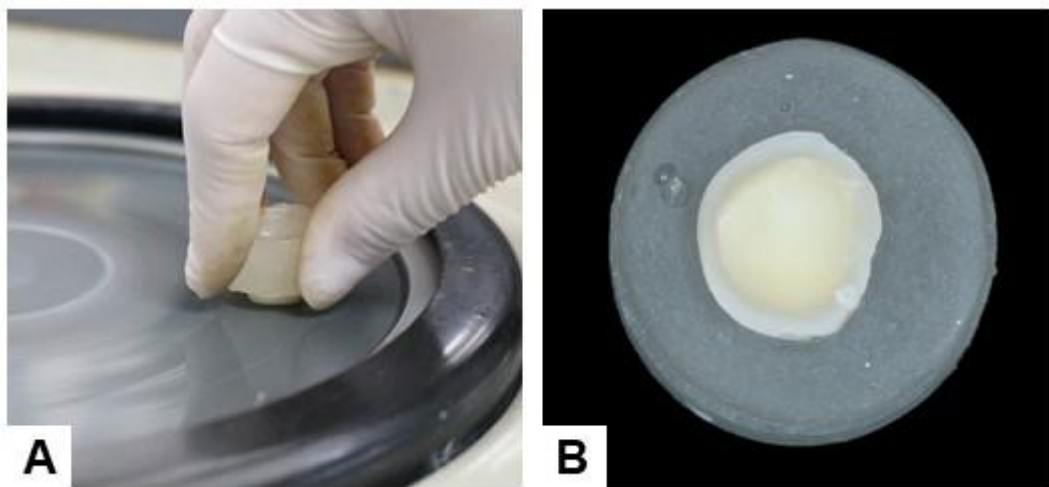


Legenda: a) resina acrílica autopolimerizável; b) representação do preparo da resina acrílica autopolimerizável; c) molde de silicone; d) representação do preenchimento do molde com a resina acrílica; e) fixação do dente na resina acrílica; f) dente fixado na resina acrílica com a coroa exposta e a superfície oclusal paralela à base da resina acrílica; g) máquina de cortes seriados; h) representação do corte paralelo aproximadamente 4 mm acima da junção amelo-cementária para expor a dentina.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Na sequência, os espécimes foram levados a uma politriz circular (DP-10, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), para desgaste do esmalte remanescente sobre a dentina oclusal, e para padronização da dentina. O desgaste foi feito com discos de lixas de carboneto de silício (Extex Corp., Enfield, CT, EUA) (Figura 2A) de

granulação 600, a 300 rpm, sob refrigeração com água. Os espécimes ficaram em contato com a superfície da lixa por 30 s (Figura 2B), para remover a *smear layer* produzida pelo corte com o disco diamantado e produzir uma nova *smear layer* padronizada (Figura 2C).

Figura 2 – Finalização do preparo das amostras



Legenda: a) espécime em contato com a superfície da lixa; b) espécime pronto.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Divisão dos grupos experimentais

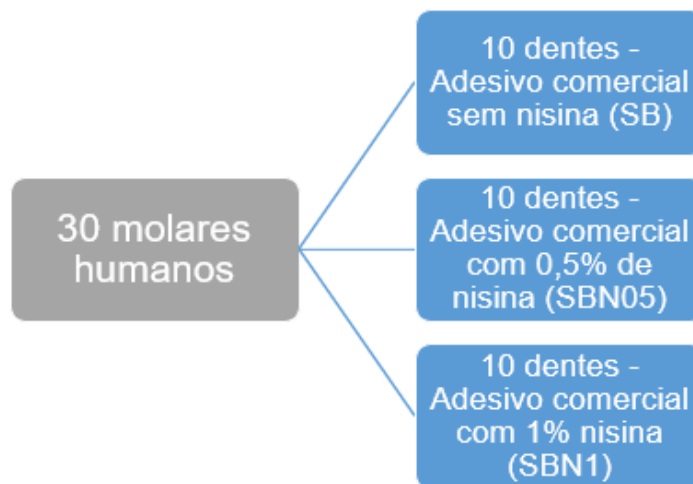
Para a realização dos tratamentos, os dentes foram divididos em três grupos: um grupo controle composto pelo Adesivo Comercial Single Bond 2 (3M-ESPE), outro grupo composto pelo Adesivo Comercial Single Bond 2 com a incorporação de 0,5% de nisina, e outro grupo composto pelo Adesivo Comercial Single Bond 2 com a incorporação de 1% de nisina (n=10). Para o teste de resistência de união foram utilizados 30 molares humanos hígidos (n=10). A Figura 3 mostra a divisão experimental dos grupos para a resistência de união.

Utilizou-se a nisina nas concentrações de 0,5% e 1% pois Su *et al.* 2018 verificaram que a incorporação das porcentagens 1, 3 e 5% demonstraram uma

significante atividade antibacteriana, onde a atividade era maior nas concentrações maiores de nisina, porém com diminuição da adesividade ao aumentar suas porcentagens. Su et al. utilizou uma nisina (Sigma Aldridch, USA) que apresenta em sua composição nisina diluída em cloreto de sódio, portanto não se pode afirmar que a resistência de união foi afetada pela nisina, podendo ter sido diminuída pelo cloreto de sódio. Nesse projeto utilizaremos a nisina pura (Handary, Belgium), que possui na sua composição apenas nisina, que certamente terá maior efeito antibacteriano e não terá efeito do cloreto de sódio.

Também se utilizou as porcentagens de 0,5% e 1% pois no projeto piloto com as porcentagens de 1%, 3% e 5% se verificou a diminuição exorbitante da resistência de união, decidindo então usar porcentagens reduzidas, pois no grupo de 1% já foi percebida uma leve diminuição da resistência de união.

Figura 3 – Delineamento dos grupos de pesquisa para resistência de união



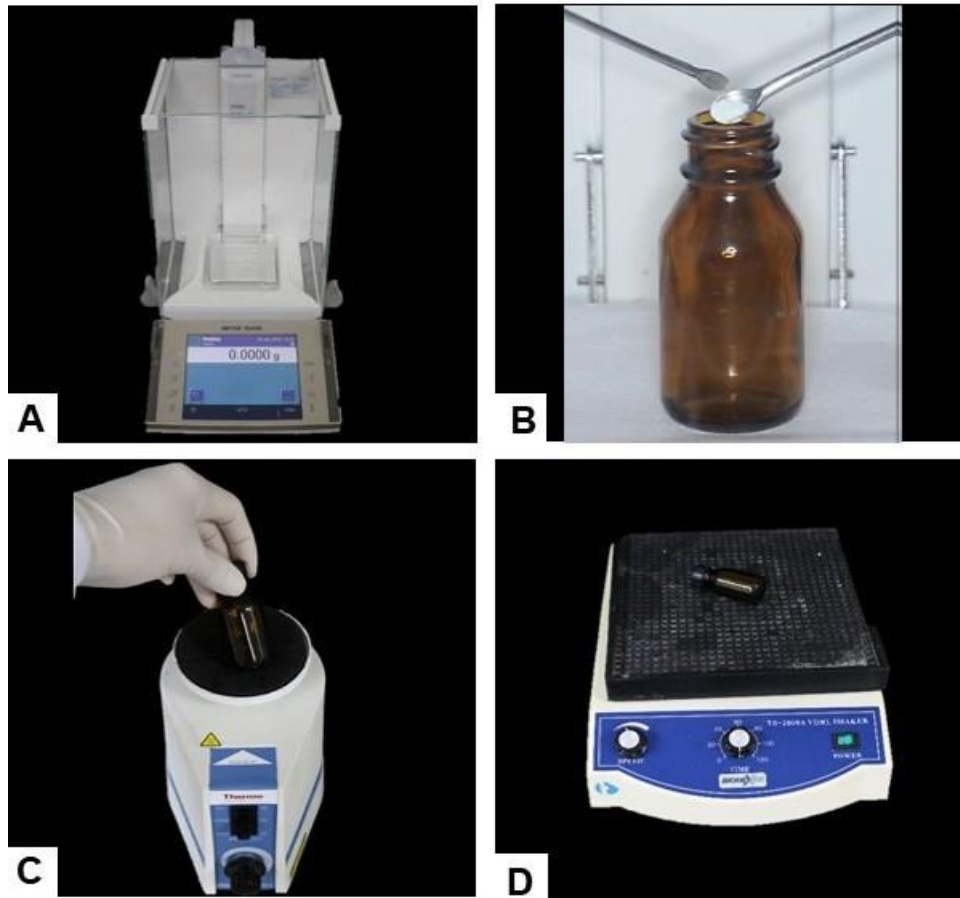
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Incorporação da nisina no adesivo

A Nisina ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) (Handary, Belgium) é comercializada em pó, e é solúvel em etanol e hidrossolúvel, portanto, será dissolvida em diferentes concentrações (0,5 e 1% - peso) em um adesivo comercial (Single Bond 2 – 3M ESPE).

As partículas de nisina (Handary, Belgium) foram pesadas minuciosamente em balança de precisão (Mettler, Toledo, Suíça) (Figura 4A) nas concentrações 0,5 e 1% em peso. As partículas foram então misturadas ao adesivo *Single Bond 2* (3M-ESPE) em vidro fechado âmbar (Figura 4B) em ambiente escuro para evitar exposição precoce à luz (Figura 4B). A mistura foi feita em vibrador (Maxi Mix II VortexMixer, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Alemanha) (Figura 4C) até a obtenção de uma solução homogênea e clara (transparente), com as partículas inteiramente incorporadas. Em seguida, os frascos foram mantidos sob agitação constante (Orbit 300, LabNET International Inc., Woodbridge, NJ, EUA) (Figura 4D), por 48 horas. No momento do uso as partículas foram levadas para agitação novamente.

Figura 4 – Incorporação da nisina no adesivo



Legenda: a) balança analítica de precisão; b) representação da pesagem das partículas em vidro âmbar; c) representação dos componentes no frasco no vibrador; d) representação do frasco em agitador por 48 h.

