



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
- MESTRADO



BRUNA CAROLINE DE OLIVEIRA LIMA

Ação da clorexidina na resistência de união e na atividade antibacteriana de
diferentes sistemas adesivos: estudo *in vitro*.

Cascavel

2017

BRUNA CAROLINE DE OLIVEIRA LIMA

Ação da clorexidina na resistência de união e na atividade antibacteriana de diferentes sistemas adesivos: estudo *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Veridiana Camilotti.

Cascavel

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L696a

Lima, Bruna Caroline de Oliveira

Ação da clorexidina na resistência de união e na atividade antibacteriana de diferentes sistemas adesivos: estudo in vitro. / Bruna Caroline de Oliveira Lima.-- Cascavel, PR: 2017.

38 f.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Veridiana Camilotti

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Campus de Cascavel, 2017

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

1. Odontologia. I. Camilotti, Veridiana. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 20.ed. 617.6

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9^ª/965



Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

BRUNA CAROLINE DE OLIVEIRA LIMA

Efeito da ação de diferentes concentrações de clorexidina na resistência de união e atividade antibacteriana de diferentes sistemas adesivos: in vitro

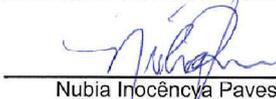
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Materiais Dentários Aplicados À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Rafael Andrade Menolli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Orientador(a) - Veridiana Camilotti

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Nubia Inocência Pavesi Pini

Centro Universitário Ingá (UNINGA)

Cascavel, 10 de fevereiro de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me colocar nesse caminho que eu não imaginava estar; por me guiar e me dar forças nos momentos em que achei que não tinha o necessário. Agradeço a Deus por colocar na minha vida todas as pessoas que vêm a seguir e, que contribuíram de alguma forma para que esse trabalho tenha se tornado realidade.

Aos meus pais, Luiz e Neuza, por me incentivarem e apoiarem em todos os momentos fosse com palavras de encorajamento, com um abraço ou mesmo por continuarem cuidando de mim em sua casa.

As minhas irmãs, Dayanne e Brenda, pela compreensão e carinho mesmo quando eu não me compreendia.

Ao meu grande incentivador, Felipe, que no momento em que estive mais distante e displicente me ajudou a ver com clareza que eu posso e que sou capaz de realizar grandes feitos em minha vida, e que mesmo os menores deles devem ser celebrados com carinho e felicidade.

A minha orientadora, Prof^ª Dr. Veridiana Camilotti, que com muita paciência e leveza me ensinou a pesquisar, ser paciente, apreender com meus erros, e ter vontade de ser cada vez mais um pouquinho da grande mestre que ela é.

Ao Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli, por compartilhar um pouco do seu tempo e conhecimento, pela sua orientação com os testes antibacterianos.

A todos os professores do corpo docente do programa de Mestrado em Odontologia da UNIOESTE, pelos ensinamentos de grande valia durante estes dois anos.

Ao responsável pelo Laboratório II durante os meses de minha pesquisa, Elton, por toda ajuda prestada.

Aos meus amigos da terceira turma de Mestrado, obrigada por serem pessoas maravilhosas e contribuírem para meu crescimento pessoal e intelectual, sem vocês não teria sido tão bom.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para meu trabalho, ajudando de qualquer maneira, seja com palavras de incentivo ou até mesmo dedicando um pouco do seu tempo.

Ação da clorexidina na resistência de união e na atividade antibacteriana de diferentes sistemas adesivos: estudo *in vitro*.

RESUMO

A clorexidina nos últimos anos tem sido utilizada na Odontologia para melhoria da camada híbrida e conseqüentemente maior durabilidade das restaurações estéticas diretas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito da clorexidina (CHX) nas interfaces adesivas, por meio do teste de microcisalhamento e da atividade antibacteriana da CHX incorporada a diferentes sistemas adesivos, após 24 horas e 30 dias de imersão em solução de água destilada. Foram selecionadas 150 coroas de incisivos bovinos divididas em três grupos: **G1**: sistema adesivo Single Bond Plus; **G2**: sistema adesivo Clearfil SE Bond; **G3**: sistema adesivo AdheSE Primer e Bond. Todos os grupos foram subdivididos de acordo com a concentração de CHX (n=5): sem CHX, com CHX previamente ao adesivo e incorporado com CHX a 0,5%, 1,0% e 2,0%. O teste de microcisalhamento foi realizado com metade dos corpos de prova (CP) após 24 horas e com a outra metade após 30 dias. Posteriormente também foram avaliados os modos de fratura. Testes antibacterianos de difusão em ágar com *Streptococcus mutans* foram realizados aos grupos com CHX. A variável Resistência de União foi avaliada por meio da Análise da Variância fatorial para medidas repetidas. Já a variável tamanho do halo bacteriano foi submetida ao teste não paramétrico de Kruskal – Wallis, ambos com nível de significância de 5%. A variável qualitativa de padrão de fraturas foi avaliada por meio de análise estatística descritiva. Assim pode-se concluir que as concentrações de CHX com 0,5 e 1%, valor de $p > 0,05$, contribuíram para o aumento dos valores de resistência de união e o sistema adesivo Clearfil SE Bond teve as maiores médias no teste de microcisalhamento. O sistema adesivo AdheSE Bond apresentou os melhores resultados no teste antibacteriano com *S.mutans*.

