

JULIANA OLIVEIRA GONDIM

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SISTEMAS ADESIVOS
DENTINÁRIOS AUTOCONDICIONANTES SOBRE
BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Elisa Maria Aparecida Giro

Araraquara

2006

JULIANA OLIVEIRA GONDIM

**Atividade antibacteriana de sistemas adesivos autocondicionantes
sobre bactérias cariogênicas**

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

2^o Examinador: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

3^o Examinador: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Puppim Rontani

DADOS CURRICULARES

JULIANA OLIVEIRA GONDIM

Nascimento 12/08/1977, Fortaleza, CE

Filiação Maria Anita Oliveira Gondim

Francisco Átila de Lira Gondim

1998 a 2002 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Farmácia,

Odontologia e Enfermagem – FFOE - UFC

2002 a 2004 Especialização em Odontopediatria pela Associação Brasileira de

Odontologia – Secção Ceará – ABO – CE

2002 a 2004 Professora Substituta de Odontopediatria – Faculdade de

Farmácia, Odontologia e Enfermagem - Universidade Federal do
Ceará

2005 a 2006 Curso de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de

Concentração Odontopediatria, nível Mestrado da Faculdade de
Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

A **Deus** que me proporcionou saúde, tranquilidade, paciência e força, por toda a vida, imprescindível para o cumprimento desta caminhada e êxito neste trabalho.

Aos meus queridos pais, **Átila** e **Anita**, pelo amor, carinho, compreensão e sacrifícios dispensados para que eu chegasse até aqui. Vocês são os responsáveis por todas as minhas conquistas. Tenho muito a agradecer pelo incentivo e pela confiança que depositaram em mim.

Às minhas irmãs, **Janaina** e **Viviane**, e ao meu irmão, **Roger**, por todo carinho, alegria e compreensão. Agradeço por estarem sempre presentes e dispostos a me ajudar.

À minha sobrinha afilhada **Sophia**, a mais nova integrante, que trouxe muita paz, alegria e harmonia para a nossa família.

Ao meu amor e namorado, **Jeová**, por toda compreensão, carinho, paciência, amor e confiança. Obrigada por ter sido e continuar sendo meu porto seguro, em toda hora, independente da situação. Agradeço a Deus por você estar em minha vida.

Agradecimentos Especiais

À minha querida orientadora, **Profa. Elisa**, um exemplo de sabedoria, dedicação, honestidade e humildade. Grande parte do que sou hoje, devo muito a você. Obrigada por toda amizade, carinho, paciência e conhecimento transmitido. Uma pessoa fundamental para o meu crescimento.

À amiga **Cris Duque**, por toda amizade, atenção, dedicação e participação ativa neste trabalho. Obrigada por todos os momentos compartilhados. Pena que a maioria tenha sido em situações científicas, mas é uma amizade que quero que dure para sempre.

À **Profa. Josimeri Hebling** pelo apoio e atenção durante esse período de convivência, sempre disposta a ajudar em minha dissertação.

Ao **Prof. Ricardo Marins de Carvalho** e ao Departamento de Dentística Restauradora da Faculdade de Odontologia de Bauru, pelo auxílio e orientação na utilização do dispositivo para medição da permeabilidade dos discos de dentina.

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, representados pela digníssima Diretora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérice Marcantonio e pelo Vice-Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representados pelo Chefe de Departamento Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon e pelo Vice-Chefe Profa. Lídia Parsekian Martins.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

À Coordenação da Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representadas pelos professores Rita de Cássia Loiola Cordeiro e Dirceu Barnabé Ravelli.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Denise Spolidorio, por ter permitido a realização deste trabalho no Laboratório de Microbiologia desta Faculdade.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela doação de microrganismos para realização deste trabalho (*Streptococcus mutans*).

Às minhas queridas amigas de turma do mestrado pela amizade, união de turma e ótimo convívio: Cármen, Michele, Nancy e Simone. Sempre uma disposta a ajudar a outra. Obrigada pela amizade de vocês. Que esta amizade seja eterna.

À professora Josimeri e ao Prof. Carlos Alberto por todo incentivo e auxílio para realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Márcia, Clarice, Natércia, Patrícia, Tácio, Tchoco, Wagner, que sempre torceram pelo meu sucesso e que mesmo à distância nossa amizade se mantém muito forte.

À querida amiga Ana Maria, companheira de casa, sala e cozinha. Amiga para todas as horas. Obrigada pelo excelente convívio e por toda amizade.

À querida Savana. Amiga, obrigada pelo carinho e por toda amizade.

À amiga Paula Jacques, por todo apoio, carinho, amizade e por continuar, mesmo à distância, torcendo pelo meu sucesso.

À amiga Célia Lanza, por toda atenção, amizade e momentos de descontração. Obrigada por ter me auxiliado e ajudado com o Flodec em Bauru.

À Safira, por ter me auxiliado na utilização do aparelho para leitura da permeabilidade dos discos de dentina – Flodec.

Aos meus amigos de Pós-Graduação: Célia, Cris Motsuki, Paula, Andreza, Emi, Érika, Fábio, Fernanda, Hermes, Jonas, Júnia, Luciana, Murilo, Ana Luiza, Camila, Érica, Indri, Laine, Lícia, Adriano, Débora, Luís Guilherme, Helder, Luana, Rafael, Renata, Savana.

Aos estagiários da Odontopediatria: Renata, Cíntia, Juliana, Rodrigo.

Aos amigos de laboratório pelos momentos de alegria e de estresse que vivenciamos: Paulinha, Lívia, Ewerton, Ju Ricco, Mari, Isis, Flávia, Tati, Célia, Nancy, Luciana, Patrícia, Andreza, Fernanda, Adriano, Kina, Murilo, Daniela.

Às técnicas do laboratório de Microbiologia por toda ajuda, carinho, paciência, amizade e atenção, Carina, Juliana e Sônia.

Aos funcionários da biblioteca por todo carinho e por estarem sempre dispostos a ajudar: Adriano, Ceres, Eliane, Maria Helena, Maria Inês, Maria José, Marley, Odete e Silvia.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP por estarem sempre nos ajudando, Celinha, Soninha, Dulce, Totó, Pedrinho, Silvia, Odete.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP por estarem sempre, com toda paciência, nos orientando, Mara, Alexandre, Sylvia, Rosângela e Flávia.

A todos os professores e funcionários desta Faculdade pela atenção.

A todos aqueles que direta e indiretamente tornaram possível este trabalho,

O meu eterno reconhecimento.

PREFÁCIO

Esta tese será apresentada na forma de dois artigos intitulados:

Artigo 1 – “Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes com e sem fotoativação sobre bactérias cariogênicas” – Será submetido para publicação no *Journal of Dentistry*.

Artigo 2 - “Influência da dentina humana na atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes” – Será submetido para publicação no *Journal of Dentistry*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO.....	22
PROPOSIÇÃO.....	27
Artigo 1 - “Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes com e sem fotoativação sobre bactérias cariogênicas”	
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Materiais e Métodos.....	34
Resultados.....	36
Discussão.....	37
Conclusão.....	41
Agradecimentos.....	42
Referências.....	42
Tabelas.....	47
Artigo 2 - “Influência da dentina humana na atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes”	
Resumo.....	53
Abstract.....	54
Introdução.....	55
Materiais e Métodos.....	56
Resultados.....	60
Discussão.....	61
Conclusão.....	67
Agradecimentos.....	68
Referências.....	68
Tabelas.....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
CONCLUSÃO GERAL.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- BisGMA - Bisfenol A diglicidilmetacrilato
- BHI – Brain heart infusion – Infusão de cérebro e coração
- CCT - Coleção de Culturas Tropical
- CHX – Solução de digluconato de clorexidina 0.2%
- CHXd– Solução de digluconato de clorexidina 0.2% - disco de dentina
- CHXp – Solução de digluconato de clorexidina 0.2% - disco de papel
- CSEB - Clearfil SE Bond
- CSEB-P+A - Clearfil SE Bond - *primer* + adesivo
- CSEB-A - Clearfil SE Bond – adesivo
- CSEB-P - Clearfil SE Bond – primer
- CPB - Clearfil Protect Bond
- CPB-P+A - Clearfil Protect Bond – *primer* + adesivo
- CPB-A - Clearfil Protect Bond – adesivo
- CPB-P - Clearfil Protect Bond – primer
- CQ - D,1-canforoquinona
- C3SB - Clearfil Tri-S Bond
- DP - Disco de papel
- EDTA – Ácido etileno diamino tetra-acético
- HEMA - 2-hidroxietilmetacrilato
- L. acidophilus* – *Lactobacillus acidophilus*
- MDP - 10-metacrilóiloxidecil dihidrogenio fosfato
- MDPB - Brometo 12-metacrilóiloxidodecilmiridinio
- mL - mililitros
- mm – milímetros
- p – Nível de significância estatística
- PEM-F - Mono fluoro fosfazeno modificado
- pH – Potencial hidrogênioônico
- Phenyl-P – Metacrilóxietyl fenilhidrogênio fosfato
- Piro-EMA - Metacrilato funcionalizado com ácido fosfórico
- S. mutans* - *Streptococcus mutans*
- TEGDMA – Trietilenoglicol de dimetacrilato

THB - Tolueno hidróxibutilato

UDMA - Dimetacrilato uretano

UFC – Unidades formadoras de colônia

XIII - Xeno III

XIII-A - Líquido A do Xeno III

XIII-B - Líquido B do Xeno III

XIII-A+B - Xeno III - líquido A+B

μL - microlitro

% - porcentagem

°C - Grau Celsius

4-META – Ácido 4-metacriloxietil trimetílico anidro

Gondim JO. Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes sobre bactérias cariogênicas [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2006.

Resumo

A incorporação de agentes antibacterianos aos sistemas adesivos dentinários autocondicionantes tem sido proposta com o intuito de eliminar bactérias residuais presentes na dentina, prevenindo, assim, a recorrência de cárie. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos dentinários autocondicionantes: Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB), Xeno III (XIII) e Clearfil Tri-S Bond (C3SB), com e sem fotoativação, sobre bactérias cariogênicas, bem como a influência da dentina humana na atividade antibacteriana destes sistemas adesivos, utilizando o método de difusão em ágar. A solução de digluconato de clorexidina a 0,2% foi utilizada como controle positivo. O componente adesivo do CPB e do CSEB, o líquido A do XIII e o C3SB não apresentaram atividade antibacteriana quando aplicados sobre discos de papel. O conjunto *primer* e adesivo do CPB não fotoativado promoveu a maior inibição contra *S. mutans* ($p < 0,05$), enquanto que com a fotoativação, não houve diferença entre esses componentes juntos e o *primer* isoladamente. Para o *L. acidophilus*, o *primer* do CPB apresentou a maior atividade antibacteriana nas duas condições de fotoativação ($p < 0,05$). Quando os materiais foram aplicados sobre discos de dentina, somente a CHX promoveu efeito inibitório, o qual foi de menor intensidade do que quando aplicada sobre discos de papel ($p < 0,05$). A CHX apresentou maior atividade antibacteriana sobre *S. mutans* quando comparado com *L. acidophilus* ($p < 0,05$). Pode-se observar que a fotoativação reduziu significativamente a

atividade antibacteriana dos sistemas adesivos autocondicionantes, que a presença do MDPB no sistema adesivo dentinário é importante para a atividade antibacteriana sobre bactérias cariogênicas, e que a dentina atua como barreira de proteção eliminando ou reduzindo a ação antibacteriana de materiais odontológicos.

Palavras-chave: Adesivos dentinários, bactérias; agentes antibacterianos; dentina; permeabilidade da dentina.

Gondim JO. Antibacterial activity of self-etching denting bonding systems against cariogenic bacteria [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2006.

Abstract

The incorporation of antibacterial agents in self-etching dentin bonding systems has been introduced in attempts to eliminate dentin residual bacteria, preventing secondary caries. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of cured and uncured self-etching dentin bonding systems Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB), Xeno III (XIII) and Clearfil Tri-S Bond (C3SB), against *S. mutans* and *L. acidophilus*, by the agar disc-diffusion test, as well as to evaluate the influence of human dentin on their antibacterial activity. A 0.2% aqueous solution of chlorhexidine (CHX) was used as a positive control. CPB and CSEB bond component, liquid A of Xeno III and C3SB did not show any antibacterial activity when applied onto paper discs. The primer and bond set of uncured CPB presented the strongest inhibitory activity against *S. mutans* ($p < 0.05$), however after light-activation, no difference was observed between these components together and when primer was applied individually. Independently of light-activation conditions, CPB primer showed the strongest antibacterial activity against *L. acidophilus* ($p > 0.05$). When the materials were applied onto dentin discs, only CHX presented inhibitory activity, which was less intense than when it was applied onto paper discs ($p < 0.05$). CHX showed stronger antibacterial activity against *S. mutans* than against *L. acidophilus* ($p < 0.05$). In conclusion, light-activation significantly reduced the antibacterial activity, the presence of MDPB in adhesive systems is important to the inhibitory effect against cariogenic

bacteria, and the dentin acted as a protection barrier reducing or inhibiting the antibacterial activity of dental materials.

Keywords: Dentin-bonding agents; bacteria; anti-bacterial agents; dentin; dentin permeability.

Introdução

Introdução

Nos últimos anos tem sido introduzida na Odontologia uma conduta de mínima intervenção e invasão aos tecidos dentários. Apesar disso, o cirurgião dentista ainda dispensa grande parte do seu tempo clínico substituindo restaurações, e este “ciclo restaurador repetitivo” leva ao enfraquecimento progressivo da estrutura dentária.