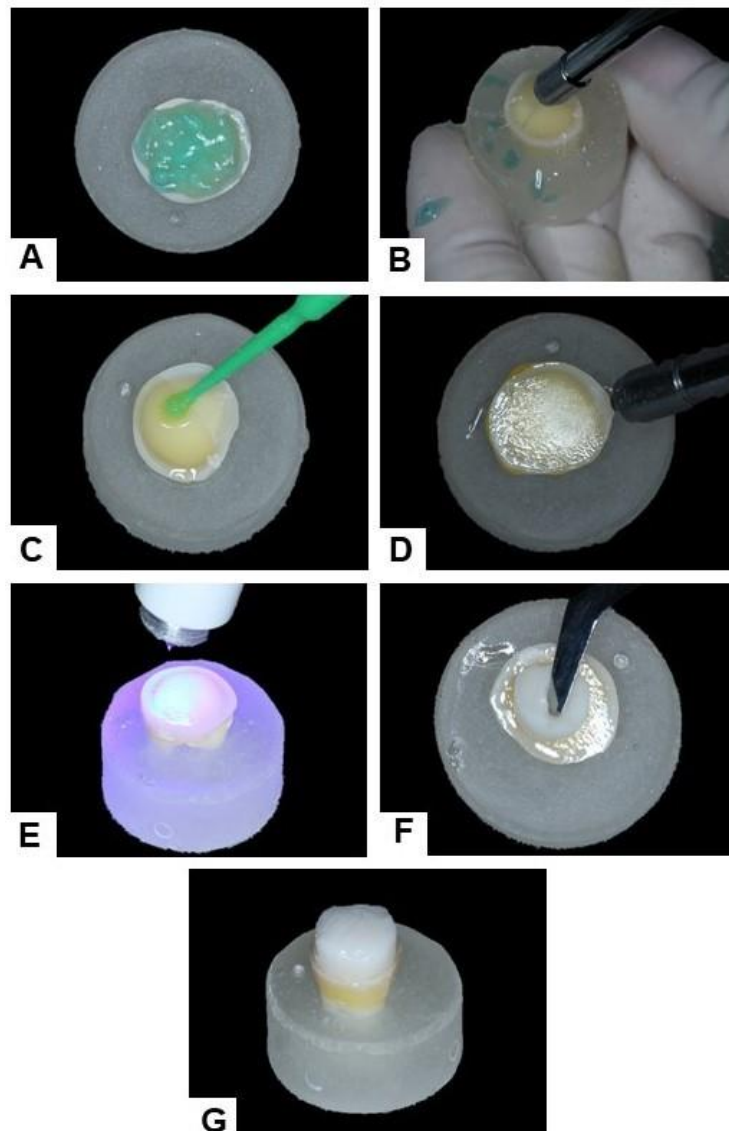
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Aplicação do adesivo e técnica restauradora

Foi realizado o condicionamento ácido da dentina com a aplicação de ácido fosfórico a 32% (Uni-Etch, Bisco Inc., Schaumburg, IL, EUA) por 15 s (Figura 4A), lavagem com água deionizada por 15 s (Figura 4B) e secagem com jato de ar por 5 s para manter a dentina condicionada visivelmente úmida. A aplicação do sistema adesivo foi realizada sobre a dentina exposta (Figura 4C). A aplicação foi feita de forma ativa durante 20 s, em seguida foi utilizado jato de ar para remoção do solvente (Figura 4D) e posteriormente a fotopolimerização por 20 s (Figura 4E). Após a aplicação do sistema adesivo, foram adicionados 3 incrementos de 1,5 mm de espessura da resina composta nanoparticulada (Filtek Z 350 XT - 3M-ESPE - Cor

A2) em todos espécimes (Figura 4F). Estes foram fotoativados, um de cada vez, por 20 s, a uma distância padronizada, com o aparelho fotopolimerizador de LED, emissor de luz azul, comprimento de onda que varia entre 440 nm a 480 nm com uma densidade de potência de 1200 mW/cm² (Radii-cal, SDI, Victoria, Austrália). A restauração finalizada pode ser observada na Figura 4G.

Figura 5 – Técnica restauradora



Legenda: a) condicionamento ácido; b) lavagem; c) aplicação do adesivo; d) jato de ar para evaporação do solvente; e) fotopolimerização; f) aplicação de um incremento de resina composta; g) restauração finalizada.

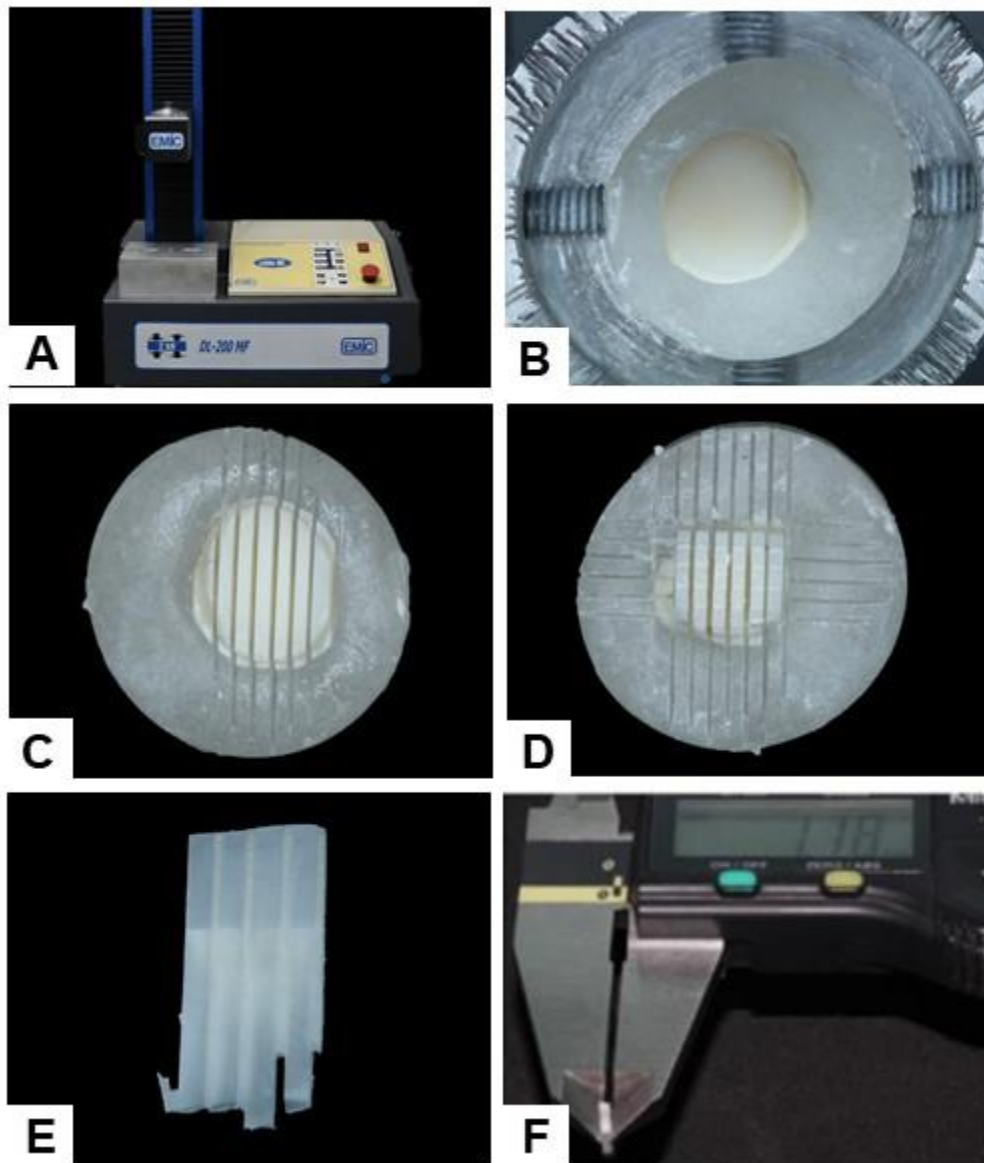
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9 Teste de resistência a microtração

Os dez espécimes de cada grupo foram submetidos ao teste de resistência da união às tensões de microtração. Este teste foi realizado em uma máquina de ensaios universal EMIC DL2000 (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) (Figura 6A) com uma célula de carga de 10 kg à velocidade de 0,5 mm/min para avaliar a força adesiva na interface material restaurador/dentina. O conjunto resina acrílica-amostra foi posicionado na Labcut 1010 (Extec Technologies Inc., Enfield, CT, EUA) para a realização de cortes paralelos no longo eixo da coroa, em baixa velocidade e sob refrigeração abundante (Figura 6B). A partir das secções de 1 mm de espessura nos sentidos mésiodistal e vestibulo-lingual (Figura 6C e 6D), obtiveram-se palitos de resina composta e dentina, com aproximadamente 1 x 1 mm de largura, sendo realizada a mensuração da área de adesão antes do teste de microtração com paquímetro digital (Starret Indústria e Comércio Ltda., Itu, SP, Brasil) (Figura 6E).

Os palitos de resina-dentina obtidos de cada espécime ficaram armazenados em tubos identificados (vol. 2 mL) do tipo Eppendorf (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6F), em estufa a 37 °C, em água deionizada por 24 h antes do teste de microtração.

Figura 6 – Confeccção dos palitos para o teste de microtração



Legenda: a) máquina de ensaios universal EMIC DL2000; b) conjunto resina acrílica-amostra sendo posicionado na Labcut 1010; c) secções de 1 mm de espessura no sentido mesiodistal; d) secções de 1 mm de espessura no sentido vestibulo-lingual; e) palitos de resina composta e dentina com aproximadamente 1 x 1 mm de largura; f) mensuração da área de adesão dos palitos.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a microtração, os palitos (Figura 7A) foram fixados individualmente pelas suas extremidades com adesivo cianoacrilato em gel (Zapit, Dental Ventures of American, Corona, CA, EUA) no dispositivo de microtração metálico (Figura 7B), de modo a posicionar a área adesiva perpendicularmente ao longo eixo da força de tração, para realização do ensaio de microtração na máquina de testes (Figura 7C),

no momento da fratura, o teste é automaticamente interrompido (Figura 7D).