Palavras-chave: Clorexidina, adesivo dentinário, resistência de união, *Streptococcus mutans*.

Action of chlorhexidine on the bond strength and on antibacterial activity of different adhesive systems: in vitro study.

ABSTRACT

Chlorhexidine in recent years has been used in dentistry for the improvement of the hybrid layer and consequently greater durability of direct aesthetic restorations. Thus, the objective of this work can be applied *in vitro* or the effect of chlorhexidine (CHX) on the adhesive interfaces, through the microshear bond strength test and the antibacterial activity of CHX incorporated to different adhesive systems, after 24 hours and 30 days of immersion in solution distilled water. We selected 150 crowns of bovine incisors divided into three groups: G1: Single Bond Plus adhesive system; G2: Clearfil SE Bond adhesive system; G3: adhesive system AdheSE Primer and Bond. All groups were subdivided according to the incorporation of CHX (n = 5): no CHX, with CHX prior to incorporated with 0.5%, 1.0% and 2.0% CHX. The micro-shear test was performed with half the CP after 24 hours and with another medium for 30 days. Later, the fracture modes were also found. Antibacterial diffusion tests on agar with *Streptococcus mutans* were performed with the same groups and subgroups. The Bond Strength variable was evaluated between the groups and solutions by means of the Factor Variance Analysis for repeated measurements. However, the variable size of the bacterial halo was submitted to Kruskal - Wallis non - parametric test, both with a significance level of 95%. The qualitative variability of fractures was evaluated through descriptive statistical analysis. The concentrations of CHX with 0.5 and 1% contributed to the increase of bond strength values and the Clearfil SE Bond system had the highest mean values in the microshear bond strength test. The AdheSE Bond adhesive system presents the best results without antibacterial testing with *S.mutans*.

Keywords: Chlorhexidine, dentin adhesive, bond strength, *Streptococcus mutans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Diagrama 1- Distribuição dos grupos.....	13
Quadro 1- Descrição dos materiais.....	13
Tabela 1- Médias e desvio padrão da variável resistência de união.....	17
Tabela 2- Médias e desvio padrão de diâmetro do halo bacteriano.....	18
Figura 1- Frequência absoluta da ocorrência de fraturas adesiva, mista e coesiva de G1, G2 e G3 em 24 horas e 30 dias.....	19

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas das publicações científicas: Brazilian
Dental Journal (artigo 1) Disponível em:
<http://www.scielo.br/revistas/bdj/pinstruc.htm>

SUMÁRIO

1 Introdução.....	9
2 Metodologia.....	11
3 Resultados	17
4 Discussão.....	20
5 Conclusão	23
6 Referências bibliográficas	24
7 Anexos.....	28

“Ação da clorexidina na resistência de união e na atividade antibacteriana de diferentes sistemas adesivos: estudo *in vitro*”

Introdução

Atualmente os sistemas adesivos podem ser classificados em convencionais e autocondicionantes. Sistemas adesivos convencionais são aqueles que necessitam do condicionamento com ácido fosfórico em etapa separada e podem ser encontrados no mercado como sistemas de três passos (condicionamento ácido, primer e adesivo com componentes resinosos hidrofílicos ou hidrofóbicos) e dois passos (primer e adesivo são apresentados em um frasco). Já os sistemas adesivos autocondicionantes, não necessitam de condicionamento ácido prévio e podem ser encontrados como sistemas de dois passos (primer autocondicionante e adesivo), e os adesivos *all-in-one*, combinando os três pontos principais em um frasco (Salz, U., *et al.*, 2005; Langer & Illie., 2013; Tay, FR., *et al.*, 2002).

A técnica de condicionamento ácido total utilizado pelos sistemas adesivos convencionais promove retenções micromecânicas entre o colágeno dentinário, o monômero adesivo e a resina composta, formando uma camada híbrida ou zona de interdifusão dentina/resina. Apesar de apresentarem efetividade na adesão, estes adesivos causam discrepância entre a profundidade de desmineralização realizada pelo ácido e a difusão do monômero. A dentina desmineralizada e não infiltrada pelo adesivo pode ativar a ação das enzimas metaloproteinases (MMPs) responsáveis pela degradação em longo prazo da camada híbrida (Breschi, L., *et al.*, 2010; Araujo, MS., *et al.*, 2015; Hajizadeh, H., *et al.*, 2013).