Os materiais resinosos, apesar de toda a evolução tecnológica, continuam a apresentar algumas propriedades indesejáveis, como a contração de polimerização e as alterações volumétricas decorrentes de variações térmicas.^{1,4} Estes fatores determinam a formação de fendas entre o material restaurador e o dente, criando um ambiente propício para o acúmulo e proliferação de microrganismos que podem levar ao desenvolvimento de cárie secundária ou recorrente, a qual constitui um dos principais motivos para substituição de restaurações, tanto em dentes decíduos quanto em dentes permanentes.^{29,35}

Um outro fator relacionado com o desenvolvimento de cárie secundária é a permanência de microrganismos não só sobre a superfície da dentina, mas também no interior de túbulos dentinários, em profundidades variáveis, após a remoção de tecido cariado.^{17,22} O uso de corantes evidenciadores como auxiliares na remoção da cárie, assim como os parâmetros clínicos de dureza e coloração do tecido remanescente, não garantem a total remoção de microrganismos da dentina,^{17,23} e, até mesmo, o condicionamento das paredes cavitárias com ácido fosfórico durante o procedimento restaurador, apesar de ser efetivo na redução do número de bactérias remanescentes, não é capaz de eliminá-las completamente.^{20,24,28}

Para atingir as bactérias que se encontram no interior dos túbulos dentinários, as substâncias antibacterianas utilizadas devem, de preferência, não só

atuar sobre a superfície do preparo cavitário, mas também devem, em alguma extensão, permear a dentina. Neste sentido, é importante a adição de agentes antibacterianos à composição dos sistemas adesivos dentinários, principalmente, nos autocondicionantes, visto que, em situações clínicas, estes materiais são aplicados diretamente sobre a dentina recém preparada, sem o prévio condicionamento com ácido fosfórico e lavagem da cavidade para remoção da *smear layer*. Assim, com o intuito de minimizar ou eliminar os prejuízos causados pelos microrganismos associados à cárie secundária, agentes antibacterianos, tais como: clorexidina,^{19,36} flúor,^{5,18,21} antibióticos²⁵ e monômeros resinosos com ação antibacteriana,^{8,13-15} têm sido incorporados à composição dos materiais adesivos.

O brometo 12-metacriloiloxidodecilmiridínio, conhecido por MDPB, é um monômero resinoso composto por uma amônia quaternária dodecilmiridínio e um grupo metacriloil.¹⁴ A incorporação deste monômero a materiais resinosos representa uma grande evolução, pois diferentemente dos outros agentes antibacterianos, o MDPB apresenta ação antibacteriana sem ser liberado para o meio.¹⁴ A presença do grupo metacriloil no MDPB permite sua co-polimerização com outros monômeros resinosos e, com a fotoativação do material, a porção antibacteriana da molécula permanece aprisionada na matriz polimérica. Mesmo imobilizado nesta matriz, o MDPB continua, embora em menor grau, exercendo sua ação pelo contato direto com os microrganismos, causando sua morte ou inativação.^{8,14}

Existem poucos dados na literatura que avaliam a influência da dentina nas propriedades antibacterianas dos sistemas adesivos dentinários autocondicionantes.^{10,31,34} A principal característica desse tecido é a presença de túbulos que percorrem toda sua espessura e, a permeabilidade dentinária é uma

conseqüência direta da sua existência. O túbulo dentinário é composto por dentina peritubular, processo odontoblástico, colágeno e fluido dentinário, os quais, de alguma forma, influenciam na permeabilidade dentinária. Quando exposta ao meio bucal, a estrutura tubular da dentina funciona como uma via de transporte de substâncias da cavidade bucal para a polpa e vice-versa. Como conseqüência da disposição anatômica e fisiologia do complexo dentino-pulpar, a permeabilidade dentinária varia de dente para dente e de região para região no mesmo dente, sendo menor na dentina superficial, que apresenta túbulos de menor diâmetro (0,9 μm) e em menor quantidade por unidade de área (20.000 por mm^2) e, à medida que se aproxima da cavidade pulpar, a permeabilidade dentinária aumenta visto que aumentam tanto o número de túbulos por unidade de área (45.000 por mm^2) como também o seu diâmetro (2,5 μm).^{3,30} Em ensaios experimentais in vitro, quando o resultado da pesquisa depende da difusão do material pelos túbulos dentinários, é importante mensurar a permeabilidade ou condutância hidráulica da dentina, uma vez que esta propriedade pode influenciar nos resultados.

De acordo com alguns autores,^{9,12,31} os adesivos dentinários autocondicionantes por si só apresentam atividade antibacteriana por possuírem um baixo pH, isto é, a liberação de íons hidrogênio (H^+) presentes em sua composição parece ser capaz de inibir o crescimento bacteriano. Tem sido mostrado também que a presença da dentina diminui a citotoxicidade^{2,32} e o efeito antibacteriano³¹ de alguns materiais odontológicos (ionômeros de vidro, sistemas adesivos dentinários) visto que atua como meio sólido tamponante, pois é capaz de neutralizar prótons derivados de ácidos contidos nos materiais. Além disso, algumas bactérias apresentam a capacidade de produzir e adquirir resistência aos ácidos, aumentando, assim, sua sobrevivência em ambientes de baixo pH.^{6,33} Assim,

para determinar a atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários, fatores como: composição do adesivo, presença e tipo de agente antibacteriano, pH, espessura da dentina, permeabilidade ou condutância hidráulica da dentina e a cepa bacteriana, devem ser levados em consideração.

Proposição

Proposição

Geral

Avaliar o efeito antibacteriano de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes sobre bactérias cariogênicas, por meio de teste de difusão em agar.

Específica

1. Avaliar o efeito antibacteriano de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes com e sem fotoativação sobre bactérias cariogênicas.
2. Avaliar a influência da dentina humana na atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes sobre bactérias cariogênicas.

Artigo 1

**Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes
com e sem fotoativação sobre bactérias cariogênicas**

Título reduzido: Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes

Autores: Juliana O. Gondim¹, Cristiane Duque², Elisa M. A. Giro^{1,*}

¹Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

²Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Av. Limeira, 907, Piracicaba, SP, Brasil.

*** Autor correspondente:**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. 14801-903

Phone: +55 16 33016336

E-mail: egiro@foar.unesp.br

Palavras-chave: Adesivos dentinários; bactérias; agentes antibacterianos.

**Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes
com e sem fotoativação sobre bactérias cariogênicas**

Resumo

Objetivo. Avaliar a ação inibitória dos sistemas adesivos dentinários autocondicionantes Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB), Xeno III (XIII) e Clearfil Tri-S Bond (C3SB), com e sem fotoativação, sobre *S. mutans* e *L. acidophilus*, usando o método de difusão em ágar.

Métodos. Uma alíquota de 10 µL de cada material teste foi aplicada sobre discos de papel distribuídos em placas de Petri contendo bactérias semeadas em BHI ágar. Os componentes dos sistemas adesivos (primer e adesivo) também foram avaliados separadamente. Após incubação das placas, os halos de inibição ao redor dos espécimes foram mensurados.

Resultados. O componente adesivo do CPB e do CSEB, o líquido A do XIII e o C3SB não apresentaram atividade antibacteriana. O conjunto *primer* e adesivo do CPB não fotoativado promoveu a maior inibição contra *S. mutans* ($p < 0,05$), enquanto que com a fotoativação, não houve diferença entre esses componentes juntos e o *primer* isoladamente. Para o *L. acidophilus*, o *primer* do CPB apresentou a maior atividade antibacteriana nas duas condições de fotoativação ($p < 0,05$).

Conclusão. O sistema adesivo Clearfil Protect Bond promoveu a maior atividade antibacteriana sobre as cepas testadas, independente da condição de fotoativação, sendo esta atividade atribuída ao primer, componente que contém o agente antibacteriano.

Palavras-chave: Adesivos dentinários; bactérias; agentes antibacterianos.

Antibacterial activity of cured and uncured self-etching denting bonding systems against cariogenic bacteria

Abstract

Objective. This study evaluated the antibacterial activity of cured and uncured self-etching dentin bonding systems Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB), Xeno III (XIII) and Clearfil Tri-S Bond (C3SB), against *S. mutans* and *L. acidophilus*, by the agar disc-diffusion test.

Methods. An aliquot of 10 μ L of each test material was pipetted onto paper discs placed on the inoculated BHI agar surface. The components primer and bond of the adhesive systems were also evaluated individually. The size of inhibition zones produced around the specimens were measured after incubation.

Results. CPB and CSEB bond component, liquid A of Xeno III and C3SB did not show any antibacterial activity. The primer and bond set of uncured CPB presented the strongest inhibitory activity against *S. mutans* ($p < 0.05$), however after light-activation, no difference was observed between these components together and when primer was applied individually. Independently of light-activation conditions, CPB primer showed the strongest antibacterial activity against *L. acidophilus* ($p > 0.05$).

Conclusion. The Clearfil Protect Bond adhesive system showed the strongest antibacterial activity against bacterial strains evaluated in spite of the light-activation conditions. This effect can be attributed to CPB primer, a component that contains the antibacterial agent.

Key-words: Dentin-Bonding Agents; Bacteria; Anti-Bacterial Agents

Introdução

Apesar dos materiais resinosos terem passado por uma grande evolução tecnológica nos últimos anos, algumas características indesejáveis, como a contração de polimerização e a alteração volumétrica provocada pelas variações térmicas, ainda continuam presentes. Estas características podem resultar em defeitos na interface adesiva, com conseqüente infiltração marginal.¹

As falhas decorrentes da contração de polimerização dos materiais adesivos, bem como a permanência de microrganismos no tecido dentinário após a remoção da cárie, são os principais fatores relacionados com o desenvolvimento de cárie secundária ou recorrente, a qual determina a substituição prematura de restaurações dentárias.²⁻⁶

A cavidade bucal abriga uma variedade muito grande de microrganismos, sendo os *Streptococcus mutans* e os *Lactobacillus* as principais bactérias associadas com o início e o desenvolvimento da cárie dentária. *Streptococcus mutans* são comumente encontrados no biofilme formado nas margens de restaurações, principalmente em resina composta, propiciando maior potencial para a instalação de cárie secundária.⁷ Na tentativa de minimizar ou, até mesmo, eliminar os efeitos indesejáveis causados por estes microrganismos tem-se incorporado agentes antibacterianos tais como: clorexidina,^{8,9} flúor,¹⁰⁻¹² antibióticos¹³ e monômeros resinosos antibacterianos,¹⁴⁻¹⁸ à composição de materiais restauradores, bem como de sistemas adesivos dentinários.

O brometo 12-metacrilóiloxidodecílpiridínio (MDPB) é um monômero resinoso com ação antibacteriana resultante da combinação do brometo de hidroxidodecílpiridínio com o cloreto de metacrilóil.¹⁴ Sua vantagem em relação aos outros antibacterianos é o fato de ser co-polimerizado com outros monômeros, não

sendo liberado para o meio após a fotoativação, o que resulta em maior longevidade da restauração, visto que suas propriedades mecânicas não são alteradas.^{14,19}

Estudos sobre atividade antibacteriana sugerem que o crescimento bacteriano pode ser inibido pelo baixo pH dos sistemas adesivos.²⁰⁻²² Entretanto, esse efeito parece ser reduzido quando o material entra em contato com a dentina, que além de apresentar propriedade tamponante, atua como barreira física impedindo a difusão de componentes do material.^{22,23} Também, deve ser considerado o fato de que alguns microrganismos apresentam a capacidade de desenvolver uma resposta de tolerância quando submetidos a pH ácido, em níveis subletais, o que eleva sua sobrevivência em ambientes de baixo pH.^{24,25}

Pesquisas têm demonstrado que bactérias permanecem no interior de alguns túbulos dentinários após a completa remoção de tecido cariado, ressaltando que o aspecto clínico de tecido dentinário sadio não corresponde aos achados microbiológicos.^{2,3} O condicionamento prévio da dentina com ácido fosfórico quando são utilizados adesivos dentinários convencionais, apesar de ser efetivo na redução do número de bactérias remanescentes, também não é capaz de eliminá-las por completo.²⁶⁻²⁸ Portanto, a incorporação de agentes antibacterianos na composição dos sistemas adesivos dentinários faz-se muito importante, principalmente, quando são utilizados os sistemas adesivos autocondicionantes, visto que, clinicamente, estes são aplicados diretamente sobre a dentina sem o prévio condicionamento ácido e lavagem da cavidade para remoção da *smear layer*. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes, contendo ou não agentes antibacterianos, com e sem fotoativação, sobre bactérias cariogênicas, utilizando o método de difusão em ágar.

Material e método

As características e principais componentes dos materiais utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 1. A atividade antibacteriana foi avaliada para as seguintes bactérias: *Streptococcus mutans* (UA-159), fornecido pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC # IAL-523), da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, SP. Os sistemas adesivos selecionados, bem como os seus componentes individualmente, foram submetidos ao teste de difusão em ágar. Digluconato de Clorexidina a 0,2% (CHX) e discos de papel filtro sem nenhum material (DP) foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

Para a realização do teste de difusão em ágar, inicialmente as cepas bacterianas padrão foram reativadas em 5mL de BHI caldo (Brain Heart Infusion, BHITM, Difco Laboratories, Detroit, EUA) por 24 horas em estufa a 37°C, em condições de microaerofilia. A partir dessa cultura, foi realizada uma nova replicação em 5mL de BHI caldo e manutenção por 24 horas a 37°C, em condições de microaerofilia, o que permitiu a obtenção de inóculos contendo 10⁹ UFC/mL, correspondente ao nível 8 da escala de McFarland. Para verificar e padronizar a quantidade de microrganismos presentes nos inóculos utilizados para o experimento, foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁶.

Uma alíquota de 250 µL de um dos inóculos bacterianos foi espalhada sobre a superfície de placas de Petri contendo 15mL de BHI ágar. Após a secagem dessa superfície, em cada placa foram inseridos sete discos de papel esterilizados, dos quais um serviu como controle negativo sem aplicação de nenhum material, um recebeu 10 µL de digluconato de clorexidina 0,2% (controle positivo) e sobre os

outros cinco foram pipetados 10 μL dos materiais teste, de forma que foram necessárias 16 placas para se obter oito réplicas de cada grupo experimental para cada microrganismo e condição de fotoativação (Tabela 2). No grupo que recebeu fotoativação, todos os materiais, incluindo os controles positivo e negativo, foram irradiados por 10 segundos, utilizando um aparelho de luz halógena (Optilux 500, Kerr Company, Orange, EUA), previamente avaliado quanto à intensidade de luz emitida com um radiômetro, não devendo esta ser inferior à $400\text{mW}/\text{cm}^2$, para promover adequada conversão de monômeros em polímeros. Quando utilizado o CPB-P+A e o CSEB-P+A, foram aplicados 10 μL do primer e após 20 segundos foram aplicados 10 μL do adesivo, o qual foi seguido da condição de fotoativação.