A resistência de união foi calculada em MPa pela fórmula:

$$\delta = F/A$$

Onde, δ é a força de união a microtração, F é a força aplicada e A é a área de união entre resina – adesivo – dentina. Ao final do ensaio as partes fraturadas foram limpas e secas e então analisadas quanto ao padrão de fratura em estereomicroscópio ótico com aumento de 40x (Zeiss, steREO Discovery V20, Göttingen, Germany), e classificadas quanto ao tipo de fratura. As falhas pré-teste e fraturas coesivas em resina e dentina não foram consideradas.

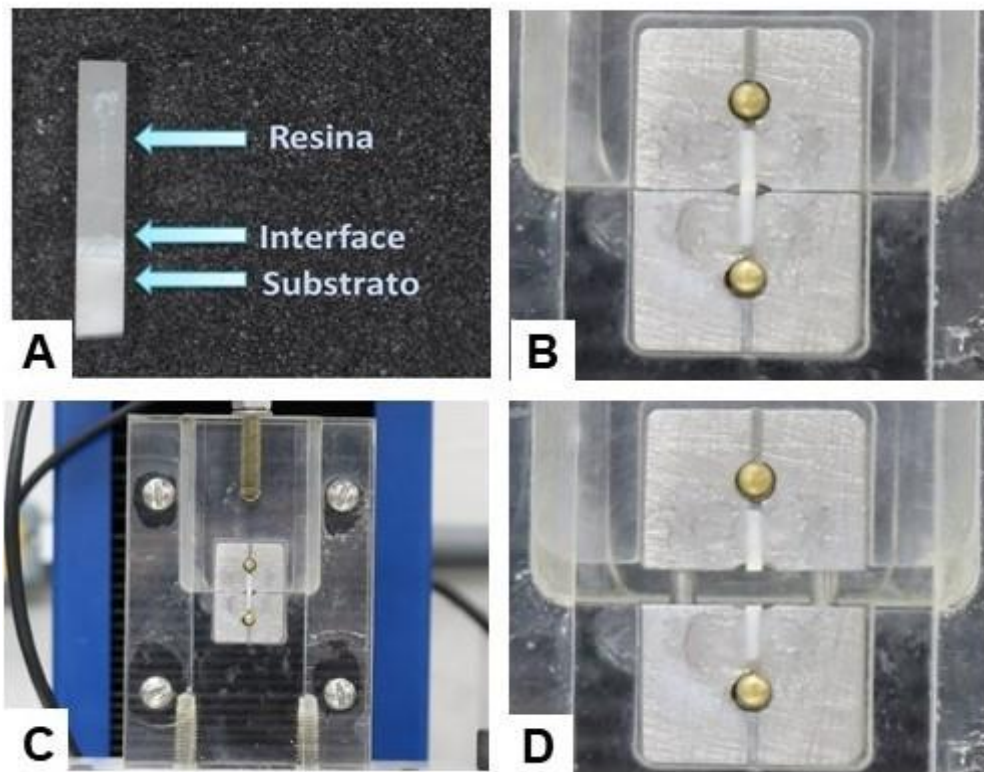
Adesiva – Para fraturas em que a falha ocorreu na interface adesivo-estrutura dental ou na interface entre o adesivo e a resina composta, em mais de 75% da área analisada.

Coesiva em resina – Para fraturas em que a falha ocorreu predominantemente no interior da resina composta, cerca de 75%.

Coesivas na estrutura dental – Para fratura em que a falha ocorreu predominantemente no interior da estrutura dental, cerca de 75%.

Mista – Para fraturas nas quais não existiu uma predominância maior que 75% de qualquer tipo de falha.

Figura 7 – Teste de resistência a microtração



Legenda: a) palito pronto; b) palito fixado no dispositivo de microtração metálico; c) máquina EMIC com a carga de célula; d) palito fraturado após o teste de microtração.
 Fonte: Elaborada pelo autor.

4.10 Grau de conversão

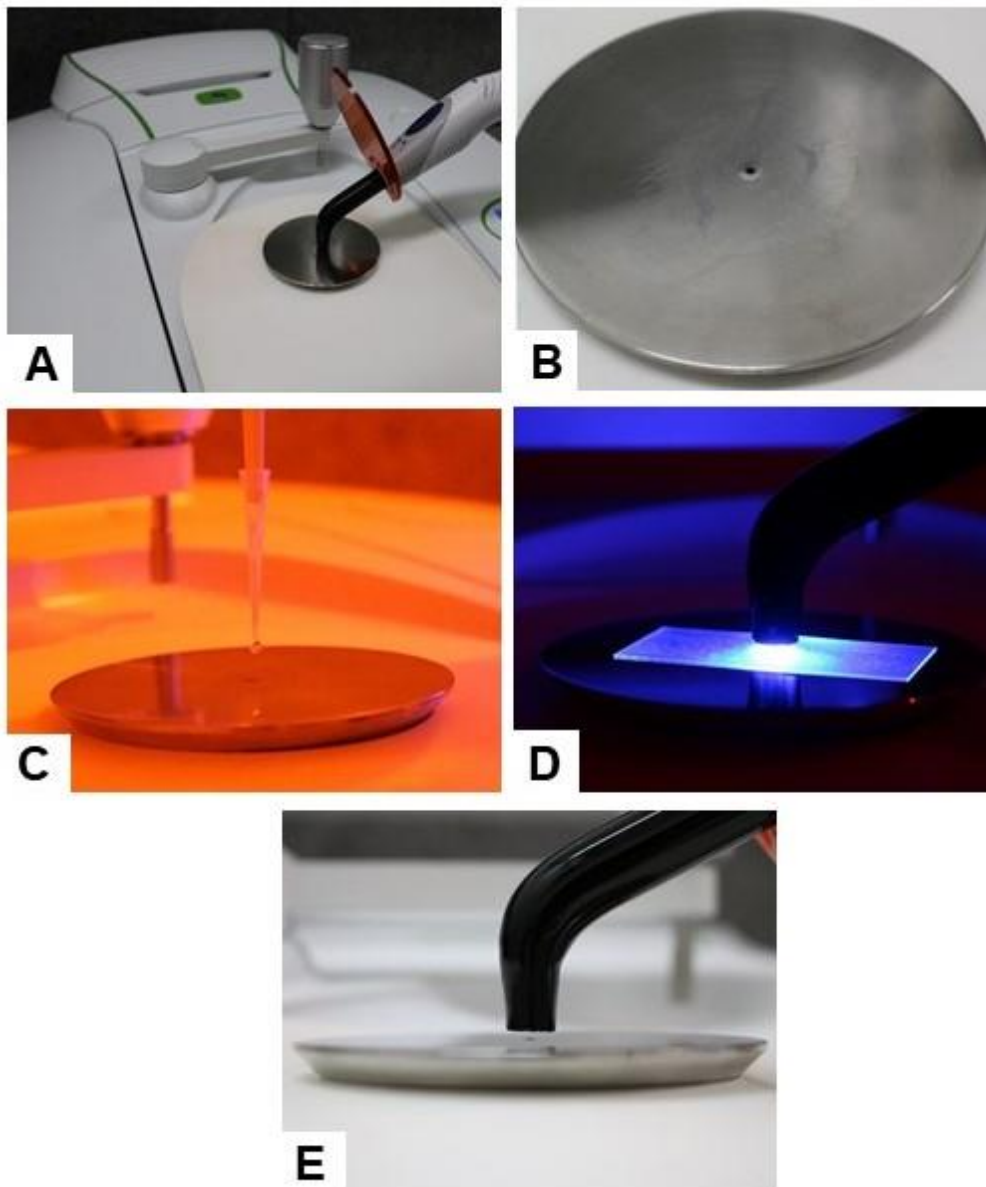
O grau de conversão (GC) foi medido através de Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) (FT-IR, PerkinElmer Spectrum, MA, EUA) (Figura 8A). Será feito em triplicata. As amostras dos sistemas adesivos foram analisadas por meio de absorvância com o dispositivo de refletância total atenuada (ATR) *MIRacle* com placa de cristal de diamante de ZnSe (PIKE Technologies, Madison, WI, EUA) (Figura 8B) com uma resolução de 4 cm^{-1} e faixa de transmissão entre $650 - 4000\text{ cm}^{-1}$. O software utilizado foi o *Spectrum TimeBase* (Perkin Elmer, MA, EUA). Inicialmente, foi colocado sobre o cristal do ATR uma gota de $3\ \mu\text{L}$ o adesivo com auxílio de uma pipeta (LambdaTM Plus, Corning Co., Corning, NY, EUA), quantidade necessária para o adesivo molhar toda a superfície do cristal em ambiente de luz amarela (Figura 8C). A gota do adesivo foi selada com lamínula para microscópio e fita adesiva a fim de evitar a evaporação dos componentes.

Imediatamente, foram coletados os dados de absorvância pelo software utilizando os parâmetros de intervalo de onda de 1560 cm^{-1} a 1760 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 32 capturas. Em seguida, essa mesma amostra de adesivo foi fotoativada com o fotopolimerizador (Aparelho LED; Demi Light Curing System – Kerr Corporation, EUA) com potência de 1200 mW/cm^2 , por um período de 20 segundos (Figura 8D), a uma distância de 2 mm aproximadamente (Figura 5E). Após 20 minutos, os dados foram coletados novamente, gerando os espectros de antes e depois de polymerizados. O processo foi repetido 3 vezes para cada grupo de adesivo, de onde foi obtida a média do grau de conversão.

Para gerar o valor de GC, os espectros foram comparados e analisados na mudança do espectro nas bandas de absorção próximas a 1638cm^{-1} , onde se encontrou a ligação dupla de carbono presente nos grupos metacrilatos polymerizáveis do adesivo. As bandas de absorção associadas ao anel benzênico aromático do BisGMA, que não sofreram grandes alterações antes e depois da polymerização, foram usadas como referência interna de proporcionalidade da matéria (bandas próximas a 1608 cm^{-1}). Por fim, esses valores de cada amostra foram calculados através da fórmula:

$$DC = 1 - \left[\frac{\text{Absorbância da amostra } 1637\text{cm}^{-1} / \text{Absorbância da amostra } 1608\text{cm}^{-1}}{\text{Absorbância do monômero } 1637\text{cm}^{-1} / \text{Absorbância do monômero } 1608\text{cm}^{-1}} \right] \times 100\%$$

Figura 8 – Grau de conversão



Legenda: a) Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR); b) placa de cristal de diamante de ZnSe; c) o adesivo sendo colocado sobre o cristal com auxílio de uma pipeta em luz amarela; d) amostra do adesivo sendo fotoativada com o fotopolimerizador; e) distância do fotopolimerizador de 2 mm aproximadamente.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.11 Atividade antibacteriana

Os testes para avaliar a atividade antibacteriana foram realizados no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba

(Univap) em São José dos Campos, com a supervisão da bióloga Priscila Maria Sarmeyro Correa Marciano Leite.