Já os adesivos autocondicionantes utilizam monômeros com grupos funcionais carboxílicos ou fosfatos que em contato com a água são ionizados, tornam-se ácidos, atravessam a *smear layer*, que é composta de pequenas partículas de matriz colágena mineralizada, bem como partículas dentinárias inorgânicas, saliva, sangue e numerosos microorganismos, e simultaneamente desmineralizam e se difundem na dentina, eliminando a etapa do condicionamento ácido (Breschi, L., *et al.*, 2008., Locatelli, PB., 2004). Assim, toda a extensão de dentina desmineralizada é infiltrada por monômeros resinosos diminuindo a ação das MMPs (Strobel S., Hellwig E., 2015).

Foram propostas diferentes abordagens para melhorar a resistência de união e infiltração dos monômeros na dentina desmineralizada a fim de reduzir a taxa de absorção de água e a degradação das fibras colágenas expostas (Breschi, L., *et al.*, 2008). Dentre as abordagens, a mais frequente citada na literatura é a utilização dos inibidores das MMPs sendo o representante mais documentado a clorexidina (CHX). A clorexidina (CHX) é um anti-séptico bucal amplamente utilizado, com uma baixa toxicidade e um largo espectro de atividade antibacteriana (Hajizadeh, H., *et al.*, 2013). Possui uma molécula anfifílica que se

liga a várias proteínas por um mecanismo de quelação catiônica e pode inibir a atividade catalítica de MMPs por ligação com Zn^{+2} ou Ca^{+2} . A utilização de CHX no protocolo de união após a desmineralização com ácido fosfórico, para estabilizar a interface de união e evitar a degradação da resistência de ligação ao longo do tempo foi previamente demonstrada (Ricci, HA., *et al.*, 2010). Embora uma relação entre a atividade colagenolítica da dentina e o papel das MMPs na degradação da camada híbrida foram previamente relatadas, o mecanismo exato de como a CHX inibe MMPs ainda requer elucidação adicional. O uso da CHX na composição dos sistemas adesivos pode auxiliar na inibição das MMPs e proporcionar um efeito bactericida efetivo podendo ser uma alternativa para suprimir a contaminação residual após a remoção da cárie e aumentar a longevidade do dente restaurado (Montagner, AF., *et al.*, 2014). Além disso, esses adesivos poderiam evitar a colonização de bactérias nas lacunas formadas pela contração de polimerização das resinas compostas e degradação da interface adesiva. Contudo, os efeitos da adição de clorexidina em agentes de união ainda permanecem desconhecidos (André, CB., *et al.*, 2015).

Para simular o tempo e as condições a que as restaurações serão expostas na boca, o meio de armazenamento pode ser de grande valor na avaliação da degradação do tecido orgânico (da Silva, EM., *et al.*, 2015). Em geral, água destilada e a saliva são os meios mais utilizados para armazenamento em testes *in vitro* para avaliar a degradação da força de ligação ao longo do tempo (Montagner, AF., *et al.*, 2015). Pois a umidade tem sido considerada o principal fator limitante para a longevidade das restaurações diretas (Frankenberger R., *et al.*, 2004). Assim, o objetivo deste trabalho será avaliar *in vitro* o efeito da CHX na resistência de união e atividade antibacteriana de diferentes sistemas adesivos.

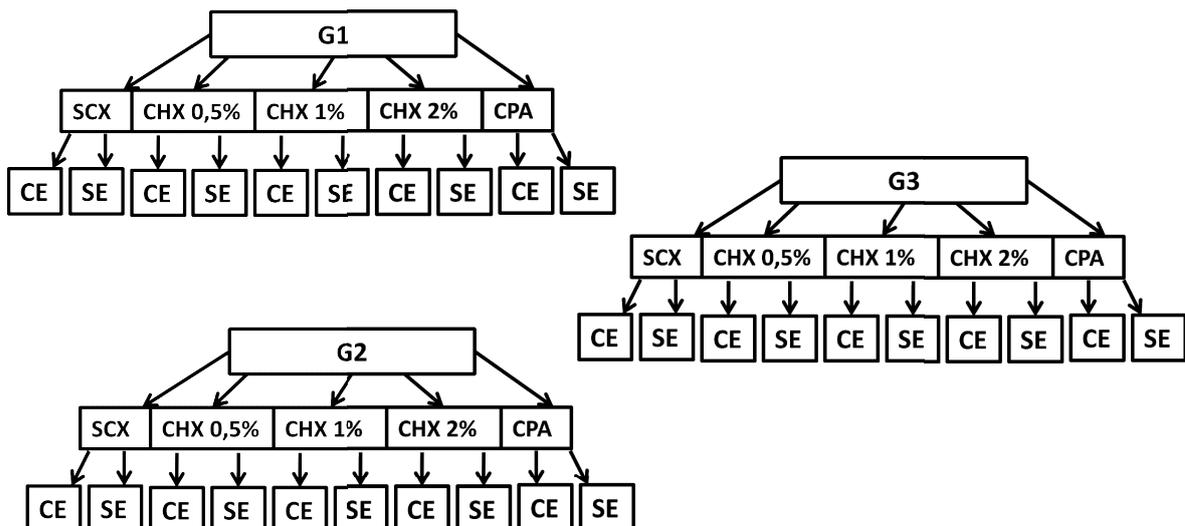
Metodologia

Delineamento amostral

De acordo com o estudo piloto foi realizado um cálculo amostral, utilizando um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, e assumindo a família F de distribuição de dados, foi definido um n igual a 150 (igualmente distribuídos entre os grupos e subgrupos), com tamanho de efeito igual a 0,40, erro tipo I igual a 0,05 e um poder de análise equivalente a 0,95.