As placas foram mantidas por duas horas à temperatura ambiente para pré-difusão dos materiais e incubadas em estufa a 37°C em condições de microaerofilia por 24 horas para *S. mutans* e por 48 horas para *L. acidophilus*. Os halos de inibição produzidos ao redor dos discos de papel contendo os materiais testados foram mensurados em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana, SP, Brasil), em duas regiões, sendo considerado o maior diâmetro tanto no sentido horizontal quanto no vertical. A partir desses valores foi calculado o diâmetro médio de cada halo de inibição. Deste foi subtraído o diâmetro do disco de papel (6 mm), e o resultado foi dividido por dois, obtendo-se, assim, a largura do halo de inibição de cada espécime (Anexo 1). Para o grupo controle positivo (CHX) foi feita a média dos valores de dois espécimes.

A análise estatística foi realizada utilizando testes não paramétricos de Mann-Whitney para avaliar a influência da condição de fotoativação sobre a atividade antibacteriana de cada material. Os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram

usados para comparar os materiais dentro de cada condição de fotoativação. Para todos os testes aplicados foi considerado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Os valores das larguras dos halos de inibição para cada espécime, de acordo com a cepa bacteriana, material testado e condição de fotoativação estão apresentados no Anexo 2 e, os valores das medianas, mínimos e máximos, nas Tabelas 3 e 4. Independente do tipo de microrganismo e da condição de fotoativação, nenhum halo de inibição foi observado para os componentes adesivos do Clearfil Protect Bond (CPB-A), Clearfil SE Bond (CSEB-A), líquido A do Xeno III (XIII-A) e para o Clearfil Tri-S Bond (C3SB).

Streptococcus mutans:

O Clearfil Protect Bond (*primer* + adesivo) não fotoativado promoveu o maior halo de inibição ($p < 0,05$), seguido do CPB-P e da CHX que não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$). Com a fotoativação, não houve diferença entre os componentes do CPB em conjunto (CPB-P+A) e o *primer* isoladamente (CPB-P), os quais mostraram inibição semelhante à CHX ($p > 0,05$). Em relação ao efeito da fotoativação na atividade inibitória, os materiais, no geral, apresentaram uma menor atividade antibacteriana quando fotoativados ($p < 0,05$), exceto o *primer* do CPB, no qual não foi observada diferença estatística com e sem a aplicação da luz (Tabela 3).

Lactobacillus acidophilus:

O *primer* do CPB apresentou a maior atividade antibacteriana nas duas condições de fotoativação ($p < 0,05$). Em relação ao efeito da fotoativação, não houve diferença estatisticamente significativa para os materiais testados, exceto para os

conjuntos *primer* + adesivo do CPB e do CSEB que, quando não fotoativados, apresentaram maior atividade inibitória ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Discussão

Neste trabalho foi avaliada a atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários contra *S. mutans* e *L. acidophilus* por estes serem os principais patógenos diretamente relacionados ao desenvolvimento da cárie dentária.⁷ O método de difusão em ágar foi utilizado por ser amplamente empregado para determinação da atividade inibitória de substâncias líquidas, além de ser simples, de fácil execução e facilitar a comparação com outros estudos.^{15,18,21,22,29}

A avaliação da atividade antibacteriana dos sistemas adesivos dentinários autocondicionantes foi realizada empregando-se o *primer* seguido do adesivo e cada componente individualmente, com a intenção de, uma vez identificada a ação antibacteriana, determinar qual o componente responsável por esta propriedade.

A solução de digluconato de clorexidina 0,2% foi utilizada como controle positivo por ser um agente antibacteriano potente com amplo espectro de ação, muito utilizada como método auxiliar no controle químico do biofilme dentário e na desinfecção de preparos cavitários, recomendada, portanto, como substância de referência para comparação entre estudos *in vitro* de avaliação da atividade antibacteriana de materiais para uso odontológico.^{22,29,30}

Os materiais testados foram avaliados com e sem fotoativação. Assim, corroborando com Imazato et al.²¹ (2002) pôde-se observar, pelos resultados obtidos, que os materiais quando não fotoativados apresentaram uma maior atividade antibacteriana, sendo demonstradas diferenças estatisticamente significantes para os grupos: CPB-P+A, CSEB-P, CSEB-P+A, XIII-B e XIII-A+B quando a bactéria

avaliada foi o *S. mutans*, e para os grupos CPB-P+A, CSEB-P+A, quando avaliada a ação sobre *L. acidophilus* ($p < 0,05$). Entretanto, mesmo com a fotoativação, foi verificada alguma atividade antibacteriana para esses materiais. A polimerização de materiais adesivos leva ao aprisionamento na matriz polimérica e a uma diminuição na liberação de componentes antibacterianos polimerizáveis, como também dos monômeros ácidos promotores da adesão.²¹ Assim, a formação de halos de inibição de microrganismos quando os sistemas adesivos dentinários foram fotoativados pode ser explicada pelo fato de que não ocorre uma completa conversão de monômeros em polímeros e monômeros residuais podem ser, então, liberados para o meio.³¹ Somado a isto, a luz não é capaz de atravessar adequadamente o espécime de papel impregnado pelos componentes adesivos, o que impede que grande parte dos monômeros forme cadeias poliméricas.²¹ O efeito antibacteriano pode, também, dever-se à liberação dos monômeros residuais presentes na camada inibida pelo oxigênio.³²

A atividade antibacteriana dos sistemas adesivos depende de vários fatores, como: o pH, a presença de componentes antibacterianos na composição química e a viscosidade do material. O caráter ácido do *primer* dos sistemas adesivos autocondicionantes tem sido apontado como um dos principais fatores relacionados à inibição bacteriana.^{20,21,30,33} O MDP (10-metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato) é um monômero ácido responsável por promover a adesão e conferir aos sistemas adesivos a propriedade autocondicionante, ou seja, a capacidade de condicionar através da *smear layer* e incorporá-la à interface adesiva. Esta substância está presente tanto no componente *primer* como no adesivo do CPB e do CSEB, e no C3SB (frasco único). Entretanto, no presente trabalho, como já demonstrado por alguns autores,^{22,29,30} somente os componentes *primer* do CPB e do CSEB, e este

quando associado ao adesivo, apresentaram efeito antibacteriano contra as cepas bacterianas testadas. Apesar de conter o MDP, a ausência da atividade antibacteriana exibida pelo C3SB, assim como pelos componentes adesivos do CPB e CSEB, pode ter ocorrido devido à presença de moléculas hidrófobas em sua composição, as quais podem dificultar sua difusão no meio ágar.²¹

O flúor tem sido adicionado aos sistemas adesivos e aos materiais restauradores e sua atividade está mais relacionada à inibição do processo de desmineralização e favorecimento da remineralização do que à sua atividade antibacteriana.¹² Corroborando com os estudos de Schmalz et al.²² e Turkun et al.²⁹, o Xeno III, no presente estudo, apresentou reduzida atividade inibitória, principalmente sobre *L. acidophilus*, efeito este atribuído ao líquido B deste sistema adesivo que contém, entre outros componentes, o flúor. Schmalz et al.²² observaram que a remoção do componente flúor anulou o efeito antibacteriano do Prime&Bond NT. Entretanto, o Xeno III, apesar de conter flúor e de possuir o menor pH (pH=1), quando comparado aos demais materiais testados, apresenta maior viscosidade, sendo esta conferida pelo monômero UDMA presente em sua composição química. Desta forma, acredita-se que a viscosidade possa também modular sua atividade antibacteriana.²⁹

Dentre os sistemas adesivos dentinários avaliados nesta pesquisa, o CPB apresentou a maior atividade antibacteriana. Efeito semelhante foi observado em outros estudos.^{15,16,22,29,33} O *primer* deste sistema adesivo apresenta, além do MDP, outro monômero resinoso denominado MDPB, agente antibacteriano composto de amônia quaternária com grupo metacrilóil.¹⁴ A vantagem do MDPB em relação aos demais antibacterianos é o fato de ser co-polimerizado com outros monômeros, não sendo liberado para o meio depois de fotoativado, e continuar exercendo atividade

antibacteriana, embora em menor extensão, quando o microrganismo entra em contato com a superfície do material.^{14,16,18,33} Na tentativa de elucidar a real contribuição do MDPB, Imazato et al.¹⁸ compararam o potencial antibacteriano do primer do Clearfil Protect Bond e do mesmo primer após remoção desse monômero resinoso de sua composição e observaram que na sua ausência, o primer não exerceu efeito antibacteriano contra *S. mutans* e *Lactobacillus*. Este achado demonstra que o efeito antibacteriano do CPB depende não só da acidez do material, mas, principalmente, da presença do agente antibacteriano MDPB.

A incorporação de agentes antibacterianos solúveis em meio aquoso, como a clorexidina, a materiais resinosos, além de levar a uma rápida perda do efeito antibacteriano à medida que estes agentes são liberados, acarreta também em uma progressiva deterioração do material.^{8,9} Assim, a não liberação do MDPB para o meio aquoso é de grande importância, pois o torna seguro, sem efeito tóxico, e efetivo, visto que sua atividade antibacteriana não decresce com o passar do tempo e não prejudica as propriedades mecânicas dos materiais a base de Bis-GMA, aumentando assim a longevidade da interface de união e, conseqüentemente, da restauração.^{14,15,29,33}

Outro fator importante a ser considerado é a capacidade dos microrganismos, em especial aqueles dos grupos *Streptococcus* e *Lactobacillus*, de produzir ácido e de sobreviver em ambientes de baixo pH. Bactérias acidúricas, quando submetidas a choques ácidos, desenvolvem mecanismos de adaptação por meio de síntese protéica, aumentando assim sua resistência e tempo de sobrevivência.^{24,25} Desta forma, materiais odontológicos que apresentam baixo pH, ao invés de exibirem efeito antibacteriano, podem estimular o desenvolvimento de cepas bacterianas mais resistentes, dificultando sua eliminação.

Devido às limitações das pesquisas laboratoriais, os resultados obtidos não podem ser extrapolados para uma condição clínica, porque podem não refletir o real efeito do material quando aplicado numa situação *in vivo*. Entretanto, estes testes estão situados na base da pirâmide de evidência científica, dando suporte a todos os outros tipos de estudo, direcionando e servindo de referência para estudos clínicos. Uma das limitações do presente estudo está relacionada ao fato de não reproduzir as condições fisiológicas do complexo dentino-pulpar representadas pela presença de substrato dentinário (estrutura tubular heterogênea permeável com fluido dentinário e pressão intra-pulpar), visto que, o efeito antibacteriano dos monômeros ácidos dos sistemas adesivos autocondicionantes pode ser comprometido tanto pela ação tamponante do complexo dentino-pulpar como pela barreira física de proteção exercida pela própria dentina.^{22,23,34} É importante, portanto, a realização de trabalhos *in vitro* que reproduzam, cada vez melhor, as condições fisiológicas da dentina e se possível trabalhos clínicos, com o intuito de avaliar com maior fidelidade a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos dentinários.

Conclusão

O Clearfil Protect Bond promoveu a maior atividade inibitória sobre os microrganismos testados, nas duas condições de fotoativação, sendo esta atividade atribuída ao *primer*, componente que contém o agente antibacteriano MDPB.

A fotoativação reduziu significativamente a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos testados.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Josimeri Hebling pelo auxílio na análise estatística dos dados obtidos. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Referências

1. Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH. A review of polymerization contraction: the influence of stress development versus stress relief. *Operative Dentistry* 1996; **21**(1):17-24.
2. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Research* 1993; **27**(5):402-408.
3. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *British Dental Journal* 1993; **174**(7):245-248.
4. Haller B, Trojanski A. Effect of multi-step dentin bonding systems and resin-modified glass ionomer cement liner on marginal quality of dentin-bonded resin composite Class II restorations. *Clinical Oral Investigations* 1998; **2**(3):130-136.
5. Mjor IA. Clinical diagnosis of recurrent caries. *Journal of the American Dental Association* 2005; **136**(10):1426-1433.
6. Tyas MJ. Placement and replacement of restorations by selected practitioners. *Australian Dental Journal* 2005; **50**(2):81-89.

7. Svanberg M, Mjor IA, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *Journal of Dental Research* 1990; **69**(3):861-864.
8. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *Journal of Oral Rehabilitation* 1983; **10**(5):373-381.
9. Wilson SJ, Wilson HJ. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. *Journal of Oral Rehabilitation* 1993; **20**(3):311-319.
10. Kerber LJ, Donly KJ. Caries inhibition by fluoride-releasing primers. *American Journal of Dentistry* 1993; **6**(5):216-218.
11. Itota T, Nakabo S, Iwai Y, Konishi N, Nagamine M, Torii Y. Inhibition of artificial secondary caries by fluoride-releasing adhesives on root dentin. *Journal of Oral Rehabilitation* 2002; **29**(6):523-527.
12. Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *European Journal of Oral Sciences* 2005; **113**(3):245-250.
13. Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endo T, et al. Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems--influence on tensile bond strength and antibacterial effect. *Dental Materials Journal* 2000; **19**(1):65-74.
14. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *Journal of Dental Research* 1994; **73**(8):1437-1443.

15. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RR, McCabe JF. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *Journal of Dental Research* 1997; **76**(3):768-772.
16. Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *Journal of Dentistry* 1998; **26**(3):267-271.
17. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. *Dental Materials* 2003; **19**(4):313-319.
18. Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dental Materials* 2006; **22**(6):527-532.
19. Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. *Journal of Dental Research* 1994; **73**(10):1641-1645.
20. Imazato S, Imai T, Ebisu S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. *American Journal of Dentistry* 1998; **11**(3):106-108.
21. Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *American Journal of Dentistry* 2002; **15**(6):356-360.
22. Schmalz G, Ergucu Z, Hiller KA. Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *Journal of Endodontics* 2004; **30**(5):352-358.

23. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *Journal of Endodontics* 2002; **28**(3):188-192.
24. Harper DS, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Archives of Oral Biology* 1984; **29**(10):843-848.
25. Svensater G, Larsson UB, Greif EC, Cvitkovitch DG, Hamilton IR. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 1997; **12**(5):266-273.
26. Jensen OE, Handelman SL. Effect of an autopolymerizing sealant on viability of microflora in occlusal dental caries. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1980; **88**(5):382-388.
27. Kramer PF, Zelante F, Simionato MR. The immediate and long-term effects of invasive and noninvasive pit and fissure sealing techniques on the microflora in occlusal fissures of human teeth. *Pediatric Dentistry* 1993; **15**(2):108-112.
28. Luglie PF, Delitala PP, Zanetti S, Sanna S. An in-vivo bacteriological study on the effects of acid etching at the bottom of cavities. *Minerva Stomatologica* 1998;**47**(1-2):19-26.
29. Turkun LS, Ates M, Turkun M, Uzer E. Antibacterial activity of two adhesive systems using various microbiological methods. *The Journal of Adhesive Dentistry* 2005; **7**(4):315-320.
30. Baseren M, Yazici AR, Ozalp M, Dayangac B. Antibacterial activity of different generation dentin-bonding systems. *Quintessence International* 2005; **36** (5):339-344.

31. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *European Journal of Oral Sciences* 2005; **113**(6):525-530.
32. Finger WJ, Lee KS, Podszun W. Monomers with low oxygen inhibition as enamel/dentin adhesives. *Dental Materials* 1996; **12**(4):256-261.
33. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dental Materials* 2003; **19**(6):449-457.
34. Ergucu Z, Hiller KA, Schmalz G. Influence of dentin on the effectiveness of antibacterial agents. *Journal of Endodontics* 2005; **31**(2):124-129.

Tabela 1 - Apresentação e principais componentes dos materiais utilizados na pesquisa

Material (Fabricante)	Classificação	Composição	pH	Lote
Clearfill Protect Bond (Kuraray Medical Inc. Okayama, Japan)	Sistema adesivo autocondicionante de 2 passos	<i>Primer:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófilo, MDPB, água <i>Adesivo:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófobo, N, dietanol N-toluidina-p, CQ, Sílica coloidal silanizada, BisGMA, fluoreto de sódio	1,9 2,8	41137
Clearfill SE Bond (Kuraray Medical Inc., Okayama, Japan)	Sistema adesivo autocondicionante de 2 passos	<i>Primer:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófilo, N, dietanol N-toluidina-p, CQ, água <i>Adesivo:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófobo, N, dietanol N-toluidina-p, CQ, Sílica coloidal silanizada, BisGMA,	1,9 2,8	51308
Clearfill Tri-S Bond (Kuraray Medical Inc. Okayama, Japan)	Sistema adesivo autocondicionante de passo único	HEMA, BisGMA, MDP, dimetacrilato hidrófobo, Sílica coloidal silanizada, CQ, Etanol, água	2,4	61113
XenoIII (Dentsply, Konstanz, Germany)	Sistema adesivo autocondicionante de passo único	Líquido A: HEMA, água, etanol, THB, sílica amorfa Líquido B: Piro-EMA, PEM-F, UDMA, THB, CQ, etil-4-dimetilaminobenzoato	1,0 (misturado)	0504002710
Clorexidina 0,2% (Farmácia Escola –UNESP, Araraquara, SP, Brasil)	Solução Antibacteriana	Solução aquosa de Digluconato de clorexidina 0,2%	5,9	-

BisGMA: bisfenol A diglicidilmetacrilato; THB: tolueno hidróxibutilato; CQ: D,1-canforoquinona; HEMA: 2-hidroxietilmetacrilato; MDP: 10- metacrilóiloxidecil dihidrogenio fosfato; MDPB: brometo 12-metacrilóiloxidodecilmiridínio; PEM-F: mono fluoro fosfazeno modificado; Piro-EMA: metacrilato funcionalizado com ácido fosfórico; UDMA: dimetacrilato uretano.

Tabela 2 – Distribuição dos espécimes de acordo com o material, espécie bacteriana e condição de fotoativação

Microrganismos	Condição de fotoativação	Material											Total	
		CHX	DP	CPB P	CPB A	CPB P+A	CSEB P	CSEB A	CSEB P+A	C3SB	XIII A	XIII B		XIII A+B
<i>S. mutans</i> UA 159	Sem fotoativação	16	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	112
	Com fotoativação	16	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	112
<i>L. acidophilus</i> IAL-523	Sem fotoativação	16	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	112
	Com fotoativação	16	16	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	112
Total		64	64	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	448

CHX = Clorexidina; DP=Disco de papel; CPB-P+A = Clearfil Protect Bond – *primer* + adesivo; CPB-P = Clearfil Protect Bond – *primer*; CPB-A = Clearfil Protect Bond – adesivo; CSEB-P+A = Clearfil SE Bond - *primer* + adesivo; CSEB-P = Clearfil SE Bond – *primer*; CSEB-A = Clearfil SE Bond – adesivo; C3SB = Clearfil Tri-S Bond; XIII- A+B = Xenon III - líquido A+B; XIII-A = líquido A do Xenon III; XIII-B = líquido B do Xenon III.

Tabela 3 - Largura da zona de inibição (mm) obtida para *S. mutans* (mediana, mínimo e máximo) segundo o material e a condição de fotoativação

Material	Condição de fotoativação	
	Sem fotoativação	Com fotoativação
Clorexidina (CHX)	4,65 (3,88-5,00) B b	5,09 (4,40-5,88) A a
Disco de papel (DP)	0	0
Clearfil Protect Bond - primer (CPB-P)	5,05 (3,65-6,56) A b	4,75 (3,84-5,54) A a
Clearfil Protect Bond - adesivo (CPB-A)	0	0
Clearfil Protect Bond - primer+adesivo (CPB-P+A)	6,92 (6,20-7,74) A a	5,04 (4,08+6,13) B a
Clearfil SE Bond - primer (CSEB-P)	4,06 (3,40-4,56) A c	1,96 (1,68-2,23) B c
Clearfil SE Bond - adesivo (CSEB-A)	0	0
Clearfil SE Bond – primer+adesivo (CSEB-P+A)	3,39 (3,01-3,68) A d	2,43 (1,73-3,19) B b
Clearfil TriS Bond (C3SB)	0	0
Xeno III A (X III-A)	0	0
Xeno III B (X III-B)	3,05 (2,38-4,80) A d	2,17 (1,79-3,98) B b c
Xeno III A+B (X III-A+B)	2,24 (1,06-3,26) A e	1,43 (0,73-1,51) B d

*Valores seguidos por letras maiúsculas iguais nas linhas e letras minúsculas iguais nas colunas não são diferentes estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$).

Tabela 4 - Largura da zona de inibição (mm) obtida para *L. acidophilus* (mediana, mínimo e máximo) segundo o material e a condição de fotoativação

Material	Condição de fotoativação	
	Sem fotoativação	Com fotoativação
Clorexidina (CHX)	5,06 (4,03-5,44) A c	4,47 (4,03-5,93) A d
Disco de papel (DP)	0	0
Clearfil Protect Bond - primer (CPB-P)	7,15 (6,99-8,37) A a	6,93 (6,34-7,64) A a
Clearfil Protect Bond - adesivo (CPB-A)	0	0
Clearfil Protect Bond - primer+adesivo (CPB-P+A)	6,52 (6,21-7,00) A b	6,12 (5,62-6,59) B b
Clearfil SE Bond - primer (CSEB-P)	6,37 (5,84-7,46) A b	5,59 (3,65-7,48) A b c d
Clearfil SE Bond - adesivo (CSEB-A)	0	0
Clearfil SE Bond - primer+Adesivo (CSEB-P+A)	6,52 (6,19-7,05) A b	5,62 (5,19-6,13) B c
Clearfil TriS Bond (C3SB)	0	0
Xeno III A (X III-A)	0	0
Xeno III B (X III-B)	0,70 (0,18-1,14) A d	0,58 (0,23-0,96) A e
Xeno III - A+B (X III-A+B)	0,96 (0,58-2,02) A d	0,72 (0,49-1,81) A e

*Valores seguidos por letras maiúsculas iguais nas linhas e letras minúsculas iguais nas colunas não são diferentes estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Artigo 2

**Influência da dentina humana na atividade antibacteriana de sistemas adesivos
dentinários autocondicionantes**

Título reduzido: Influência da dentina na atividade antibacteriana de sistemas adesivos autocondicionantes

Autores: Juliana O. Gondim¹, Cristiane Duque², Elisa M. A. Giro^{1,*}

¹Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil.

²Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Av. Limeira, 907, Piracicaba, SP, Brasil.

* **Autor correspondente:**

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Rua Humaitá, 1680, Araraquara, SP, Brasil. 14801-903

Phone: +55 16 33016336

E-mail: egiro@foar.unesp.br

Palavras-chave: Adesivos dentinários; bactérias; agentes antibacterianos; dentina; permeabilidade da dentina.

Influência da dentina humana na atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes

Resumo

Objetivo. Avaliar a influência da dentina humana na atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes sobre *S. mutans* e *L. acidophilus*, utilizando o método de difusão em Agar.

Material e método. Os materiais Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB) e Xenio III (XIII), bem como o primer do CPB e do CSEB, e o líquido B do XIII, em separado, foram aplicados sobre discos de dentina de 400 µm de espessura, posicionados em placas de Petri contendo bactérias semeadas em BHI Agar. A solução de digluconato de clorexidina 0,2% (CHX) foi utilizada como controle positivo. Após incubação, por 24 h (*S. mutans*) ou por 48 h (*L. acidophilus*), a largura das zonas de inibição em torno dos espécimes foi mensurada.

Resultados. O CPB, o CSEB e o XIII, assim como o componente primer do CPB e do CSEB, e o líquido B do XIII não apresentaram atividade antibacteriana. A CHX quando aplicada sobre os discos de dentina promoveu efeito inibitório sobre *S. mutans* e *L. acidophilus* de menor intensidade do que quando aplicada sobre discos de papel ($p < 0,05$). A CHX apresentou maior atividade antibacteriana sobre *S. mutans* quando comparado com *L. acidophilus* ($p < 0,05$).

Conclusão. Independente do tipo de microrganismo, a dentina na espessura de 400µm atuou como barreira físico-química de proteção impedindo a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos dentinários autocondicionantes testados.

Palavras-chave: Adesivos dentinários; bactérias; agentes antibacterianos; permeabilidade da dentina.

Influence of human dentin on the antibacterial activity of self-etching dentin bonding systems

Abstract

Objective. This study evaluated the influence of human dentin on the antibacterial activity of self-etching dentin bonding systems against *S. mutans* and *L. acidophilus* by the agar disc-diffusion test.

Methods. Clearfil Protect Bond (CPB), Clearfil SE Bond (CSEB) and Xeno III (XIII), as well as CPB and CSEB primer, and liquid B of Xeno III were pipetted onto 400 µm thickness dentin discs which were placed on the inoculated BHI agar surface. A 0.2% aqueous solution of chlorhexidine (CHX) was used as a positive control. After incubation, the size of inhibition zones produced around the specimens were measured.

Results. CPB, CSEB and XIII, as well as CPB and CSEB primer, and liquid B of XIII did not show any antibacterial activity. The CHX applied onto dentin discs presented less inhibitory activity against *S. mutans* and *L. acidophilus* than when it was applied onto paper discs ($p < 0.05$). CHX showed stronger antibacterial activity against *S. mutans* than against *L. acidophilus* ($p < 0.05$).

Conclusion. Regardless the bacterial strains evaluated, the 400 µm thickness dentin acted as a protection barrier, inhibiting the antibacterial activity of self-etching dentin bonding systems tested.

Key-words: Dentin-bonding agents; bacteria; anti-bacterial agents; dentin permeability

Introdução

Embora os fatores etiológicos da doença cárie e os métodos para sua prevenção sejam amplamente estudados, a sua recorrência ainda é a principal causa de substituição de restaurações dentárias.^{1,2} Durante a remoção de tecido cariado, inevitavelmente, microrganismos permanecem no interior do tecido dentinário, visto que os parâmetros clínicos, de dureza e coloração da dentina, assim como os corantes evidenciadores não asseguram a sua completa eliminação.³⁻⁵ Como os adesivos dentinários não têm se mostrado completamente efetivos em eliminar a infiltração na interface dente/restauração, a incorporação de agentes antibacterianos nestes materiais tem sido proposta como uma tentativa de prevenir a recorrência de cárie.⁶⁻

14

Dentre os agentes antibacterianos incorporados aos materiais adesivos, destaca-se o monômero resinoso brometo 12-metacrilóiloxidodecílpiridínio, conhecido como MDPB.^{9,10,14} O MDPB apresenta como vantagem principal a capacidade de co-polimerizar com outros monômeros resinosos ficando imobilizado na matriz polimérica, o que o torna seguro e com ação antibacteriana prolongada, visto que não é liberado para o meio. Esta característica também assegura adequada sobrevida da restauração, uma vez que o MDPB, ao contrário dos agentes antibacterianos solúveis, não prejudica as propriedades físicas e mecânicas dos materiais aos quais é incorporado.^{9,10,15}

A incorporação do MDPB aos sistemas adesivos dentinários autocondicionantes tem sido apontada como extremamente vantajosa, visto que na prática clínica, estes materiais são aplicados diretamente sobre a dentina com algum grau de contaminação e, diferentemente dos sistemas adesivos convencionais de dois ou três passos, não apresentam a etapa de condicionamento ácido, a qual é capaz de

reduzir significativamente o número de microrganismos residuais.^{16,17} Apesar de os adesivos autocondicionantes serem de natureza ácida, esta característica parece não ser suficiente para eliminar totalmente bactérias residuais presentes na dentina, pois este tecido atua como meio sólido tamponante dos monômeros ácidos.¹⁸ Além disso, alguns tipos de bactérias podem desenvolver mecanismos de proteção, aumentando assim sua sobrevivência em ambiente ácido.^{19,20} Desta forma, os sistemas adesivos autocondicionantes contendo MDPB parecem atuar mais efetivamente sobre bactérias que estão na superfície da dentina e, em alguma extensão, sobre as bactérias que permanecem no interior dos túbulos dentinários. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar *in vitro* a influência da dentina humana na atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes, contendo ou não MDPB, sobre bactérias cariogênicas.