Streptococcus mutans (ATCC 700610) foi utilizado para avaliação das atividades antibacterianas dos adesivos experimentais contendo as partículas de nisina. O *Streptococcus mutans* foi cultivado aerobicamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 37°C. As bactérias foram cultivadas durante a noite, recolhidas por centrifugação e lavadas três vezes com solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS). As bactérias foram ressuspensas em BHI e diluídas para uma concentração final de $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia (UFC) / mL. A densidade bacteriana foi determinada usando um espectrofotômetro (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN, EUA) a uma densidade óptica de 600 nm.

Figura 9 – Avaliação das atividades antibacterianas



Legenda: a) caldo BHI; b) *Streptococcus mutans*; c) espectrofotômetro.
Fonte: Elaborada pelo autor.

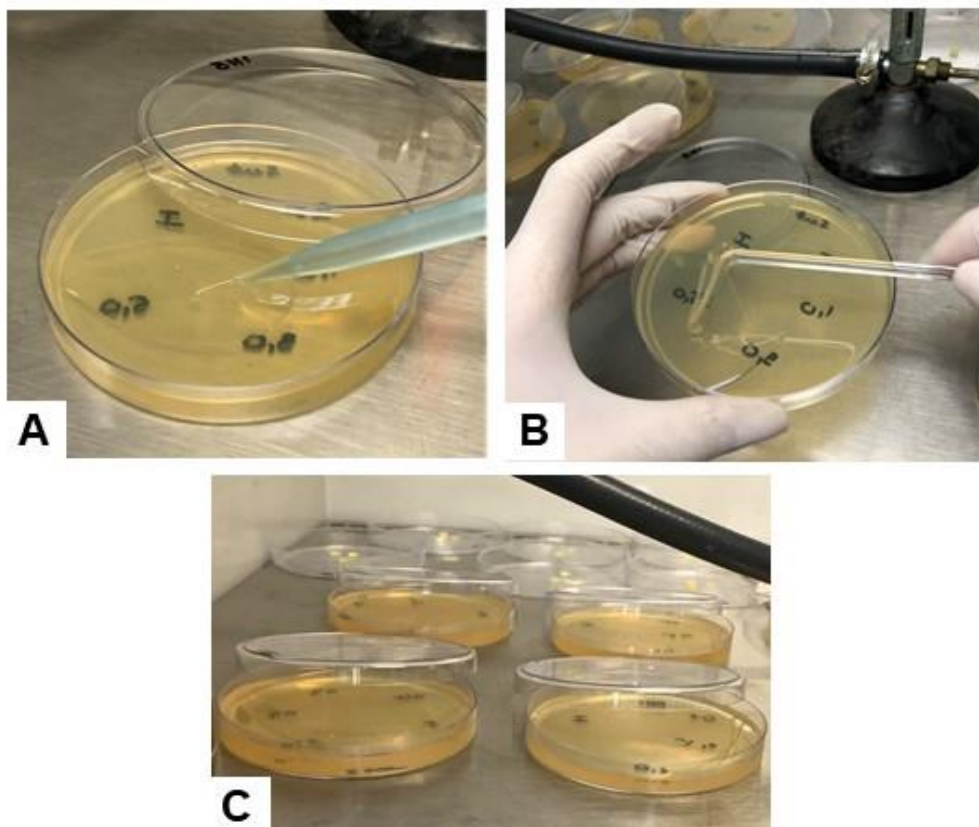
4.11.1 Teste de difusão em ágar

As suspensões bacterianas ($1,0 \times 10^7$ UFC / mL; 100 mL) foram colocadas nas placas de ágar BHI através de uma pipeta (Figura 10A) e foi feito o

espalhamento na placa com uma alça de Drigalski (Figura 10B e 10C). Discos do adesivo fotopolimerizados (6,5 mm de diâmetro; 1,5 mm de espessura) (Figura 11C) foram preparados através de uma matriz de silicone (Figura 11A e 11B) e colocados numa placa de ágar inoculada com bactérias e incubados a 37 °C durante 24 h.

Depois este período, o diâmetro dos halos de inibição foi medido e os resultados analisados de acordo com o preconizado pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute, 2005), onde a formação de halo indica que o microorganismo é sensível ao agente testado e a não formação de halo indica que o microorganismo é resistente ao agente testado. Os testes foram realizados em triplicata.

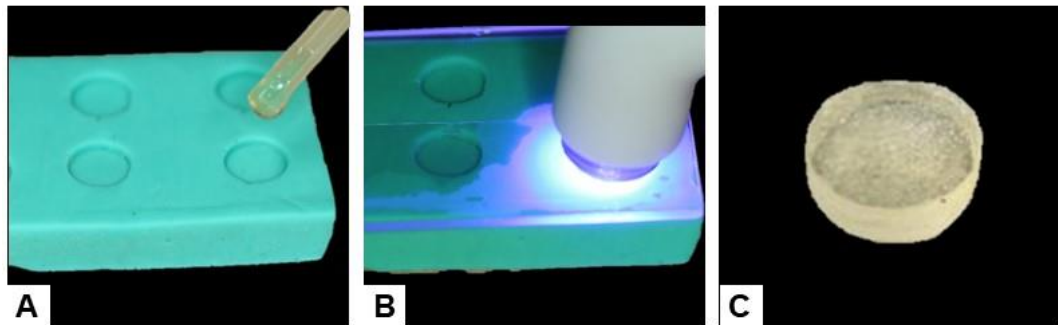
Figura 10 – Teste de difusão em ágar



Legenda: a) suspensões bacterianas sendo colocadas na placa de ágar BHI; b) espalhamento com a alça de Drigalski; c) placas prontas para receberem os discos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 – Preparação dos discos de adesivo



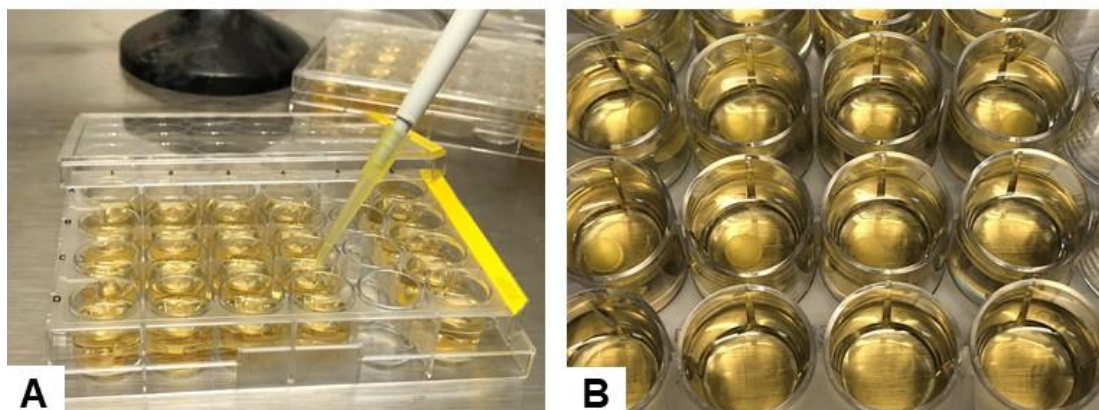
Legenda: a) gota do adesivo na matriz de silicone; b) fotopolimerização do adesivo; c) disco de adesivo fotopolimerizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4. 11.2 Contagem da unidade formadora de colônia (UFC)

Os discos foram transferidos para placas contendo ágar BHI (Figura 12A e 12B). Após o período de incubação uma alíquota de 150 μL do sobrenadante de cada poço foi retirada e levada para leitura de densidade óptica das amostras utilizando o espectrofotômetro (Spectra Count, Packard, USA) com um filtro de 600 nm. A viabilidade bacteriana foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônias e o processo foi feito por três vezes.

Figura 12 – Preparação das placas para UFC



Legenda: a) preparação das placas com ágar BHI; b) placas contendo os discos com as bactérias.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4. 12 Análise ilustrativa por MEV

Para a avaliação em MEV foram utilizadas os discos de adesivo fotopolimerizados, dos diferentes grupos, após terem ficado nas placas de ágar com o *Streptococcus mutans* para análise da presença de bactérias. Os espécimes foram posicionados em 'stubs' de alumínio, cobertos com ouro/paládio (Desk II – Denton Vacuum) e examinados em microscópio eletrônico de varredura (JMS 5310 – Jeol).

5 RESULTADO

5.1 Estatística para resistência de união

Para efeito de análise estatística, foi realizada uma média calculada com os espécimes (palitos) testados para cada dente humano preparado. As médias em MPa foram submetidas à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) e STATISTIX (Analytical Software, version 8.0, 2007).

Os dados de resistência de união (MPa) foram analisados estatisticamente, sendo avaliados quanto à sua normalidade. Como estes apresentaram distribuição normal, realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) paramétrica um fator (sistema adesivo) e o teste de Tukey, sendo adotado o nível de significância de 5% para a tomada de decisões.

Na Tabela 1 encontram-se os valores da estatística descritiva. Os valores de média e desvio-padrão de resistência de união (MPa) obtidos nos 3 grupos estudados.