De acordo com a distribuição dos grupos, após a realização do cálculo amostral foi determinando um n=5. Os materiais selecionados para a pesquisa, bem como as indicações de uso estão no Quadro 1. No momento do procedimento adesivo os dentes foram divididos nos seguintes grupos (Diagrama 1): G1: sistema adesivo Single Bond Plus (3M- ESPE, Sumaré, SP, Brasil); G2: sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan); G3: sistema adesivo AdheSE Primer e Bond (IvoclarVivadent, Barueri, SP, Brasil); todos os grupos foram subdivididos da seguinte forma: 1-sem aplicação prévia de CHX; 2-com a aplicação prévia de CHX 2% seguida por leves jatos de ar por 10's; 3- incorporação da CHX a 0,5%, 1%, e 2%.

Diagrama 1 – Distribuição dos grupos (n=10)



Legenda:

G1: Single Bond Plus Convencional;

G2: Clearfil SE Bond;

G3: AdheSE Primer e Bond;

SCX: Sem clorexidina;

CPA: Clorexidina 2% previamente ao adesivo;

CHX 0,5%, 1% e 2%: Incorporação de Clorexidina a 0,5%, 1% e 2%;

CE e SE: Com e Sem envelhecimento em solução de água destilada.

Preparo dos materiais

Foram adicionadas diferentes quantidades de digluconato de clorexidina 20% (Manipulada – Farmácia Santa Terezinha – Laranjeiras do Sul, Paraná, Brasil) diretamente aos adesivos para o preparo de misturas com concentrações à 0,5%, 1% e 2%. Estas concentrações foram obtidas utilizando pipetas de alta precisão (Micropipeta Monocanal Volume variável - Eco Pipette - Capp - Odense S., Dinamarca) em ambiente controlado (Laboratório de Imunologia e Virologia – Unioeste – Cascavel, PR, Brasil). A concentração de 0,5% foi atingida combinando 25 μ L de digluconato de clorexidina em 975 μ L de primer ou adesivo de acordo a divisão dos grupos (Diagrama 1). Para a concentração de 1%, foram utilizados 50 μ L de digluconato de clorexidina em 950 μ L de primer ou adesivo, e para a concentração de 2% foram utilizados 100 μ L em 900 μ L de primer ou adesivo de acordo com a divisão dos grupos.

A armazenagem das soluções geradas foi feita em *ependorfs* (Eppendorf Tubes® 3810X – Eppendorf do Brasil – São Paulo, SP, Brasil) devidamente lacrados e protegidos da luz, conservados sob-refrigeração em geladeira convencional a 7°C até o momento da utilização (Busanello, L., 2014).

Preparo dos corpos-de-prova

Foram selecionados 150 dentes incisivos bovinos de acordo com o cálculo amostral, recém-extraídos e livres de tecido periodontal de sustentação, armazenados em solução de timol 1%, sob refrigeração a 7°C. Os dentes foram seccionados, com alta rotação sob-refrigeração abundante, utilizando ponta diamantada nº 4138 (KG Sorensen – Cotia, SP, Brasil), para separar a coroa da raiz. Em seguida, as coroas foram incluídas em tubos de PVC com resina acrílica, deixando a superfície vestibular livre. Após, foi realizado o desgaste do esmalte dental na face vestibular até a completa remoção do esmalte e exposição da dentina com a politriz (Arotec – Aropol 2V200 – Cotia, SP, Brasil), usando discos de lixas da maior

para a menor granulação de #600. Em seguida, os elementos foram armazenados em umidade relativa até o momento de seu uso.

Os cilindros de resina composta foram confeccionados utilizando uma matriz de Tygon (Tygontubing, TYG-030, Saint-Gobain Performance Plastic, MaimeLakes, FL, USA) com diâmetro interno de 1 mm e 2 mm de altura. A matriz foi posicionada com uma pinça clínica sobre a superfície do dente e, os corpos-de-prova (CP) foram confeccionados com resina composta Bulk Fill Flow (Opus Bulk Fill Flow, FGM, Joinville, SC, Brasil) em único incremento fotoativado por 20 segundos com aparelho de luz LED (*Bluephase G2*, irradiância: 1200 mW/cm², IvoclarVivadent, Barueri, SP, Brasil). Foram confeccionados três cilindros de resina composta para cada coroa bovina, para que seja feito um teste em triplicata, eliminando qualquer viés, posteriormente foi feita a média desses cilindros para cada dente. Metade dos CP foi armazenada por 24 horas em umidade relativa a 37°C, sendo, após este período, submetidos ao teste de microcislamento. A outra metade dos CP permaneceu armazenada por 30 dias, em água destilada a 37 °C, que foi trocada a cada 15 dias e, posteriormente submetidos ao teste de microcislamento.