Material e método

Neste estudo foram utilizados somente aqueles materiais que apresentaram atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar com discos de papel, em estudo realizado pelos mesmos autores (dados não publicados). As características e composição dos materiais testados estão apresentadas na Tabela 1.

Foram utilizados 84 dentes terceiros molares humanos hígidos, obtidos junto ao banco de dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (Processo 54/05 – Anexo 3). Os dentes foram mantidos em solução de timol 0,1%, a 4°C, para prevenir contaminação bacteriana, até a obtenção dos espécimes, e foram utilizados dentro de um período máximo de 6 meses, contados à partir da data da sua extração.

Um disco de dentina de aproximadamente 500 μm de espessura foi obtido na altura do terço cervical de cada dente, com auxílio de máquina para corte de tecidos duros (ISOMET 1000 - Buehler, Lake Buff, EUA) equipada com disco diamantado (Series 15 LC Diamond, Buehler, Lake Buff, EUA), sob refrigeração com água. Os discos tiveram a superfície oclusal marcada com uma ranhura realizada com uma ponta diamantada esférica n°1011(KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil). Posteriormente, esses discos foram manualmente lixados com lixa de carvão de silício de granulação 320 (Doble A, Argentina) até obter-se discos de 400 μm de espessura, os quais foram armazenados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2), a uma temperatura de -4°C , até a leitura da sua permeabilidade (Anexo 4, Figura A1).

1. Determinação da permeabilidade dentinária

Os discos de dentina foram bilateralmente condicionados com solução de EDTA 0,5 M, pH 7.2, por 30 segundos, e lavados abundantemente com água deionizada, para remover a *smear layer* criada durante o desgaste. Em seguida, esses discos foram posicionados individualmente em um dispositivo denominado câmara pulpar in vitro, modificado a partir do dispositivo original desenvolvido por Hanks et al. (1988),²¹ o qual permitiu a padronização de uma área de dentina de 0,28 cm^2 para a avaliação da permeabilidade.

A câmara pulpar artificial foi conectada a um aparelho específico para a leitura da permeabilidade dentinária (Flodec - De Marco Engineering, Genebra, Suíça) por meio de um tubo de polietileno de 0,5mm de diâmetro (sonda nasogástrica n° 08). No sistema foi introduzida uma pequena bolha de ar e aplicada uma pressão hidrostática de 15 cm de H_2O . A movimentação da bolha foi registrada por um

sensor infravermelho do aparelho e transformada em valor de permeabilidade dentinária por um software específico (De Marco Engineering, Geneva, Suíça). De posse dos resultados dessa leitura, os discos de dentina foram distribuídos de forma a constituírem 14 grupos experimentais com seis discos cada um (sete grupos para o *S. mutans* e sete para o *L. acidophilus* - Anexo 5), de tal forma que a permeabilidade dentinária média dos grupos não diferisse estatisticamente (ANOVA, $p > 0,05$).

2. Determinação da Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi testada in vitro sobre os microrganismos cariogênicos: *S. mutans* (UA-159) fornecido pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP), e *L. acidophilus* (ATCC # IAL-523), da Coleção de Culturas Tropical (CCT) – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, SP. Os sistemas adesivos selecionados (CPB, CSEB e XIII), assim como o componente primer do CPB e do CSEB e o líquido B do XIII em separado, foram submetidos ao teste de difusão em Agar, por meio da sua aplicação sobre discos de dentina. A solução de Digluconato de Clorexidina a 0,2% (CHX) foi utilizada como grupo controle positivo aplicada sobre discos de dentina (CHXd) e sobre discos de papel (CHXp).

Os discos de dentina de 400 μm de espessura tiveram seu diâmetro reduzido com o auxílio de pontas diamantadas n°1090 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) e lixa de carbetto de silício de granulometria 320 até serem obtidos discos com 8 mm de diâmetro. A superfície oclusal dos discos foi desgastada com lixa de mesma granulometria por 5 segundos para a formação de *smear layer*²² e, em seguida, eles foram circundados com material de impressão à base de poliéter (Impregum Penta Soft, 3M ESPE, Seefeld, Alemanha) usando seringa Penta Elastômera (3M ESPE,

Seefeld, Alemanha), de forma a delimitar uma área de 6 mm de diâmetro para a aplicação dos materiais a serem testados. Os discos preparados permaneceram 24 horas, em solução salina a 0,9%, para a presa do material de impressão e, em seguida, foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos (Anexo 4, Figura A2).

Para a realização do teste de difusão em ágar, as cepas bacterianas padrão foram reativadas em 5mL de BHI caldo (BHITM, Difco Laboratories, Detroit, EUA) e mantidas 24 horas em estufa a 37°C, em condições de microaerofilia. Em seguida, foi realizada uma nova replicação em 5mL de BHI caldo e manutenção por mais 24 horas a 37°C, em condições de microaerofilia, com o objetivo de se obter um inóculo de 10⁹ UFC/mL, correspondente ao nível 8 da escala de McFarland. Para verificar e padronizar a quantidade de microrganismos presentes nos inóculos utilizados para o experimento foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁶.

Alíquotas de 250 µL dos inóculos bacterianos foram espalhadas sobre a superfície de placas de Petri contendo 15mL de BHI ágar. Após a secagem dessa superfície, em cada placa foram inseridos um disco de papel (6 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura) sobre o qual foram pipetados 10 µL da solução de digluconato de clorexidina 0,2% (CHXp) e sete discos de dentina (8 mm de diâmetro e 0,4 mm de espessura), sobre os quais, após remoção do excesso de umidade com o auxílio de papel absorvente, foram pipetados 10 µL de CHX ou dos materiais testados. Quando utilizados o CPB-P+A e o CSEB-P+A foram aplicados 10 µL do primer, após 20 segundos foram aplicados suaves jatos de ar para promover a evaporação do solvente e foram adicionados 10 µL do componente adesivo. Os materiais não foram fotoativados. Para cada microrganismo foram utilizadas seis placas de Petri, totalizando seis espécimes (n=6) para cada grupo e cepa bacteriana (Tabela 2).

As placas foram mantidas por 2 horas à temperatura ambiente para pré-difusão dos materiais e incubadas em estufa a 37°C em condições de microaerofilia por 24 horas para o *S. mutans* e por 48 horas para o *L. acidophilus*. Os halos de inibição produzidos ao redor dos discos de dentina tiveram o seu maior diâmetro tanto no sentido horizontal quanto no vertical mensurados em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Sul Americana, SP, Brasil). A partir desses valores foi calculado o diâmetro médio de cada halo de inibição. Deste foi subtraído o diâmetro do disco de dentina (8 mm), e o resultado foi dividido por dois, obtendo-se, assim, a largura do halo de inibição de cada espécime. Para o controle positivo (CHXp), o cálculo do halo de inibição foi realizado de forma semelhante, exceto que foi subtraído o diâmetro do disco de papel de 6 mm.

A análise estatística para a comparação dos grupos quanto a largura dos halos de inibição foi realizada por meio de testes não paramétricos de Mann-Whitney e, foi realizada, também, a correlação entre permeabilidade dentinária e largura dos halos de inibição (Correlação de Spearman). Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Os valores das larguras dos halos de inibição para cada espécime, de acordo com o grupo e o microrganismo, assim como os valores de permeabilidade dentinária, estão apresentados no Anexo 5. O CPB, o CSEB e o XIII, assim como o primer do CPB e do CSEB, e o líquido B do XIII não apresentaram atividade antibacteriana. A CHX quando aplicada sobre os discos de dentina promoveu efeito inibitório contra *S. mutans* e *L. acidophilus*, efeito este menor quando comparado com a CHX em disco de papel ($p < 0,05$). A CHX apresentou maior atividade

antibacteriana sobre *S. mutans* quando comparado com *L. acidophilus* ($p < 0,05$) (Tabela 3). Não houve correlação entre o grau de permeabilidade dos discos de dentina e o efeito antibacteriano produzido ($r = -0,119$; $p > 0,05$).

Discussão

O *S. mutans* e o *L. acidophilus* são os principais microrganismos associados com o desenvolvimento da cárie dentária, tanto primária quanto secundária,²³ por esta razão, neste trabalho, a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos autocondicionantes foi testada sobre esses microrganismos. Na situação clínica, os sistemas adesivos dentinários são aplicados sobre a superfície da dentina com o objetivo de promover a adesão entre esse substrato e o material restaurador, e, para que eles atuem inibindo os microrganismos que permanecem no interior dos túbulos dentinários precisam apresentar atividade antibacteriana e capacidade de difundir em alguma extensão através da dentina.¹⁸ Porém, na literatura há pouca informação sobre a influência do tecido dentinário nas propriedades antibacterianas dos sistemas adesivos autocondicionantes.^{14,18,24} Neste trabalho foi empregado o método de difusão em ágar utilizando discos de dentina humana de 400 μm de espessura para avaliar a capacidade de difusão dos materiais testados através do tecido dentinário, a difusão no ágar e, conseqüentemente, o efeito antibacteriano sobre os microrganismos analisados.

Foram utilizados os sistemas adesivos CPB, CSEB, XIII, o primer do CPB e do CSEB, e o líquido B do XIII, uma vez que os outros componentes destes sistemas não apresentaram efeito inibitório sobre *S. mutans* e *L. acidophilus* pelo método de difusão em ágar usando disco de papel (dados não publicados). A solução de digluconato de clorexidina 0,2% é um forte agente antibacteriano com amplo

espectro de ação e é usada como substância padrão ouro em diversas pesquisas que avaliam a atividade antibacteriana de produtos odontológicos.^{18,24,25} Como poucos estudos mostram a influência da dentina na sua ação antibacteriana,^{18,24} neste experimento essa substância foi aplicada tanto sobre discos de papel como sobre discos de dentina.

O efeito antibacteriano dos sistemas adesivos dentinários pode ser influenciado por fatores inerentes ao material (pH, viscosidade, poder de difusão, presença de agentes antibacterianos) e por fatores relacionados ao substrato dentinário (espessura e permeabilidade).^{18,25-30} O baixo pH dos sistemas adesivos autocondicionantes conferido pela incorporação de monômeros ácidos é, segundo alguns autores, um dos principais fatores relacionados à sua atividade antibacteriana.^{12,25,26,28} O Phenyl-P, o 4-META e o MDP são os principais monômeros ácidos contidos em sistemas adesivos autocondicionantes capazes de desmineralizar e infiltrar o substrato dentinário simultaneamente, e, de acordo com Ohmori et al.,³¹ o MDP apresenta maior ação contra microrganismos quando comparado com o Phenyl-P. No presente trabalho, apesar de o MDP estar presente no componente primer do CPB e do CSEB, nem o componente primer isoladamente (pH=1,9), nem o primer associado ao adesivo (pH=2,8), apresentaram atividade antibacteriana quando aplicados sobre os discos de dentina. Esta ausência de atividade antibacteriana pode dever-se ao efeito protetor da dentina contra agentes ácidos conferido pela sua capacidade tampão, ou seja, quando em contato com a dentina, a dissolução da apatita dentinária pela ação dos ácidos pode ser neutralizada pela ligação dos íons fosfato e hidroxila da dentina com os prótons H⁺, e quanto maior a espessura de dentina remanescente, maior o efeito tamponante.³²

Schmalz et al.¹⁸ avaliaram o efeito da dentina na atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários, do TEGDMA e do HEMA, sobre *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. acidophilus* por diferentes métodos de difusão em ágar. Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, os sistemas adesivos testados produziram zonas de inibição em torno de discos de dentina bovina. Contudo, os resultados mostraram, também, que a dentina influencia o efeito antibacteriano dos sistemas adesivos de forma a reduzi-lo ou eliminá-lo, corroborando com os resultados do presente trabalho e de outras pesquisas^{24,33} que demonstraram o papel de proteção exercido pelo tecido dentinário. Algumas diferenças metodológicas foram detectadas entre este trabalho e o realizado por Schmalz et al.,¹⁸ as quais podem explicar as diferenças nos resultados obtidos, dentre elas: o tipo e a espessura do disco de dentina e a quantidade de material aplicada. Os discos de dentina usados neste experimento foram provenientes de dentes humanos e apresentavam 400 µm de espessura, e a quantidade de material aplicada sobre cada espécime foi 10 µL, enquanto Schmalz et al.¹⁸ usaram dentina bovina com 200 µm e 500 µm de espessura e aplicaram 20 µL do material. Neste trabalho, também foi confeccionada uma barreira protetora, de forma a evitar o extravasamento do material aplicado sobre os discos de dentina, o que poderia fornecer resultado falso-positivo, cuidado este que não mencionado no trabalho realizado por Schmalz et al.¹⁸

Apesar de a dentina ter ação protetora, esse efeito é limitado,³² pois ela permite a passagem de toxinas resultantes do metabolismo bacteriano e de moléculas hidrofílicas de pequeno tamanho, como as de TEGDMA e de HEMA, que, apesar de não apresentarem efeito bactericida, são citotóxicas.^{19,34,35} A permeabilidade dentinária varia de dente para dente e de região para região no mesmo elemento dental.³⁶ Alguns fatores podem estar relacionados com esta variação, tais como:

disposição anatômica, diâmetro, comprimento e densidade dos túbulos dentinários.³⁶ Assim, a permeabilidade dos discos de dentina utilizados neste estudo foi medida com o intuito de formar grupos experimentais apresentando médias de permeabilidade dentinária estatisticamente semelhantes, para evitar a influência deste fator na comparação dos grupos.