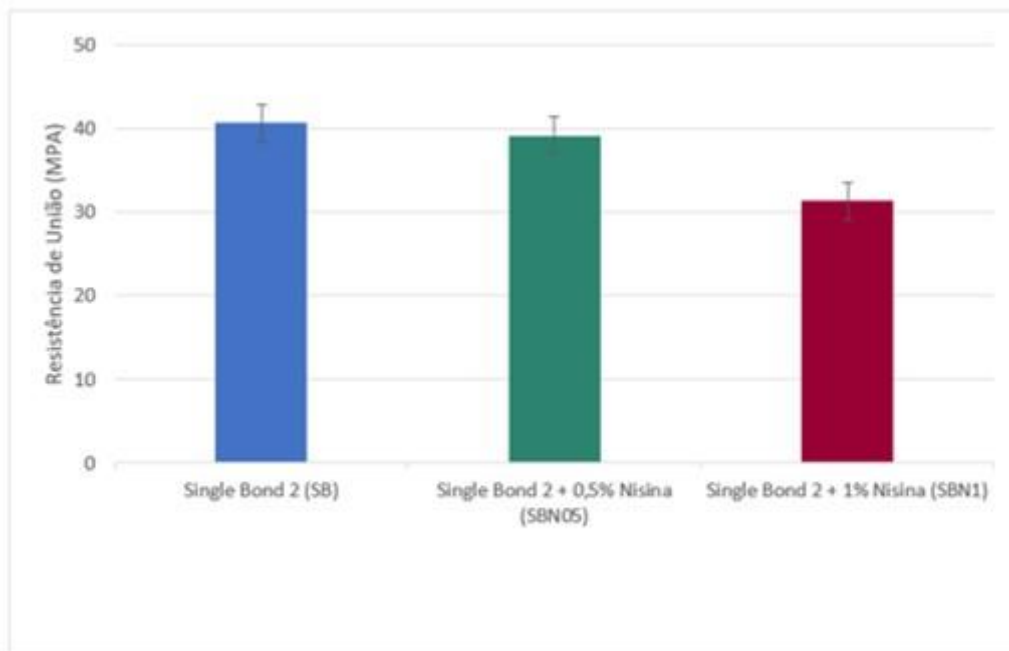
Tabela 1 - Análise descritiva para os diferentes grupos em ordem decrescente quanto à resistência de união (MPa)

Adesivo Comercial	Valores de MPa±Dp
Single Bond 2 (SB)	40,69±2,42
Single Bond 2 + 0,5% Nisina (SBN05)	39,20±2,21
Single Bond 2 + 1% Nisina (SBN1)	31,36±2,47

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 13 apresenta a análise descritiva das médias de resistência de união (MPa) e desvio padrão dos diferentes sistemas adesivos.

Figura 13 – Análise descritiva das médias de resistência de união (MPa) e desvio padrão



Legenda: gráfico das médias e desvio padrão dos diferentes grupos evidenciando as diferenças obtidas entre os sistemas adesivos utilizados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a um fator. Dessa forma observaram-se diferenças estatisticamente significantes para o fator Adesivo, considerando um nível de significância de 5% (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de análise de variância (ANOVA) a um fator para a resistência de união

Fatores	SQ	GL	QM	F	P
Adesivo	41255,91	1	41255,91	5556,74	0,000000*
Interação	501,61	2	250,81	33,78	0,000000*
Resíduo	200,46	27	7,42	---	---

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado médio; (F): razão; (P): valor. *p < 0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Aplicou-se o Teste de Tukey (5%) com a finalidade de observar as diferenças significativas nos fatores avaliados (Tabela 3).

Na Tabela 3 observam-se os resultados do fator Adesivo para o teste de Tukey (5%). Os adesivos com diferentes concentrações de partículas apresentaram média de resistência de união significativamente diferentes na ordem decrescente SB=SBN05>SBN1. De acordo com os resultados obtidos, as maiores médias foram observada no grupo SB 40,69±2,42 e SBN05 39,20±2,21 e a menor média foi observada no grupo SBN1 31,36±2,47, havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 3 – Resultado do Teste de Tukey para a resistência de união

Sistema Adesivo	Valores em MPa±Dp	Grupos Homogêneos
SB	40,69±2,42	A
SBN05	39,20±2,21	A
SBN1	31,36±2,47	B

Legenda: (Dp): desvio-padrão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Estatística para grau de conversão

Na tabela 4 apresentam-se os valores de média e desvio padrão do grau de conversão dos sistemas adesivos dos diferentes grupos deste estudo. De acordo

com os resultados obtidos, a maior média foi observada no grupo SB $83,50 \pm 3,42$, seguido do grupo SBN05 $80,22 \pm 3,68$ e grupo SBN1 $78,44 \pm 0,95$ não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles.

A presença da nisina nas concentrações de 0,5 e 1%, não influenciou no grau de conversão do sistema adesivo.

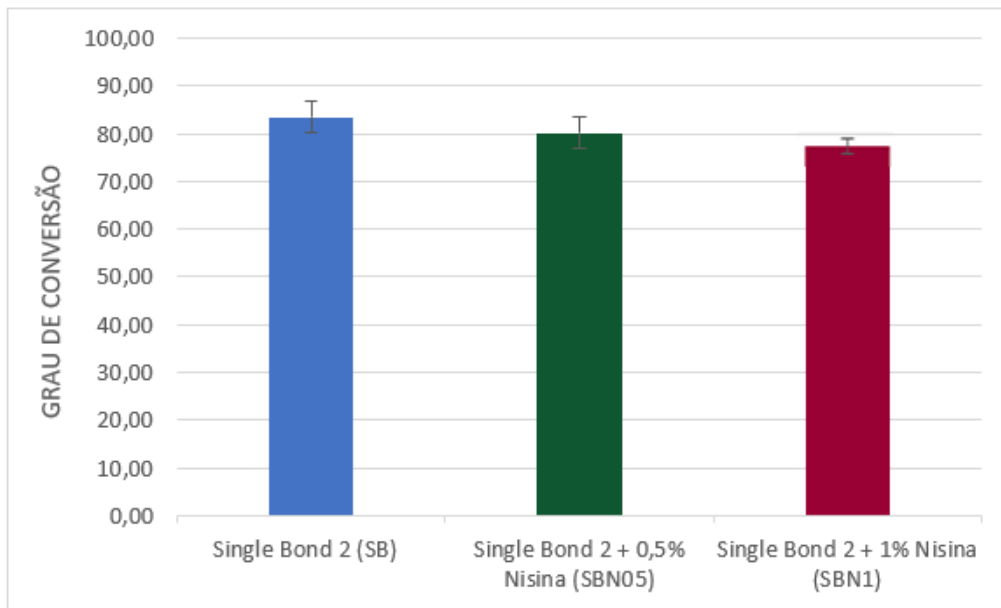
Tabela 4 - Análise descritiva para os diferentes grupos em ordem decrescente quanto ao grau de conversão

Adesivo Comercial	Média±Dp
Single Bond 2 (SB)	83,50±3,42
Single Bond 2 + 0,5% Nisina (SBN05)	80,22±3,68
Single Bond 2 + 1% Nisina (SBN1)	78,44±0,95

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 14 apresenta a análise descritiva das médias e desvio padrão dos diferentes sistemas adesivos para o grau de conversão.

Figura 14 – Análise descritiva das médias de grau de conversão e desvio padrão



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a um fator. Dessa forma não se observaram diferenças estatisticamente significantes, considerando um nível de significância de 5% (Tabela 5).

Tabela 5 – Teste de análise de variância (ANOVA) a um fator para o grau de conversão

Fatores	SQ	GL	QM	F	P
Interação	58638,24	1	58638,24	6737,919	0,000000*
Adesivo	39,59	2	19,79	2,274	0,184017*
Resíduo	52,22	6	8,70	---	---

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado médio; (F): razão; (P): valor. *p < 0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Tabela 6 observam-se os resultados do fator Adesivo para o teste de Tukey (5%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 6 – Resultado do Teste de Tukey para o grau de conversão

Sistema Adesivo	Valores média±Dp	Grupos Homogêneos
SB	83,50±3,42	A
SBN05	80,22±3,68	A
SBN1	78,44±0,95	A

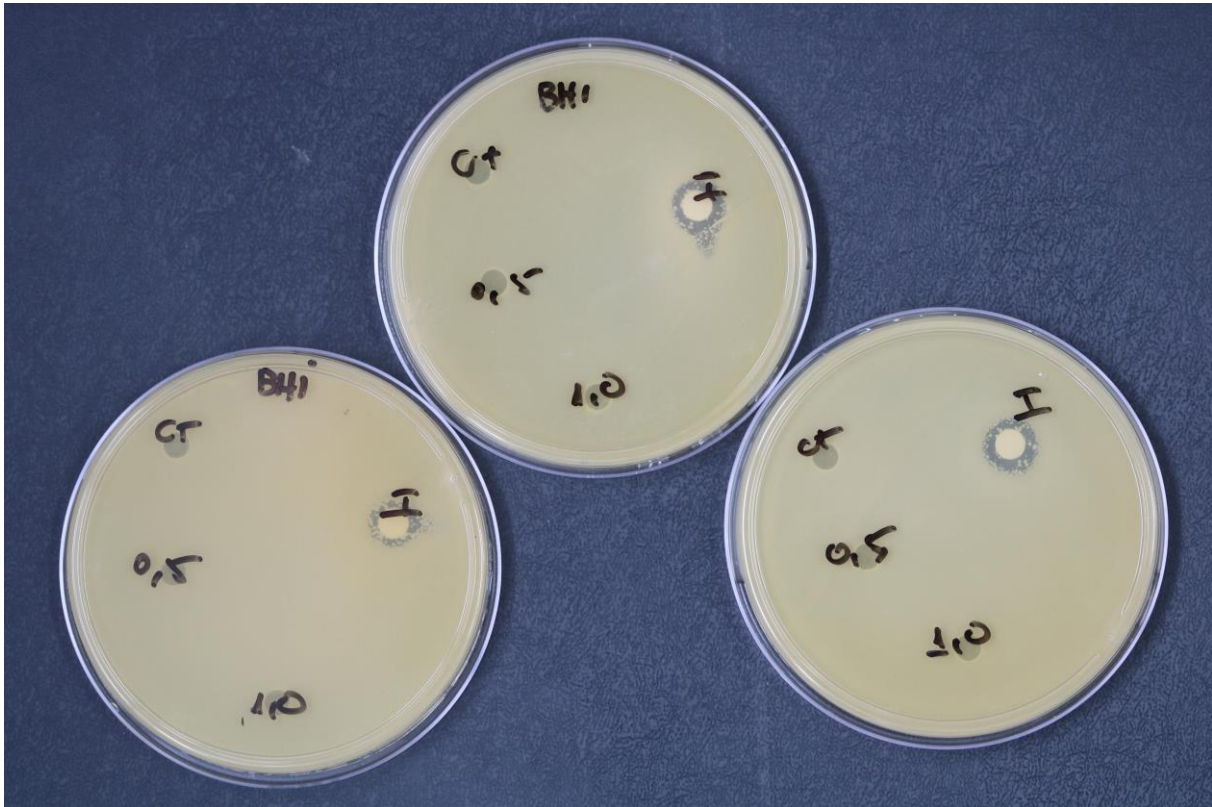
Legenda: (Dp): desvio-padrão.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Estatística da atividade antibacteriana

5.3.1 Difusão em ágar

A figura 15 apresenta a análise ilustrativa do teste de difusão em ágar, não foi observada a formação de áreas de inibição bacteriana nos diferentes grupos, somente no grupo controle de iodo. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 15 – Análise ilustrativa do teste de difusão em ágar



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.2 Unidade formadora de colônia (UFC)

Na tabela 7 apresentam-se os valores de média e desvio padrão da atividade antibacteriana quanto a unidade formadora de colônia (UFC) dos sistemas adesivos com as partículas em diferentes concentrações empregados neste estudo. Os testes foram realizados em triplicata.