A descrição dos materiais utilizados estão dispostos no Quadro 1.

Quadro 1: Descrição dos materiais

Material / Marca comercial	Fabricante	Composição	Instrução de uso
Ácido Fosfórico - Condac 37%	FGM	Ácido Fosfórico a 37%, Espessante, Corante e Água Deionizada	1-Prepare a região limpando e secando-a. 2-Aplique o ácido por 15's tanto em esmalte quanto em dentina. 3-Lave com água em abundância por 60's.
Adesivo-Single Bond Plus	3M ESPE	Álcool, água, sílica tratada com silício, BisGMA, HEMA, dimetacrilatos, etanol, água, copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenóico. canforoquinona, dimetacrilato, 10% em peso de nanopartículas de sílica (5 nanômetros).	Convencional ácido total: Após realizar o condicionamento com ácido fosfórico conforme indicação do fabricante. 1-Agite por 20's e aplique o adesivo ativamente na dentina superficial por 20's. 2-Aplique jatos de ar por 5's. 3-Fotoative por 10's.
Adesivo-Clearfil SE Bond	Kuraray	Primer- MDP (monômero ácido) e água. Bond-adesivo à base Bis-GMA.	1- Limpeza da estrutura dental. 2- Secar a cavidade e aplicar o Primer ativamente por 20's,

			utilizar levemente o jato de ar e não há necessidade de fotopolimerizar. 3- Aplicar Bond e após um leve jato de ar. 4- Fotoative por 10's.
Adesivo- AdheSE Primer e AdheSE Bond	Ivoclar Vivadent	AdheSE Primer: dimetacrilato, acrilato do ácido fosfônico, iniciadores e estabilizadores em solução aquosa. AdheSE Bond: HEMA, dimetacrilato, dióxido de silício, iniciadores e estabilizadores.	1-Aplique uma camada de AdheSE Primer. Inicie pelo esmalte e umedeça todas as superfícies da cavidade por 15's. 2- Aplique jatos de ar, até que um filme líquido móvel não seja mais visível. 3-Aplique AdheSE Bond, iniciando pela dentina, cubra todas as superfícies. 4-Com jatos de ar espalhe o excesso de AdheSE Bond. 5-Fotoative por 10's.
Resina Composta – Opus Bulk FillFlow	FGM	Monômeros uretanadimetacrílicos, estabilizante, canforoquinona e co-inibidor. Cargas inorgânicas de dióxido de silício, silanizado, estabilizantes e pigmentos.	Incremento único
Digluconato de Clorexidina 20%	Manipulada Farmácia Santa Terezinha	Clorexidina a 20%	Incorporada nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0%, nos frascos de adesivo ou primer, e utilizada conforme as instruções de uso de cada fabricante do adesivo em questão.

Teste de resistência de união por microcisalhamento e análise de fratura

Os cilindros de resina composta foram testados em máquina universal de ensaios (EMIC – São José dos Pinhais, PR, Brasil) com uma célula de carga de 20 kg. O carregamento de cisalhamento, com fio ortodôntico de 0,2 mm, foi aplicado na base dos cilindros a uma velocidade de 0,5 mm/min, até o rompimento da união. A resistência de união ao microcisalhamento foi calculada e expressa em MPa.

Os modos de falha foram avaliados com uma lupa estereoscópica com 40X de aumento e classificados de acordo com a fratura sofrida em: fratura adesiva (A): falha na

interface adesivo/dentina; fratura coesiva de adesivo (CA): falha exclusivamente dentro do adesivo; fratura mista (M): falhas na interface adesivo/dentina/resina, que incluem falhas coesivas nos substratos vizinhos (Camilotti, V., *et al.*, 2013).