Como a viscosidade do material também pode interferir na sua difusão através dos túbulos dentinários,^{36,37} a diferença de viscosidade apresentada pelos materiais avaliados neste estudo pode ter influenciado os resultados obtidos, visto que somente o digluconato de clorexidina 0,2% (pH=5,9), material de baixa viscosidade, conseguiu permear a smear layer e penetrar nos túbulos dentinários exercendo efeito antibacteriano. Apesar de este efeito ter sido menor do que aquele produzido quando o material foi aplicado sobre discos de papel, mostrando a influência da dentina na atividade antibacteriana, não foi verificada correlação entre o grau de permeabilidade dentinária e a atividade antibacteriana exercida pela CHX.

O Xenon III (líquido A+B) e o líquido B separadamente não apresentaram atividade inibitória sobre as bactérias testadas. No teste de difusão em ágar sobre discos de papel, o Xenon III mostrou o menor efeito inibitório quando comparado aos outros materiais (dados não publicados). Este material, apesar de conter flúor e apresentar o menor pH (pH=1), quando comparado aos demais materiais testados, apresenta-se mais viscoso. Esta viscosidade deve-se à incorporação do UDMA, monômero resinoso com elevado peso molecular, à sua composição.²⁴ Então, sugere-se que as características físicas deste material possam interferir na atividade antibacteriana, dificultando sua difusão através dos túbulos dentinários.

O Bis-GMA é um componente presente na grande maioria dos materiais resinosos e sua concentração na composição de um material pode influenciar na

viscosidade, dificultando sua difusão. Os materiais à base de Bis-GMA são, geralmente, mais viscosos que aqueles à base de HEMA e de UDMA.²⁹ O tipo de solvente também pode influenciar na penetração dos materiais através do tecido dentinário. A acetona e o etanol são solventes que apresentam afinidade por água e facilitam o carreamento do sistema adesivo pela dentina úmida e desmineralizada. Assim, são vários os fatores que, em conjunto, contribuem para a variação na extensão de penetração dos adesivos dentinários no interior dos túbulos, e tem sido relatada a formação de tags resinosos de até 198 μm de comprimento.²⁹

Para inativar lesões de cárie, o material deve selar a superfície da cavidade adequadamente, para privar bactérias viáveis de nutrientes e evitar o ingresso de ácidos, e, simultaneamente, deve conter componentes capazes de inativar as bactérias presentes na lesão.³⁸ No trabalho realizado por Kuramoto et al.,³⁸ os resultados *in vitro* indicaram que os sistemas adesivos autocondicionantes, principalmente quando contém o agente antibacteriano MDPB, são capazes de paralisar lesões de cárie ativa.

O MDPB é um monômero resinoso com ação antibacteriana composto de amônia quaternária com grupo metacrilóil.⁹ O primer do sistema adesivo CPB apresenta, além do MDP, o MDPB e, mesmo contendo este agente antibacteriano, o sistema adesivo CPB não apresentou atividade antibacteriana quando aplicado sobre discos de dentina de 400 μm de espessura. Este resultado é, provavelmente, decorrente da ação tampão exercida pelo tecido dentinário sobre o qual o material foi aplicado, visto que a incorporação do MDPB aos sistemas adesivos não interfere na sua acidez e fluidez, permitindo a sua difusão pelos túbulos dentinários para alcançar e matar as bactérias presentes.²⁹

Em experimento *in vivo*, foi observado que adesivos experimentais contendo MDPB foram capazes de matar bactérias existentes na cavidade preparada de forma

semelhante à clorexidina, e em maior extensão que outros sistemas adesivos autocondicionantes.³⁰ Apesar desses sistemas apresentarem baixo pH (pH = 1,3), sua acidez não foi suficiente para inativar totalmente as bactérias existentes no interior dos túbulos dentinários e a total eliminação dos microrganismos do grupo experimental deveu-se à presença do MDPB em sua composição. Em análise histológica, Imazato et al.³⁰ mostraram que quando aplicado um sistema adesivo experimental contendo MDPB não foram observados invasão bacteriana em direção à cavidade pulpar e sinais de inflamação da polpa, num período de acompanhamento que variou de 7 a 75 dias, sugerindo que este agente antibacteriano é capaz de destruir ou inativar bactérias presentes na cavidade dentária e eliminar os efeitos dos seus produtos tóxicos que levam à resposta inflamatória da polpa. Diferentes resultados foram obtidos para os grupos controle e experimentais utilizando sistemas adesivos autocondicionantes sem MDPB, nos quais foi observada invasão bacteriana em direção à cavidade pulpar resultando em resposta inflamatória.³⁰

Tem sido mostrado que o primer contendo MDPB, mesmo em pequenas concentrações, é mais efetivo em matar microrganismos provenientes de amostras de tecido dentinário humano cariado quando comparado com um primer de pH similar, entretanto, sem este agente antibacteriano. Isto evidencia que a atividade antibacteriana exercida é principalmente derivada da ação do agente antibacteriano.³⁹

Neste trabalho, a clorexidina 0,2% foi o único material a apresentar atividade antibacteriana sobre *S. mutans* e *L. acidophilus*, quando aplicada sobre discos de dentina de 400 µm de espessura. Hebling et al.,⁴⁰ mostraram que a clorexidina reduz, in vivo, a velocidade de degradação da interface de união quando aplicada associada a um sistema adesivo convencional simplificado, após condicionamento do substrato dentinário com ácido fosfórico. Como este agente antibacteriano quando adicionado

a materiais resinosos pode comprometer as propriedades mecânicas do material, por ser solúvel e interferir na formação de polímeros,⁶ sugere-se a realização de pesquisas avaliando a sua aplicação sobre dentina, previamente à utilização de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes, na expectativa de se conseguir uma associação de efeitos (antibacteriano e inibidor de metaloproteinases), sem interferir com as propriedades do sistema adesivo.

A metodologia empregada na presente pesquisa apresenta algumas limitações em reproduzir as condições fisiológicas do complexo dentino-pulpar, como a presença de fluido intratubular e a pressão intra-pulpar. Schmalz et al.³³ demonstraram que a presença de pressão no interior da câmara pulpar artificial associada com substrato dentinário reduz a agressividade do material sendo capaz de minimizar a citotoxicidade de sistemas adesivos sobre células derivadas da polpa dental. Portanto, mesmo já tendo sido relatada a ação antibacteriana do sistema adesivo dentinário contendo MDPB e o efeito protetor exercido pela dentina, é importante que sejam realizadas pesquisas clínicas em seres humanos para avaliar o real efeito inibitório que os sistemas adesivos dentinários apresentam sobre microrganismos cariogênicos.

Conclusão

Independente do tipo de microrganismo utilizado, a dentina em uma espessura de 400 µm atuou como barreira físico-química de proteção, impedindo a ação antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes e reduzindo significativamente a atividade antibacteriana da clorexidina.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Josimeri Hebling pelo auxílio na análise estatística dos dados obtidos. Ao Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho que possibilitou a utilização do aparelho Flodec. A 3M pela doação do material de impressão (Impregum Penta Soft, 3M ESPE, Seefeld, Alemanha). À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

Referências

1. Tyas MJ. Placement and replacement of restorations by selected practitioners. *Australian Dental Journal* 2005; **50**(2):81-89; quiz 127.
2. Mjor IA. Clinical diagnosis of recurrent caries. *Journal of the American Dental Association* 2005; **136**(10):1426-1433.
3. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Research* 1993; **27**(5):402-408.
4. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *British Dental Journal* 1993; **174**(7):245-248.
5. Iost, HI, Costa JH, Rodrigues HH, Rocca RA. Dureza e contaminação bacteriana da dentina após remoção da lesão de cárie. *Revista da ABO Nacional* 1995; **3**(1):25-29.
6. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *Journal of Oral Rehabilitation* 1983; **10**(5):373-381.

7. Wilson SJ, Wilson HJ. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. *Journal of Oral Rehabilitation* 1993; **20**(3):311-319.
8. Kerber LJ, Donly KJ. Caries inhibition by fluoride-releasing primers. *American Journal of Dentistry* 1993; **6**(5):216-218.
9. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *Journal of Dental Research* 1994; **73**(8):1437-1443.
10. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RR, McCabe JF. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *Journal of Dental Research* 1997; **76**(3):768-772.
11. Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endo T, et al. Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems--influence on tensile bond strength and antibacterial effect. *Dental Materials Journal* 2000; **19**(1):65-74.
12. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dental Materials* 2003; **19**(6):449-457.
13. Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *European Journal of Oral Sciences* 2005; **113**(3):245-250.
14. Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dental Materials* 2006; **22**(6):527-532.
15. Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. *Journal of Dental Research* 1994; **73**(10):1641-1645.

16. Jensen OE, Handelman SL. Effect of an autopolymerizing sealant on viability of microflora in occlusal dental caries. *Scandinavian Journal of Dental Research* 1980; **88**(5):382-388.
17. Kramer PF, Zelante F, Simionato MR. The immediate and long-term effects of invasive and noninvasive pit and fissure sealing techniques on the microflora in occlusal fissures of human teeth. *Pediatric Dentistry* 1993; **15**(2):108-112.
18. Schmalz G, Ergucu Z, Hiller KA. Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *Journal of Endodontics* 2004; **30**(5):352-358.
19. Harper DS, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Archives of Oral Biology* 1984; **29**(10):843-848.
20. Svensater G, Larsson UB, Greif EC, Cvitkovitch DG, Hamilton IR. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 1997; **12**(5):266-273.
21. Hanks CT, Craig RG, Diehl ML, Pashley DH. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new in vitro device. *Journal of Oral Pathology* 1988; **17**(8):396-403.
22. Oliveira SS, Pugach MK, Hilton JF, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall Jr GW. The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system. *Dental Materials* 2003; **19**(8):758-767.
23. Svanberg M, Mjor IA, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *Journal of Dental Research* 1990; **69**(3):861-864.

24. Turkun LS, Ates M, Turkun M, Uzer E. Antibacterial activity of two adhesive systems using various microbiological methods. *The Journal of Adhesive Dentistry* 2005; **7**(4):315-320.
25. Baseren M, Yazici AR, Ozalp M, Dayangac B. Antibacterial activity of different generation dentin-bonding systems. *Quintessence International* 2005; **36**(5):339-344.
26. Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *Journal of Dentistry* 1998; **26**(3):267-271.
27. Imazato S, Imai T, Ebisu S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. *American Journal of Dentistry* 1998; **11**(3):106-108.
28. Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *American Journal of Dentistry* 2002; **15**(6):356-360.
29. Imazato S, Walls AW, Kuramoto A, Ebisu S. Penetration of an antibacterial dentine-bonding system into demineralized human root dentine in vitro. *European Journal of Oral Sciences* 2002; **110**(2):168-174.
30. Imazato S, Kaneko T, Takahashi Y, Noiri Y, Ebisu S. In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. *Operative Dentistry* 2004; **29**(4):369-375.
31. Ohmori K, Maeda N, Kohno A. Evaluation of antibacterial activity of three dentin primers using an in vitro tooth model. *Operative Dentistry* 1999; **24**(5):279-285.
32. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *Journal of Endodontics* 2005; **31**(5):396-399.

33. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *Journal of Endodontics* 2002; **28**(3):188-192.
34. Hamid A, Hume WR. The effect of dentine thickness on diffusion of resin monomers in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation* 1997; **24**(1):20-25.
35. Reichl FX, Walther UI, Durner J, Kehe K, Hickel R, Kunzelmann KH, et al. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dental Materials* 2001; **17**(2):95-101.
36. Ozok AR, Wu MK, Wesselink PR. Comparison of the in vitro permeability of human dentine according to the dentinal region and the composition of the simulated dentinal fluid. *Journal of Dentistry* 2002; **30**(2-3):107-111.
37. Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archives of Oral Biology* 1976; **21**(6):355-362.
38. Kuramoto A, Imazato S, Walls AW, Ebisu S. Inhibition of root caries progression by an antibacterial adhesive. *Journal of Dental Research* 2005; **84**(1):89-93.
39. Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *Journal of Oral Rehabilitation* 2001; **28**(4):314-319.
40. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *Journal of Dental Research* 2005; **84**(8):741-746.

Tabela 1 - Apresentação e principais componentes dos materiais utilizados na pesquisa

Material (Fabricante)	Classificação	Composição	pH	Lote
Clearfill Protect Bond (Kuraray Medical Inc. Okayama, Japan)	Sistema adesivo autocondicionante de 2 passos	<i>Primer:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófilo, MDPB, água <i>Adesivo:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófobo, N, dietanol N-toluidina-p, CQ, Sílica coloidal silanizada, BisGMA, fluoreto de sódio	1,9 2,8	41137
Clearfill SE Bond (Kuraray Medical Inc., Okayama, Japan)	Sistema adesivo autocondicionante de 2 passos	<i>Primer:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófilo, N, dietanol N-toluidina-p, CQ, água <i>Adesivo:</i> HEMA, MDP, dimetacrilato hidrófobo, N, dietanol N-toluidina-p, CQ, Sílica coloidal silanizada, BisGMA,	1,9 2,8	51308
XenoIII (Dentsply, Konstanz, Germany)	Sistema adesivo autocondicionante de passo único	Líquido A: HEMA, água, etanol, THB, sílica amorfa Líquido B: Piro-EMA, PEM-F, UDMA, THB, CQ, etil-4-dimetilaminobenzoato	1,0 (misturado)	0504002710
Clorexidina 0,2% (Farmácia Escola –UNESP, Araraquara, SP, Brasil)	Solução Antibacteriana	Solução aquosa de Digluconato de clorexidina 0,2%	5,9	-

BisGMA: bisfenol A diglicidilmetacrilato; THB: tolueno hidróxibutilato; CQ: D,1-canforoquinona; HEMA: 2-hidroxietilmetacrilato; MDP: 10-metacrilóiloxidecil dihidrogênio fosfato; MDPB: brometo 12-metacrilóiloxidodecílpiridínio; PEM-F: mono fluoro fosfazeno modificado; Piro-EMA: metacrilato funcionalizado com ácido fosfórico; UDMA: dimetacrilato uretano.