De acordo com os resultados obtidos, a maior média foi observada no grupo SB $0,51 \pm 0,02$, seguido dos grupos SBN1 $0,36 \pm 0,03$ e o grupo SBN05 $0,30 \pm 0,04$, havendo diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos com a adição da nisina, demonstrando que a presença de nisina, diminuiu a quantidade de unidades formadoras de colônia na superfície do adesivo. O grupo CM $0,06 \pm 0,002$ apresentou a menor média, por ser um grupo controle do meio, isto é, não havia a presença de *S.mutans* neste grupo.

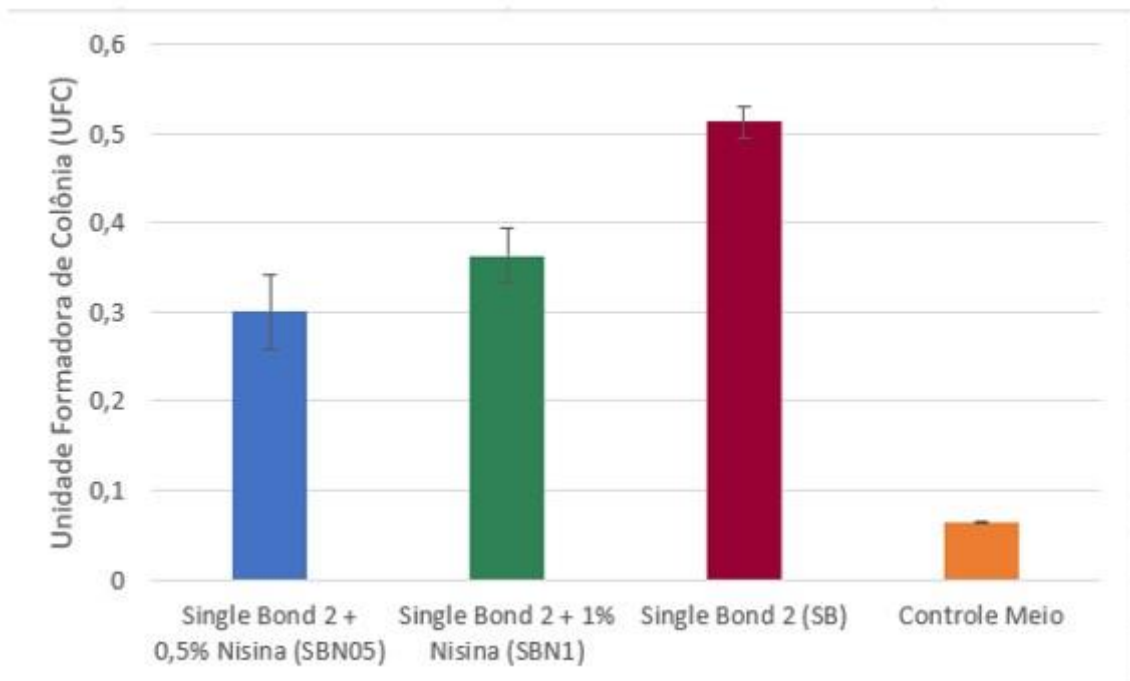
Tabela 7 - Análise descritiva para os diferentes grupos em ordem decrescente quanto à atividade antibacteriana (UFC)

Adesivo Comercial	Média±Dp
SB	0,51±0,02
SBN1	0,36±0,03
SBN05	0,30±0,04
Controle meio	0,064±0,002

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 16 apresenta a análise descritiva das médias e desvio padrão dos diferentes sistemas adesivos.

Figura 16 – Análise descritiva das médias de UFC e desvio padrão



Legenda: gráfico das médias e desvio padrão dos diferentes grupos evidenciando as diferenças obtidas entre os sistemas adesivos utilizados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a um fator. Dessa forma se observaram diferenças estatisticamente significantes para o fator Adesivo, considerando um nível de significância de 5% (Tabela 8).

Tabela 8 – Teste de análise de variância (ANOVA) a um fator para UFC

Fatores	SQ	GL	QM	F	P
Adesivo	1,154440	1	1,154440	1544,058	0,000000*
Interação	0,313988	3	0,104663	139,986	0,000000*
Resíduo	0,005981	8	0,000748	---	---

Legenda: (GL): grau de liberdade; (SQ): soma dos quadrados; (QM): quadrado médio; (F): razão; (P): valor. *p < 0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Aplicou-se o Teste de Tukey (5%) com a finalidade de observar as diferenças significativas nos fatores avaliados (Tabela 9).

Na Tabela 9 observam-se os resultados do fator Adesivo para o teste de Tukey (5%). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde o grupo sem adição de nisina (SB), apresentou os maiores valores. Os grupos com 0,5% de partículas (SBN05), e 1% de nisina (SBN1) apresentaram diminuição de unidade formadoras de colônia e o grupo controle do meio a menor média.

Tabela 9 – Resultado do Teste de Tukey para UFC

Sistema Adesivo	Valores em MPa±Dp	Grupos Homogêneos
SB	0,51±0,02	A
SBN05	0,30±0,04	B
SBN1	0,36±0,03	B
Controle meio	0,064±0,002	C

Legenda: (Dp): desvio-padrão.

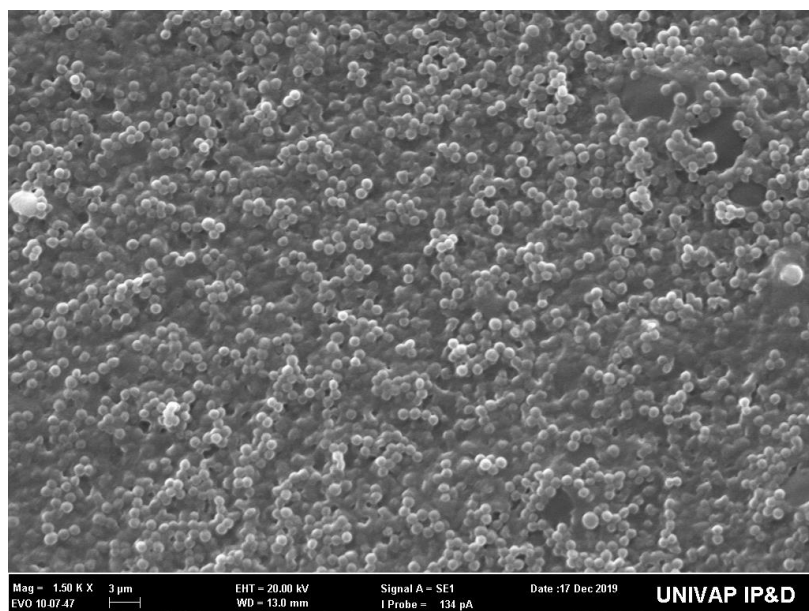
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.3 Análise ilustrativa por MEV

As imagens obtidas pelo MEV dos discos de adesivo fotopolimerizados seguem abaixo com aumento de 2500x e 15, 20 ou 25 KV de potência.

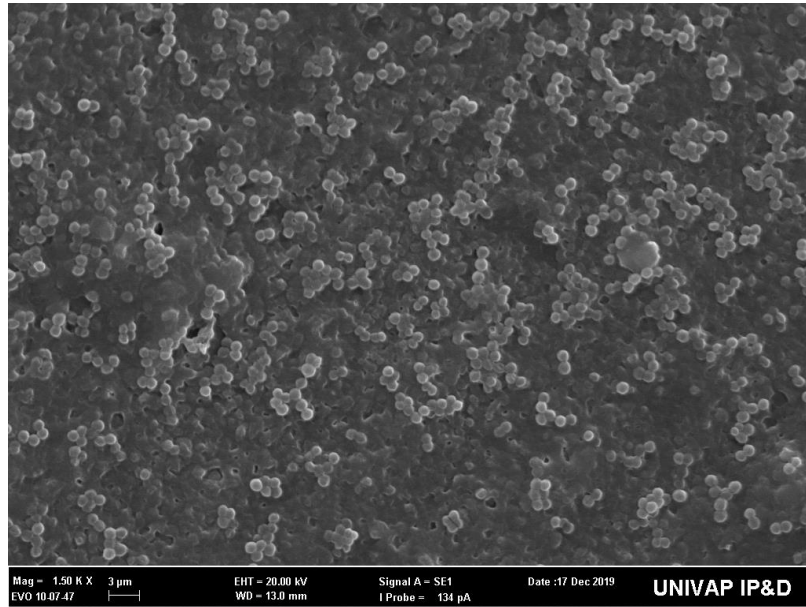
As figuras 17, 18, 19 e 20 apresentam a fotomicrografia de MEV dos discos de adesivo dos diferentes grupos, observa-se a presença de *Streptococcus mutans*, porém não é possível identificar neste momento, a viabilidade dessas bactérias.