Teste de atividade antibacteriana

Teste de Difusão em Agar (TDA)

TDA foi realizado em placas de ágar sangue, em que 200 µL de *S. mutans*, recentemente crescido, foram distribuídos uniformemente nas placas com um swab estéril, então dez orifícios circulares de 4 mm de diâmetro foram perfurados em cada uma das nove placas sendo uma para cada solução, com o fim da ponta de uma pipeta Pasteur estéril com 4mm de diâmetro. Os dez orifícios de cada placa foram imediatamente preenchidos com 50 µL das 9 soluções adesivas de teste e então polimerizados utilizando um aparelho de luz LED (*Bluephase G2, irradiância: 1200 mW/cm²*, IvoclarVivadent, Barueri, SP, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

Foram preenchidas as dez perfurações apenas com as soluções que tiveram a incorporação de CHX no seu primer ou adesivo, G1: sistema adesivo Single Bond Plus (3M- ESPE, Sumaré, SP, Brasil), G2: sistema adesivo Clearfil SE Bond (Kuraray, Osaka, Japan) e G3: sistema adesivo AdheSE Primer e Bond (IvoclarVivadent, Barueri, SP, Brasil) todos de acordo com a incorporação da CHX: a 0,5%, 1% e 2%. As placas de ágar foram incubadas durante 48 horas a 37 ° C e em seguida inspecionadas para a presença de um halo de inibição. Duas medições perpendiculares do diâmetro do halo de inibição foram feitas usando uma régua milimetrada (Penmetsa, RK., *et al.*, 2014).

Análise Estatística

Os dados relativos à Resistência de União, Ocorrência de Fraturas e Tamanho do halo bacteriano foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel® em função dos grupos G1, G2 e G3, os quais utilizaram soluções em diferentes concentrações (SCX, 0,5%, 1%, 2%, CPA).

As variáveis quantitativas (Resistência de união e Tamanho do halo bacteriano) foram avaliadas quanto ao padrão de distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk, assim como foi avaliada a homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene. Sendo

que a variável resistência de união foi considerada normal e a variável tamanho do halo bacteriano foi considerada não normal.

Dessa forma a variável Resistência de União foi avaliada entre os grupos e soluções por meio da Análise da Variância fatorial para medidas repetidas, seguido do teste de acompanhamento de Tukey-nHSD. Já a variável tamanho do halo bacteriano foi submetida ao teste não paramétrico de Kruskal – Wallis, ambos com nível de significância de 95%.

A variável qualitativa padrão de fraturas foi avaliada por meio de análise estatística descritiva.

Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, 2007).

Resultados

Avaliação de Resistência de União

A tabela 1 descreve as médias e desvio padrão da variável resistência de união analisada nos grupos G1, G2 e G3, com uso das soluções SCX, 0,5%, 1%, 2% e CPA, nos tempos de 24 horas e 30 dias de envelhecimento. Foi possível observar que ao realizar a comparação entre as soluções, SCX, 0,5% e 1% apresentaram valores estatisticamente maiores que 2% e CPA, para Clearfill. As demais não apresentaram diferenças significativas entre si, com relação a variável tempo e solução.

Tabela 1 – Média e desvio padrão da variável Resistência de União analisada nos grupos G1, G2 e G3, com uso das soluções SCX, 0,5%, 1%, 2% e CPA, nos tempos de 24 horas e 30 dias de experimentação (MPa).

Grupos	Soluções	N	24 horas	30 dias
G1	SCX	5	9,98(± 4,09)Aa	7,85(±2,34)Aa
	0.5%	5	8,90(±2,68)Aa	6,95(±2,18)Aa
	1.0%	5	5,27(± 2,36)Aa	7,73(± 1,21)Aa
	2.0%	5	8,81(± 2,92)Aa	5,96(± 5,63)Ab
	CPA	5	6,79(± 1,50)Aa	1,53(±2,35)Ab
G2	SCX	5	11,18(±3,02)Aa	12,64(±1,83)Ba
	0.5%	5	9,35(±2,13)A	11,56(±2,00)Ba
	1.0%	5	7,77(±1,79)Aa	12,95(±3,88)Ba
	2.0%	5	11,43(±3,15)Aa	11,26(±1,80)Aa
	CPA	5	11(±2,10)Aa	11,02(±4,40)Aa
G3	SCX	5	10,28(± 4,91)Aa	10,72(±1,84)ABa
	0.5%	5	8,88(±2,41)Aa	8,73(±3,17)ABa
	1.0%	5	9,20(±2,85)Aa	6,87(±1,73)Aa
	2.0%	5	8,57(±1,53)Aa	9,50(±2,53)Aa
	CPA	5	7,81(±3,07)Aa	4,58(±4,34)Aa

*Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes, letras minúsculas para linha e maiúsculas para coluna.

Avaliação da ocorrência do padrão de fraturas em 24 horas e 30 dias

A figura 1 um relata a frequência absoluta da ocorrência de fraturas Adesiva, Mista e Coesiva Adesiva em G1, G2 e G3 em 24 horas (24H) e 30 dias (30D). É possível observar que a maior ocorrência de fraturas adesiva está em G3 após 30 dias de experimentação (63%), seguida por G1 em 24 horas (51%). Já G1 em 30 dias teve a maior ocorrência de fraturas coesivas (55%), seguida por G2 também em 30 dias, com 52% de fraturas coesivas. As fraturas mistas obtiveram os menores valores, tendo 4% em G1 em 24 horas e seu maior valor, sendo 29% em G2 também em 24 horas.