Tabela 2 – Distribuição dos espécimes de acordo com o material e a espécie bacteriana selecionada

Microrganismos	Material								Total
	CHXp	CHXd	CPB P	CPB P+A	CSEB P	CSEB P+A	XIII B	XIII A+B	
<i>Streptococcus mutans</i> UA 159	6	6	6	6	6	6	6	6	42d 6p
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC # IAL-523	6	6	6	6	6	6	6	6	42d 6p
Total	12	12	12	12	12	12	12	12	84d 12p

CHX = Digluconato de clorexidina 0,2%; CPB-P = Clearfil Protect Bond – primer; CPB-P+A = Clearfil Protect Bond – primer + adesivo; CSEB-P = Clearfil SE Bond – primer; CSEB-P+A = Clearfil SE Bond – primer + adesivo; XIII-B = Líquido B do Xenio-III; XIII-A + B = Líquido A e B do Xenio III; d = dentina; p = papel.

Tabela 3 - Larguras das zonas de inibição (mm) obtidas sobre *S. mutans* e *L. acidophilus* (mediana, mínimo e máximo) segundo o grupo de estudo

Grupo	Microorganismo	
	<i>S. mutans</i>	<i>L. acidophilus</i>
Clorexidina em disco de papel (CLXp)	6,34 (5,68-7,17) Aa	5,45(4,50-6,31) Ba
Clorexidina em disco de dentina (CLXd)	2,80(1,12-3,70) Ab	1,02(0,78-1,61) Bb
Clearfil Protect Bond - primer (CPB-P)	0	0
Clearfil Protect Bond - primer+adesivo (CPB-P+A)	0	0
Clearfil SE Bond - primer (CSEB-P)	0	0
Clearfil SE Bond – primer+adesivo (CSEB-P+A)	0	0
Xeno III B (X III-B)	0	0
Xeno III A+B (X III-A+B)	0	0

*Valores seguidos por letras maiúsculas iguais nas linhas e letras minúsculas iguais nas colunas não são diferentes estatisticamente (Mann-Whitney, $p>0,05$).

Considerações finais

Considerações finais

Com base nos trabalhos que mostram que as técnicas que visam a completa remoção de tecido cariado não são efetivas em eliminar totalmente as bactérias presentes na dentina^{17,23} e, além disso, com a conduta atual de mínima invasão aos tecidos dentários, pressupõe-se que uma maior quantidade de microrganismos permaneça na dentina. Neste contexto, o selamento hermético da cavidade é primordial para garantir a longevidade da restauração, e, os sistemas adesivos dentinários, apesar de apresentarem boas propriedades físicas e mecânicas, ainda permitem algum grau de infiltração marginal.

O processo de simplificação das técnicas operatórias das restaurações adesivas resultou no desenvolvimento de sistemas adesivos autocondicionantes, que apresentam na sua composição monômeros resinosos com grupamentos funcionais ácidos, com conseqüente redução do pH do material. O baixo pH desses sistemas adesivos é, de acordo com alguns autores, capaz de inibir o crescimento bacteriano.^{9,31} Entretanto, as principais bactérias cariogênicas, *S. mutans* e *Lactobacillus*, têm a capacidade de sobreviver em meios com baixos valores de pH,²⁷ e de desenvolverem mecanismos de adaptação capazes de aumentar a sua sobrevivência em meio ácido.^{6,33} Além disso, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, e em comum com outros autores,^{31,34} a acidez auxilia, mas não assegura a completa eliminação dos microrganismos, uma vez que outros fatores como a viscosidade do material, a adição de agentes antibacterianos e a espessura e permeabilidade do substrato dentinário, podem interferir no efeito antibacteriano.^{12,13,30,31,34}

A presença de monômeros de alto peso molecular como o BisGMA e o UDMA aumentam a viscosidade do material, reduzindo assim a sua difusão pelos

túbulos dentinários, o que pode dificultar o contato com bactérias localizadas em maior profundidade na dentina.^{30,31,34}

Todos esses fatores tornam a adição de agentes antibacterianos aos sistemas adesivos dentinários de extrema importância para auxiliar na eliminação da infecção residual.¹⁶ Agentes antibacterianos solúveis, tal como a clorexidina, quando adicionados aos materiais resinosos podem comprometer as propriedades mecânicas do material, resultando em menor longevidade da interface de união e, conseqüentemente, da restauração.¹⁹ De acordo com Jedrychowski et al.,¹⁹ as alterações nas propriedades físicas dos materiais resinosos contendo clorexidina devem-se à interrupção na formação de polímeros causada pela presença desse agente no interior da matriz. Dessa forma, a incorporação de agentes antibacterianos não solúveis aos adesivos dentinários parece ser mais viável, pois estes exercem sua ação antibacteriana sem interferir na longevidade da interface de união e, conseqüentemente, na longevidade da restauração.

A incorporação do agente antibacteriano MDPB aos sistemas adesivos parece ser promissora visto que os trabalhos laboratoriais e em animais mostram sua eficácia em eliminar bactérias.^{11,13,26,31} Seu mecanismo de ação se dá por contato entre os radicais de amônia quaternária do material e os componentes da parede celular da bactéria, o que provoca alteração funcional ao nível de membrana com conseqüente extravasamento do conteúdo citoplasmático, culminando com a morte celular.⁷ Imazato et al.¹³ mostraram que o Clearfil Protect Bond contendo o MDPB foi efetivo na erradicação de bactérias na dentina, enquanto que na ausência do agente antibacteriano, algumas bactérias permaneceram vivas. Estes resultados contribuem para mostrar que a acidez do sistema autocondicionante por si só não é efetiva em eliminar bactérias na dentina contaminada.

Outra vantagem da incorporação do MDPB a sistemas adesivos, está relacionada com a sua capacidade de co-polimerizar com outros monômeros resinosos formando ligações covalentes e proporcionando uma interface de união estável e vida útil prolongada da restauração.^{9,15} Em estudo realizado por Imazato et al.¹⁴ foi observado que após três meses de estocagem em água, as propriedades mecânicas de resinas compostas contendo MDPB permaneceram inalteradas, sendo também observado no estudo de Imazato, McCabe⁷ que a adição deste agente não interfere no processo de polimerização da resina composta, podendo ocorrer, inclusive, uma leve melhora no grau de conversão de monômeros em polímeros e na profundidade de polimerização quando comparado ao controle sem MDPB.

Embora existam evidências científicas a nível laboratorial que mostram o efeito antibacteriano dos sistemas adesivos que contém o agente antibacteriano MDPB, ainda são necessários outros estudos que comprovem sua real atividade antibacteriana sobre o substrato dentinário e, estudos clínicos em humanos, nos quais esses materiais sejam utilizados em situações de remoção parcial ou total do tecido cariado. Desta forma, poderá ser avaliada com maior precisão a capacidade antibacteriana destes materiais e, conseqüentemente, poderá se afirmar com maior segurança a sua real contribuição em eliminar a contaminação bacteriana residual na dentina.

Conclusão

Conclusão

- 1.** A presença do monômero antibacteriano MDPB no sistema adesivo dentinário parece ser importante para a atividade antibacteriana sobre bactérias cariogênicas. A fotoativação reduziu a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos dentinários testados.
- 2.** A fotoativação reduziu significativamente a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos testados.
- 3.** A dentina atua como barreira físico-química de proteção eliminando ou reduzindo a ação antibacteriana de materiais odontológicos.

Referências

Referências*

1. Carvalho RM, Pereira JC, Yoshiyama M, Pashley DH. A review of polymerization contraction: the influence of stress development versus stress relief. *Oper Dent.* 1996; 21:17-24.
2. Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod.* 2005; 31:396-9.
3. Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol.* 1976;21:355-62.
4. Haller B, Trojanski A. Effect of multi-step dentin bonding systems and resin-modified glass ionomer cement liner on marginal quality of dentin-bonded resin composite Class II restorations. *Clin Oral Investig.* 1998; 2:130-6.
5. Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113:245-50.
6. Harper DS, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch Oral Biol.* 1984; 29:843-8.
7. Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. *J Dent Res.* 1994; 73:1641-5.
8. Imazato S, Imai T, Ebisu S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. *Am J Dent.* 1998;11:106-8.
9. Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *J Dent.* 1998; 26:267-271.

* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Imazato S, Walls AW, Kuramoto A, Ebisu S. Penetration of an antibacterial dentine-bonding system into demineralized human root dentine in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110:168-74.
11. Imazato S, Kaneko T, Takahashi Y, Noiri Y, Ebisu S. In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. *Oper Dent.* 2004; 29:369-75.
12. Imazato S, Kuramoto A, Kaneko T, Ebisu S, Russell RR. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. *Am J Dent.* 2002; 15:356-60.
13. Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. *Dent Mater.* 2006; 22:527-32.
14. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RR. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res.* 1994; 73:1437-43.
15. Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Torii M, Russell RR, McCabe JF. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *J Dent Res.* 1997; 76:768-72.
16. Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Rehabil* 2001; 28:314-9.
17. Iost HI, Costa JH, Rodrigues HH, Rocca RA. Dureza e contaminação bacteriana da dentina após remoção da lesão de cárie. *Rev ABO Nac.* 1995; 3:25-9.

18. Itota T, Nakabo S, Iwai Y, Konishi N, Nagamine M, Torii Y. Inhibition of artificial secondary caries by fluoride-releasing adhesives on root dentin. *J Oral Rehabil.* 2002; 29:523-7.
19. Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil.* 1983; 10:373-81.
20. Jensen OE, Handelman SL. Effect of an autopolymerizing sealant on viability of microflora in occlusal dental caries. *Scand J Dent Res.* 1980; 88:382-8.
21. Kerber LJ, Donly KJ. Caries inhibition by fluoride-releasing primers. *Am J Dent.* 1993; 6:216-8.
22. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res.* 1993; 27:402-8.
23. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *Br Dent J.* 1993; 174:245-8.
24. Kramer PF, Zelante F, Simionato MR. The immediate and long-term effects of invasive and noninvasive pit and fissure sealing techniques on the microflora in occlusal fissures of human teeth. *Pediatr Dent.* 1993; 15:108-12.
25. Kudou Y, Obara K, Kawashima T, Kubota M, Abe S, Endo T, et al. Addition of antibacterial agents to MMA-TBB dentin bonding systems--influence on tensile bond strength and antibacterial effect. *Dent Mater J.* 2000; 19:65-74.
26. Kuramoto A, Imazato S, Walls AW, Ebisu S. Inhibition of root caries progression by an antibacterial adhesive. *J Dent Res.* 2005; 84:89-93.

27. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50:353-80.
28. Luglie PF, Delitala PP, Zanetti S, Sanna S. An in-vivo bacteriological study on the effects of acid etching at the bottom of cavities. *Minerva Stomatol.* 1998; 47:19-26.
29. Mjor IA. Clinical diagnosis of recurrent caries. *J Am Dent Assoc.* 2005; 136:1426-33.
30. Ozok AR, Wu MK, Wesselink PR. Comparison of the in vitro permeability of human dentine according to the dentinal region and the composition of the simulated dentinal fluid. *J Dent.* 2002; 30:107-11.
31. Schmalz G, Ergucu Z, Hiller KA. Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *J Endod.* 2004; 30:352-8.
32. Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod.* 2002; 28:188-92.
33. Svensater G, Larsson UB, Greif EC, Cvitkovitch DG, Hamilton IR. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12:266-73.
34. Turkun LS, Ates M, Turkun M, Uzer E. Antibacterial activity of two adhesive systems using various microbiological methods. *J Adhes Dent.* 2005; 7:315-20.
35. Tyas MJ. Placement and replacement of restorations by selected practitioners. *Aust Dent J.* 2005; 50:81-9.
36. Wilson SJ, Wilson HJ. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. *J Oral Rehabil.* 1993; 20:311-9.