Figura 17 – Fotomicrografia de MEV da superfície do disco de adesivo do grupo SB



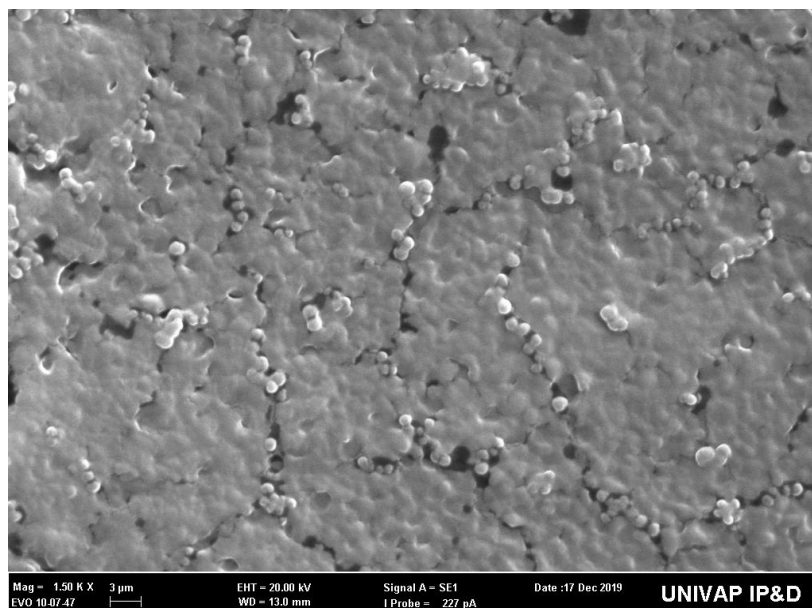
Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do disco de adesivo do grupo SB
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 – Fotomicrografia de MEV da superfície do disco de adesivo do grupo SBN05



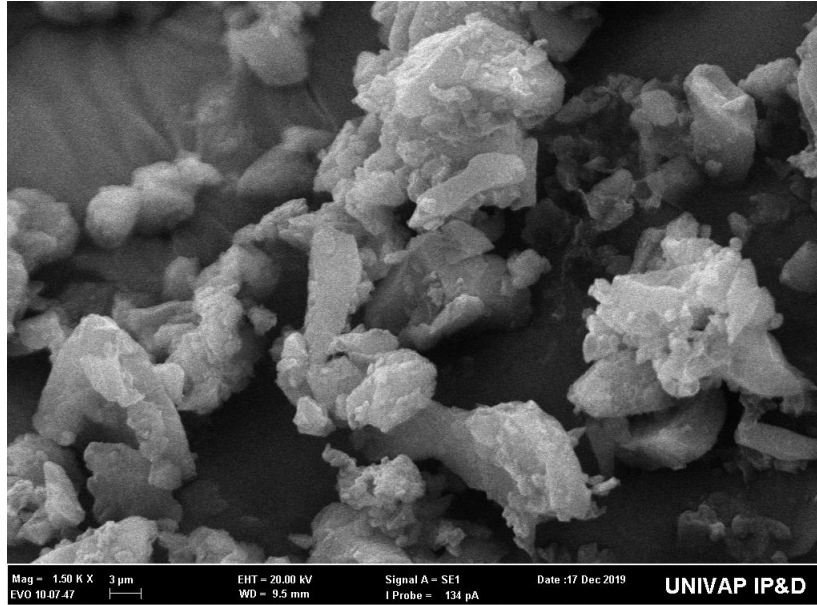
Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do disco de adesivo do grupo SBN05
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 – Fotomicrografia de MEV da superfície do disco de adesivo do grupo SBN1



Legenda: Fotomicrografia de MEV da superfície do disco de adesivo do grupo SBN1
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 – Fotomicrografia de MEV das partículas de nisina no aumento de 1000x



Legenda: Partículas de nisina
Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão dos resultados

Este estudo teve como objetivo avaliar as propriedades de um sistema adesivo modificado com a incorporação de nisina (Handary, Belgium) em duas diferentes concentrações (0,5 e 1%).

Os adesivos destinados ao uso clínico requerem uma força de adesão considerável à dentina, para evitar que as restaurações não retentivas se desloquem durante a função. O teste utilizado para avaliar as propriedades físico-mecânica do adesivo foi o de resistência de união, pois é o teste mais importante quando se trata das propriedades de um adesivo, o qual se obtido um resultado desfavorável, os resultados de outros testes não terão valor, pois é necessária uma união efetiva e duradoura entre os materiais restauradores e a estrutura dentária.

A adição de agentes antibacterianos pode alterar a forma física da matriz de resina polimerizada, resultando na redução das propriedades físicas. No presente estudo, a incorporação de 0,5% de nisina na mistura de resina experimental não teve efeito adverso na capacidade de adesão à dentina. Porém a incorporação de 1% de partículas apresentou resultados de resistência de união inferiores em relação ao grupo controle e grupo de 0,5%, rejeitando parcialmente a hipótese H01 testada.

Su et al. (2018) publicaram um estudo com o objetivo de avaliar as propriedades de um adesivo com nisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Porém, diferente do presente estudo, os pesquisadores utilizaram diferentes concentrações (1%,3% e 5%), onde um dos testes era de resistência de união, e nele o grupo de nisina a 1% não exibiu uma diferença significativa ($P > 0,05$), enquanto os grupos de nisina a 3% e 5% apresentaram diminuição da força de união ($P < 0,05$).

Recentemente, Zhao et al. (2020), com a finalidade de aumentar a atividade antibacteriana de um adesivo universal, adicionou o peptídeo antimicrobiano nisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nas quantidades de 1%, 2% e 3%, incorporado em Single Bond Universal e seus efeitos foram estudados. A força de união de adesivos com incorporação de nisina foi testada usando microtração. Para os grupos

de nisina de 1–3%, a força de união não diminuiu significativamente em comparação ao grupo controle ($P > 0,05$).

No presente estudo, o adesivo incorporado com 1% de nisina demonstrou diminuição quanto a resistência de união, diferente dos estudos citados acima. Quando a concentração foi diminuída para 0,5%, não houve diferença significativa na resistência de união, entretanto a nisina utilizada no presente estudo é da Handary, a qual é uma nisina pura, diferente da nisina da Sigma, a qual é dissolvida em cloreto de sódio, o que pode explicar as diferenças entre os resultados dos estudos.

Zhao et al. (2020), também testou o grau de conversão em seu estudo, onde obteve como resultado para o controle, 1%, 2% e 3% foram $47,52 \pm 0,82\%$, $58,99 \pm 0,93\%$, $41,54 \pm 0,95\%$ e $36,84 \pm 0,52\%$, respectivamente. Eles consideraram que a concentração de nisina dentro de 3% tem pouco efeito sobre o valor do grau de conversão.

Esse resultado também foi visto no presente estudo, pois os resultados em relação ao grau de conversão, demonstraram que a incorporação das duas diferentes concentrações (0,5 e 1%), não interferiram nos valores de grau de conversão, não demonstrando resultados estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle, aceitando a hipótese H02 testada.

Portanto as diferentes concentrações da nisina, incorporadas no sistema adesivo, presentes nos grupos estudados não demonstraram interferir de maneira significativa nos resultados de grau de conversão. A não interferência no grau de conversão representa um resultado favorável. O teste de grau de conversão é um teste de extrema importância em um trabalho sobre adesão, pois para que se obtenha adequadas propriedades físico-químicas de um material adesivo, é necessário que haja um alto grau de conversão dos monômeros em polímeros, produzindo propriedades mecânicas favoráveis e reduzindo a degradação dos polímeros, aumentando o sucesso dos procedimentos restauradores adesivos.

Streptococcus mutans é um patógeno oral cariogênico associados à cárie secundária. Essa bactéria foi usada para avaliar as propriedades antibacterianas de adesivos experimentais contendo nisina. Os compostos de nisina são uma classe importante de agentes antibacterianos que possuem propriedades de atividade por contato. Os resultados do teste de difusão em ágar confirmaram ainda mais este mecanismo de morte por contato. Os agentes antimicrobianos que erradicam as

bactérias via difusão geralmente produzem zonas de inibição relativamente grandes em torno do material testado. As zonas de inibição produzidas pelos adesivos contendo nisina não eram perceptíveis, porém pode se notar que não houve crescimento na superfície dos discos do adesivo, o que está em acordo com o trabalho de Su et al. (2018), onde não foram encontradas diferenças significativas nesse teste, para os adesivos com incorporação de nisina em comparação com o grupo controle, aceitando a hipótese H03.

No teste de unidades formadoras de colônias, a hipótese H04 testada foi rejeitada, pois foi demonstrado no teste que a incorporação de 0,5% e 1% de partículas nos discos de adesivo, reduziu significativamente as bactérias viáveis nos biofilmes, em comparação com os discos sem nisina.

No trabalho de Zhao et al. (2020), ele encontrou como resultado o Single Bond Universal incorporado com nisina, diminuiu a unidade formadoras de colônias ao aumentar a porcentagem de nisina no adesivo, porém apenas o adesivo incorporado com 3% de nisina, pode inibir significativamente o crescimento dos biofilmes monoespecíficos de *S. mutans* ($P < 0,01$), diferente do presente estudo, onde na porcentagem de 0,5% e 1% houve diferença significante.

As imagens obtidas pelo MEV, demonstraram a presença das bactérias *S. mutans* em todos os grupos, porém as imagens não indicam a viabilidade das bactérias, isso pode ser analisado através do teste de unidades formadoras de colônias, como já foi citado.

Estudos futuros são necessários para avaliar a incorporação de nisina no sistema adesivo, bem como sua concentração ideal, no entanto, o presente estudo deixa claro que a nisina (Handary, Belgium) incorporada no sistema adesivo apresentaram atividades antibacterianas no teste de unidades formadoras de colônias (UFC), não alteraram o grau de conversão do material e também não alteraram a resistência de união no adesivo de 0,5%.

Embora os resultados obtidos por este estudo não possam ser diretamente utilizados em uma situação clínica, podemos sugeri-lo para o desenvolvimento de novas estratégias a fim de manter o grau de conversão e a resistência de união da interface adesiva ao longo do tempo, aumentando assim a durabilidade das restaurações adesivas, além de contribuir com a atividade antibacteriana, sendo um indicador para novas pesquisas sobre o assunto.