Anexos

Anexo 1

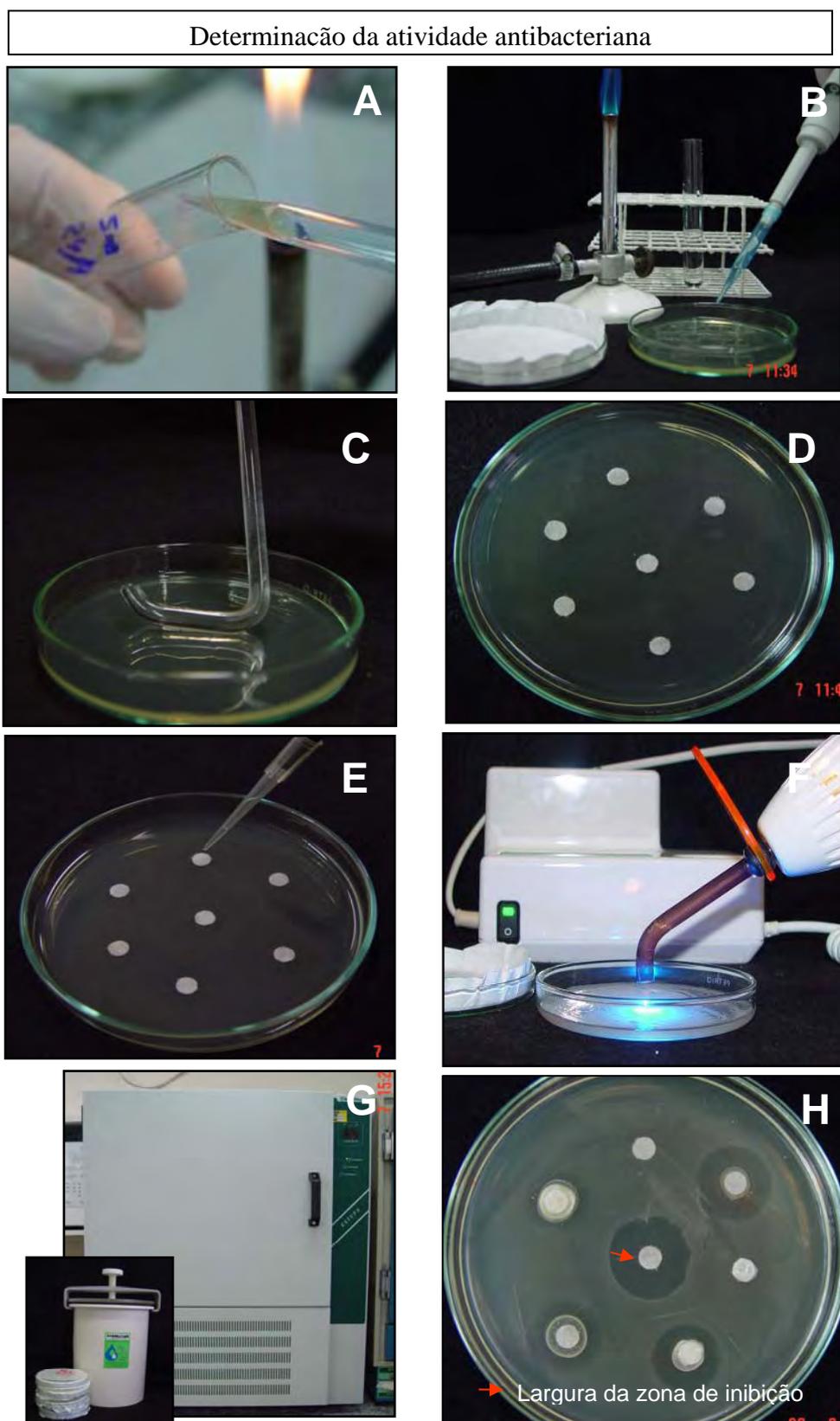


Figura A1. (A) - Obtenção do inóculo; (B) – Aplicação de 250 μ l da suspensão bacteriana em placa de Petri contendo BHI ágar; (C) – Distribuição da suspensão bacteriana com o auxílio de alça de vidro; (D) – Inserção dos discos de papel; (E) – Aplicação dos materiais teste; (F) – Aplicação de luz halógena nos grupos que foram submetidos à fotoativação; (G) – Incubação das placas em ambiente de microaerofilia; (H) - Mensuração das larguras dos halos de inibição.

Anexo 2Tabela A1 - Largura dos halos de inibição, em milímetros, em torno dos discos de papel para *S. mutans* e *L. acidophilus*

Material	Espécime	Microorganismos			
		<i>S. mutans</i>		<i>L. acidophilus</i>	
		Sem fotoativação	Com fotoativação	Sem fotoativação	Com fotoativação
CHX	1	3,88	5,88	4,03	4,19
	2	4,33	5,04	5,44	4,24
	3	4,92	4,40	5,15	4,84
	4	4,84	5,43	4,97	4,27
	5	5,57	5,13	5,15	4,67
	6	4,62	4,82	4,65	4,03
	7	4,68	5,15	4,73	5,93
	8	5,00	5,05	5,19	5,59
DP	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
CPB-P	1	5,21	4,84	7,54	6,50
	2	5,90	4,73	8,37	6,62
	3	5,10	4,99	7,09	7,64
	4	3,65	4,12	7,33	6,93
	5	6,56	4,51	6,99	7,18
	6	4,38	3,84	7,19	7,29
	7	4,78	5,54	7,12	6,94
	8	5,00	4,78	7,07	6,34
CPB-A	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
CPB-P+A	1	6,74	5,09	6,59	5,95
	2	6,90	6,13	6,46	6,33
	3	6,55	6,07	6,54	6,13
	4	6,94	5,47	6,49	6,58
	5	7,74	4,56	7,00	5,91
	6	6,20	4,40	6,21	5,62
	7	7,01	5,00	6,65	6,59
	8	6,94	4,08	6,51	6,12
CSEB-P	1	5,99	6,26	5,99	6,26
	2	5,84	6,98	5,84	6,98
	3	6,24	7,48	6,24	7,48
	4	6,58	5,65	6,58	5,65
	5	6,62	5,54	6,62	5,54
	6	6,03	4,05	6,03	4,05
	7	6,51	4,05	6,51	4,05
	8	7,46	3,65	7,46	3,65

Continua

Continuação

Material	Espécime	Microrganismos			
		<i>S. mutans</i>		<i>L. acidophilus.</i>	
		Sem fotoativação	Com fotoativação	Sem fotoativação	Com fotoativação
CSEB-A	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
CSEB-P+A	1	6,40	5,73	6,40	5,73
	2	6,19	5,28	6,19	5,28
	3	6,85	5,47	6,85	5,47
	4	7,05	5,77	7,05	5,77
	5	6,32	5,52	6,32	5,52
	6	6,49	6,13	6,49	6,13
	7	6,70	5,84	6,70	5,84
	8	6,55	5,19	6,55	5,19
C3SB	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
XIII-A	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	0	0
	7	0	0	0	0
	8	0	0	0	0
XIII-B	1	3,33	2,31	0,78	0,42
	2	3,06	1,97	0,40	0,38
	3	3,04	2,06	0,48	0,26
	4	2,94	1,90	0,18	0,23
	5	2,38	1,79	1,14	0,92
	6	2,58	3,21	1,07	0,96
	7	3,24	3,98	0,68	0,80
	8	4,80	2,28	0,73	0,74
XIII-A+B	1	3,26	1,16	0,58	1,81
	2	2,19	1,50	0,82	0,72
	3	2,30	1,41	0,61	1,43
	4	2,81	1,51	0,66	1,29
	5	1,06	1,46	1,67	0,55
	6	2,55	1,49	2,02	0,49
	7	2,04	1,24	1,10	0,58
	8	1,70	0,73	1,21	0,73

Anexo 3

Certificado Comitê de Ética em Pesquisa

Número do protocolo: 54/05



Anexo 4

Obtensão dos discos de dentina

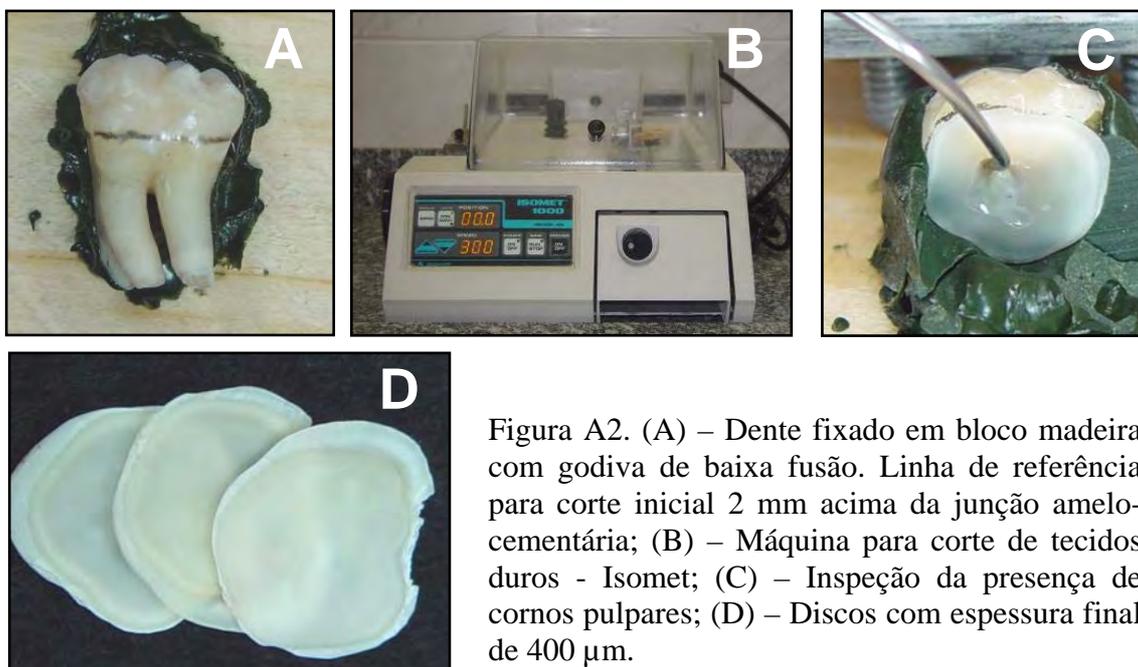


Figura A2. (A) – Dente fixado em bloco madeira com godiva de baixa fusão. Linha de referência para corte inicial 2 mm acima da junção amelo-cementária; (B) – Máquina para corte de tecidos duros - Isomet; (C) – Inspeção da presença de cornos pulpares; (D) – Discos com espessura final de 400 µm.

Confecção dos espécimes de dentina

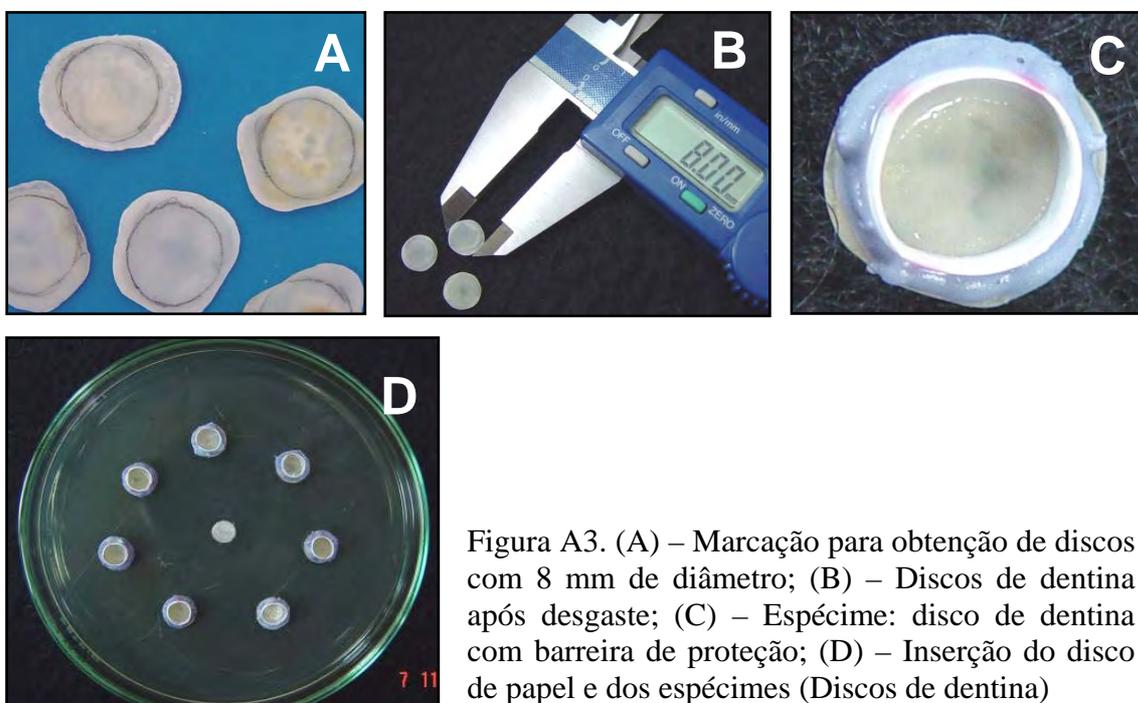


Figura A3. (A) – Marcação para obtenção de discos com 8 mm de diâmetro; (B) – Discos de dentina após desgaste; (C) – Espécime: disco de dentina com barreira de proteção; (D) – Inserção do disco de papel e dos espécimes (Discos de dentina)

Anexo 5

Valor da permeabilidade dentinária de cada disco de dentina, seguido do respectivo valor da largura do halo de inibição

Grupo	Disco	Microorganismo			
		<i>S.mutans</i>		<i>L. acidophilus</i>	
		Permeabilidade dentinária	Halo de inibição	Permeabilidade dentinária	Halo de inibição
CLXp	1	-	7,17	-	4,50
	2	-	5,68	-	5,20
	3	-	6,15	-	5,38
	4	-	6,84	-	5,68
	5	-	6,54	-	6,31
	6	-	6,09	-	5,53
CLXd	1	0,1638	2,74	0,1715	0,78
	2	0,2333	3,41	0,2381	1,15
	3	0,4289	2,65	0,4258	0,96
	4	0,5646	2,87	0,5668	1,61
	5	0,6150	3,70	0,6168	1,08
	6	0,7801	1,12	0,7529	0,96
CPB-P	1	0,1598	0	0,1536	0
	2	0,2359	0	0,2357	0
	3	0,4073	0	0,4093	0
	4	0,5551	0	0,5492	0
	5	0,6092	0	0,6108	0
	6	0,7212	0	0,7293	0
CPB-P+A	1	0,2055	0	0,2045	0
	2	0,4540	0	0,4586	0
	3	0,4668	0	0,4667	0
	4	0,5579	0	0,5692	0
	5	0,6544	0	0,6585	0
	6	0,7048	0	0,7060	0
CSEB-P	1	0,1870	0	0,1685	0
	2	0,4808	0	0,4808	0
	3	0,4970	0	0,4987	0
	4	0,5243	0	0,5427	0
	5	0,5907	0	0,5975	0
	6	0,7416	0	0,7492	0
CSEB-P+A	1	0,2801	0	0,2872	0
	2	0,3284	0	0,3233	0
	3	0,3448	0	0,3474	0
	4	0,5295	0	0,5388	0
	5	0,5952	0	0,6010	0
	6	0,7713	0	0,7884	0
XIII-A	1	0,1190	0	0,1195	0
	2	0,2931	0	0,2915	0
	3	0,3872	0	0,3933	0
	4	0,4914	0	0,5044	0
	5	0,5747	0	0,5788	0
	6	0,7120	0	0,7065	0
XIII-A+B	1	0,1245	0	0,1273	0
	2	0,2920	0	0,3030	0
	3	0,3820	0	0,3750	0
	4	0,5141	0	0,5035	0
	5	0,5850	0	0,5873	0
	6	0,6701	0	0,6954	0