7 CONCLUSÃO

Segundo os resultados obtidos neste estudo, a incorporação de nisina (Handary, Belgium) no sistema adesivo:

- A nisina na concentração de 0,5%, não interferiu na resistência de união;
- Nas diferentes concentrações, não interferiu no grau de conversão;
- Não houve formação de halo de inibição nas diferentes concentrações;
- Possuiu atividade antibacteriana, no teste de unidade formadora de colônia (UFC), reduzindo a viabilidade do *Streptococcus mutans* em ambas concentrações.

REFERÊNCIAS*

- Buchman GW, Banerjee S, Hansen JN. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem*. 1988;263(31):16260–6. PMID: 3141403.
- Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955;34(6):849–53. doi: 10.1177/00220345550340060801. PMID: 3656367.
- Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, et al. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90(1):373–80. doi: 10.1002/jbmr.548.Cell.
- Elderton RJ. Preventive (evidence-based) approach to quality general dental care. *Med Princ Pract*. 2003;12(SUPPL. 1):12–21. doi: 10.1159/000069841. PMID: 12707497.
- Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new adhesive restorative resin. *J Dent Res*. 1979;58(4):1364–70. doi: 10.1177/00220345790580041101. PMID: 372267.
- Garcia I. NIDCR' s 2009 – 2013 Strategic Plan. *J Dent Hyg*. 2009;83(4):153–4.
- Gou Y ping, Meghil MM, Pucci CR, Breschi L, Pashley DH, Cutler CW, et al. Optimizing resin-dentin bond stability using a bioactive adhesive with concomitant antibacterial properties and anti-proteolytic activities. *Acta Biomater*. 2018;75:171–82. doi: 10.1016/j.actbio.2018.06.008. PMID: 29883811.
- Heunis TDJ, Smith C, Dicks LMT. Evaluation of a nisin-eluting nanofiber scaffold to treat staphylococcus aureus-induced skin infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3928–35. doi: 10.1128/aac.00622-13.
- Huang B, Cvitkovitch DG, Santerre JP, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces is dependent on the restorative material, mode of adhesion and a combined effects of esterase and mmp inhibition. *Dent Mater*. 2018:1–10. doi: 10.1016/j.dental.2018.05.008.
- Jacker-Guhr S, Sander J, Luehrs AK. How “universal” is adhesion? Shear bond strength of multi-mode adhesives to enamel and dentin. *J Adhes Dent*. 2019;21(1):87–95. doi: 10.3290/j.jad.a41974. PMID: 30799475.
- Kamarajan P, Hayami T, Matte B, Liu Y, Danciu T, Ramamoorthy A, et al. Nisin ZP, a bacteriocin and food preservative, inhibits head and neck cancer tumorigenesis and prolongs survival. *PLoS One*. 2015;10(7):1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0131008.

Kose C, Reis A, Perdigão J. Aplicação de um novo sistema adesivo universal - relato de caso. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, 2013;67(3):202-6.

Le Lay C, Akerey B, Fliss I, Subirade M, Rouabhia M. Nisin Z inhibits the growth of *Candida albicans* and its transition from blastospore to hyphal form. *J Appl Microbiol*. 2008;105(5):1630–9. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03908.x.

Nakabayashi N, Kojima K, Matsuhara E. Promotion of adhesion by infiltration monomers into tooth substrates. *J Biomed Mat Res*. 1982;16:265–73.

Pashley DH. Clinical correlations of dentin structure and function. *J Prosthet Dent*. 1991;66(6):777–81. doi: 10.1016/0022-3913(91)90414-R. PMID: 1805028.

Pepperney A, Chikindas ML. Antibacterial peptides: opportunities for the prevention and treatment of dental caries. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2011;3(2):68–96. doi: 10.1007/s12602-011-9076-5.

Perdigão J. Dentin bonding-Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater*. 2010;26(2):24–37. doi: 10.1016/j.dental.2009.11.149. PMID: 20005565.

Perdigão J, Araujo E, Ramos RQ, Gomes G, Pizzolotto L. Adhesive dentistry: Current concepts and clinical considerations. *J Esthet Restor Dent*. 2021;33(1):51–68. doi: 10.1111/jerd.12692. PMID: 33264490.

Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: A comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013;25(4):219–41. doi: 10.1111/jerd.12016. PMID: 23910180.

Pucci CR, Gu LS, Zhang H yun, Song Q, Xia VW, Davis LB, et al. Water-associated attributes in the contemporary dentin bonding milieu. *J Dent*. 2018 Jul;74:79-89. doi: 10.1016/j.jdent.2018.04.016.

Ruschel VC, Shibata S, Stolf SC, Chung Y, Baratieri LN, Heymann HO, et al. Eighteen-month clinical study of universal adhesives in noncarious cervical lesions. *Oper Dent*. 2018;43(3):241–9. doi: 10.2341/16-320-C. PMID: 29676975.

Shin JM, Ateia I, Paulus JR, Liu H, Fenno JC, Rickard AH, et al. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Front Microbiol*. 2015 Jun 18;6:617. doi: 10.3389/fmicb.2015.00617.

Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol*. 2016;120(6):1449–65. doi: 10.1111/jam.13033. PMID: 26678028.

Spencer P, Ye Q, Park J, Topp EM, Misra A, Marangos O, et al. Adhesive/dentin

interface: The weak link in the composite restoration. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(6):1989–2003. doi: 10.1007/s10439-010-9969-6. PMID: 20195761.

van Staden ADP, Heunis T, Smith C, Deane S, Dicks LMT. Efficacy of lantibiotic treatment of staphylococcus aureus-induced skin infections, monitored by in vivo bioluminescent imaging. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(7):3948–55. doi: 10.1128/aac.02938-15.

Su M, Yao S, Gu L, Huang Z, Mai S. Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. *Peptides.* 2018;99:189-94. doi: 10.1016/j.peptides.2017.10.003.

Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides.* 2010;31(11):2003–8. doi: 10.1016/j.peptides.2010.07.016.

Tong Z, Zhou L, Jiang W, Kuang R, Li J, Tao R, et al. An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides.* 2011;32(10):2021–6. doi: 10.1016/j.peptides.2011.09.002. PMID: 21930172.

Turner SR, Love RM, Lyons KM. An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *Int Endod J.* 2004;37(10):664–71. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00846.x.

Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent.* 1998;26(1):1–20. doi: 10.1016/S0300-5712(96)00070-X. PMID: 9479920.

Zhao M, Qu Y, Liu J, Mai S, Gu L. A universal adhesive incorporating antimicrobial peptide nisin: effects on *Streptococcus mutans* and saliva-derived multispecies biofilms. *Odontology.* 2020;108(3):376–85. doi: 10.1007/s10266-019-00478-8. PMID: 31912370.

ANEXO A - 1ª folha do Certificado do Comitê de Ética

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS
CAMPOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA ADESIVO BIOATIVO APRESENTANDO MONÔMEROS FUNCIONALIZADOS COM ANTIBACTERIANO PEPTÍDICO.

Pesquisador: CESAR ROGERIO PUCCI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 17729519.5.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.515.576

Apresentação do Projeto:

O estudo será desenvolver um sistema adesivo com os monômeros funcionalizados por um antibacteriano peptídico em diferentes concentrações da nisina pura, a qual é amplamente utilizada para conservação de alimentos. Serão utilizados 90 molares humanos desgastados até a exposição da dentina de média profundidade, obtidos de molares humanos higidos

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo será desenvolver um sistema adesivo com os monômeros funcionalizados por um antibacteriano peptídico em diferentes concentrações da nisina pura, a qual é amplamente utilizada para conservação de alimentos. Serão avaliados o grau de conversão, a permeabilidade da camada híbrida, atividade enzimática por zimografia in situ, o teste de difusão ágar e a resistência de união da interface adesiva

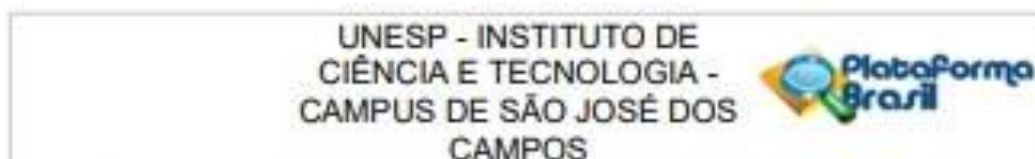
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos diretos a pacientes, pois serão utilizados dentes já extraídos, podendo em sua manipulação sofrer quebra ou perda da espécime

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São César **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** cep@icj@unesp.br

ANEXO B – 2ª folha do Certificado do Comitê de Ética



Continuação do Parecer: 3.315.579

Benefícios:

Se o adesivo corresponder a expectativa, haverá uma melhora no tempo de vida da restauração e será evitado uma maior incidência de cárie

secundária

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O propósito da pesquisa, se alcançado, beneficiará os pacientes quanto a durabilidade das restaurações em resinas compostas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados termos de cessão de material biológico.(dentes)

Recomendações:

Metodologia - observar na divisão dos grupos experimentais: nove (9), cinco (5), mas lendo o texto aparecem oito (8).

Abera o Propósito Principal do Estudo (OMS): de clínico para outros -> laboratorial

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nê

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

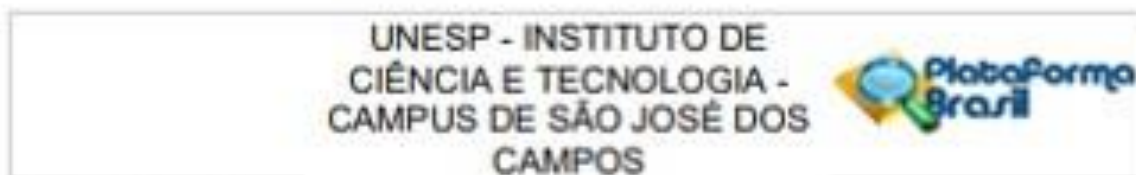
O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1379790.pdf	14/06/2019 14:59:41		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	14/06/2019 14:59:22	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
 Bairro: Jardim São Dias CEP: 12.245-000
 UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
 Telefone: (12)3947-9079 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph.ict@unesp.br

ANEXO C – 3ª folha do Certificado do Comitê de Ética



Continuação do Parecer: 2.516.076

Outros	termo_cessao.pdf	14/06/2019 14:53:41	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito
Outros	metodologia.docx	14/06/2019 14:53:29	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	14/06/2019 14:53:08	CESAR ROGERIO PUCCI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Damas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@icct@unesp.br