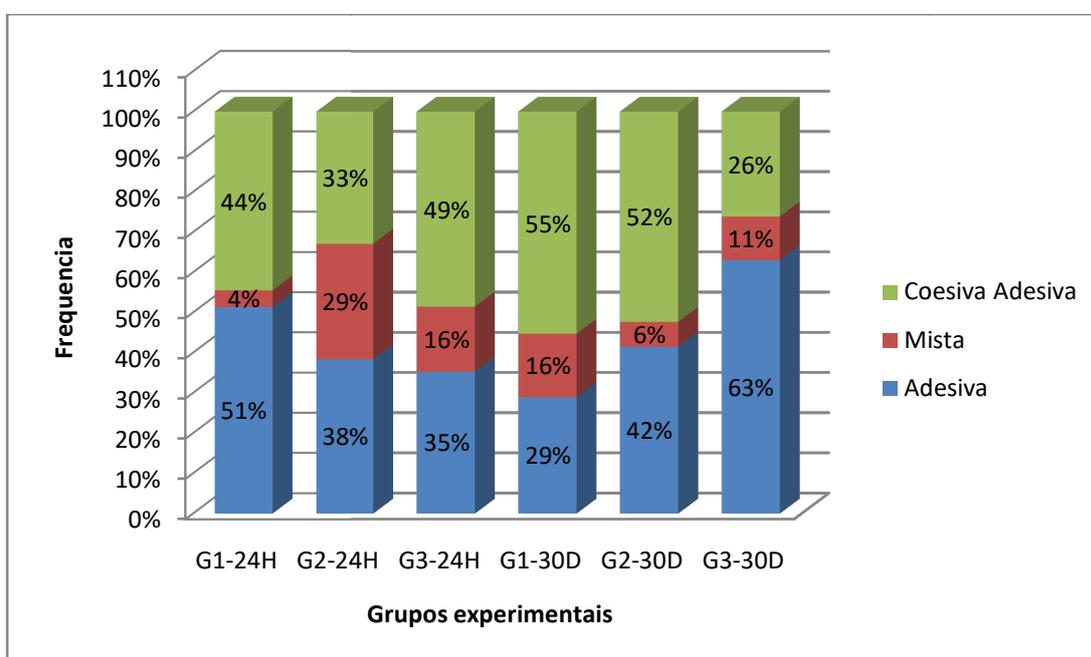


Figura 1- Frequência absoluta da ocorrência de fraturas Adesiva, Mista e Coesiva Adesiva em G1, G2 e G3 em 24 horas (24H) e 30 dias (30D).

Avaliação do diâmetro do halo

A tabela 2 descreve os valores médios obtidos para leitura do halo de inibição bacteriano para os grupos experimentais (mm). Foi verificado que o diâmetro médio do halo formado no grupo G3 foi significativamente mais elevado do que os observados nos grupos G1 e G2 para as concentrações de 0,5 e 1%, na concentração de 2% os maiores halos de forma significativa foram para o G1 e G3. A concentração de CHX teve influência significativa para G1, onde o maior halo foi encontrado em 2%. Os demais grupos não tiveram o tamanho do halo influenciado significativamente pela solução.

Tabela 2 - Valores médios obtidos para leitura do halo de inibição bacteriano para os grupos experimentais (cm).

Adesivo/ [%]CHX	0,5		1		2	
G1	0,95(±0,19)	Aa	1,74(±0,15)	Aab	2,38(±0,16)	Ab
G2	1,96(±0,14)	Aa	1,76(±0,20)	Aa	1,64(±0,26)	Ba
G3	2,43(±0,26)	Ba	2,71(±0,17)	Ba	2,55(±0,12)	Aa

*Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes, letras minúsculas para linha e maiúsculas para coluna.

Discussão

Embora ainda existam controvérsias quanto à concentração necessária de CHX para inibir a ação de MMPs, alguns estudos mostram que baixas concentrações (0,02%) já são efetivas para este fim (Breschi, L. *et al.*, 2010), corroborando com os achados do presente estudo onde a resistência de união para os grupos SCX, 0,5% e 1,0% apresentaram valores estatisticamente maiores que 2% e CPA. As demais não apresentaram diferenças significativas entre si, com relação à variável tempo e solução, isso vai ao encontro de outros estudos já publicados que não encontraram diferenças significativas utilizando a CHX tanto em baixas concentrações como 0,02% quanto em concentrações mais altas como 2%, para aumentar a estabilidade da interface resina-dentina (Perote, LCC., *et al.*, 2015; Abu Nawareg, M., *et al.*, 2016; Gunaydin, Z., *et al.*, 2016). Contudo existem relatos na literatura com melhoria significativa da resistência de união usando (Carrilho, MR., *et al.*, 2007; Breschi, L., *et al.*, 2010; Stanislawczuk, R., *et al.*, 2014) a clorexidina a 2%, talvez este resultado se deva ao fato de que nesses estudos o modo de aplicação da solução de CHX foi diferente da realizada nesta pesquisa.

Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo, MS., *et al.*, 2015, em um estudo clínico de dois anos onde a inclusão de CHX no primer de ambos adesivos (AdheSE Primer e Bond e Clearfil SE Bond) não agregou vantagens clínicas em relação ao período avaliado, porém Clearfil SE Bond resultou em melhor taxa de retenção do que o AdheSE Primer e Bond. No presente estudo, ao realizar a comparação entre os grupos, para cada uma das soluções, em cada um dos períodos de experimentação, foi possível observar que o G2 (Clearfil SE Bond) sempre apresentou médias significativamente mais elevadas do que os demais grupos, tendo assim os maiores valores de resistência adesiva. Isso pode ser relacionado ao fato de que Single Bond Plus ser um adesivo convencional que necessita de condicionamento com ácido fosfórico 37%, este remove a *Smear Layer* deixando as fibras colágenas expostas devido à infiltração incompleta dos monômeros de resina. O uso do ácido fosfórico ativa as MMPs, diminuindo então a resistência de união. Já os adesivos Clearfil SE Bond e AdheSE Bond, são adesivos autocondicionantes, que não necessitam de condicionamento ácido, tendo assim uma camada híbrida mais homogênea, com uma melhora na interação monômero-colágeno, resultando em uma resistência de união mais consistente. A diferença entre os dois adesivos autocondicionantes esta na composição, onde AdheSE Bond possui o monômero HEMA e Clearfil SE Bond possui o monômero MDP. Tem sido demonstrado que a ligação química promovida pelo 10-MDP além de ser mais eficaz é

também mais estável em um ambiente aquoso do que o atingido pelos monômeros HEMA, 4-META e Fenil-P (Anusavice, KJ., *et al.*, 2013; Van Landuyt, KL., *et al.*, 2008).

O uso de um inibidor de MMP na superfície dentinária previamente ao adesivo ou a sua incorporação no sistema adesivo pode resultar em melhor estabilidade e integridade da interface adesiva ao longo do tempo (De Munck, J., *et al.*, 2010; Li, H., *et al.*, 2015; Tekçe, N., *et al.*, 2016). Porém, no presente estudo não houve diferença significativa nos valores de resistência de união quando comparado 24 horas e 30 dias para as diferentes formas de aplicação da CHX. Resultados diferentes foram observados por Gunaydin, Z., *et al.*, 2016, no qual o pré-tratamento com CHX a 2% apresentou maiores valores de resistência de união em amostras envelhecidas quando comparadas as amostras envelhecidas que não receberam o tratamento, o que indica que o uso de CHX resultou em uma melhor estabilidade da interface adesiva, esse autor utilizou o pré-tratamento com CHX a 2% assim como o presente estudo, porém realizou o teste microtração diferente do utilizado na presente pesquisa. É esperado também que haja diferença entre os tipos de fratura quando do uso de diferentes estratégias adesivas assim como quando da utilização de diferentes ensaios mecânicos.

Sobre a distribuição da análise de fraturas, foi possível observar que a maior ocorrência de fraturas adesiva foi para G3 após 30 dias de armazenamento (63%), enquanto que em 24 horas teve a maior ocorrência de fraturas coesivas. Isso pode indicar melhora na resistência de união após o período de envelhecimento, pois a ocorrência de fraturas adesivas indica melhor distribuição das forças. No grupo G1 em 24 horas (51%) mais da metade das fraturas foi adesiva, já em 30 dias teve a maior ocorrência de fraturas coesivas (55%), seguida por G2 também em 30 dias, com 52%, o que indicaria uma menor resistência adesiva. As fraturas mistas obtiveram os menores valores, tendo 4% em G1 em 24 horas e seu maior valor, sendo 29% em G2 também em 24 horas.

Durante muito tempo acreditava-se que as fraturas coesivas em dentina eram resultado da alta força de adesão. Isso porque a força de adesão mais elevada alcançada com os sistemas adesivos, testados em grandes áreas, em testes de tração, promovia uma distribuição de força não uniforme, o que levava à fratura na dentina, não na interface adesiva, resultando em uma fratura coesiva. Quando a dentina fraturava, compreendia-se que a força de adesão na interface dentina/resina era maior que a força coesiva da dentina. Assim a fratura adesiva corresponderia, então, a uma baixa força de adesão. Após a introdução do teste de microcisalhamento e microtração (Sano H., *et al.*, 1994) foi verificado que quanto menor a área adesiva, menor será a possibilidade de ocorrerem defeitos na superfície do dente que interfiram negativamente na força de adesão. Assim independente do teste utilizado,

microcissalhamento ou microtração, pela distribuição uniforme das forças, os padrões de fraturas deveriam ser mistos e adesivos (Rocha RO., *et al.*, 2007).

Foi observado um comportamento superior de G3 para o teste de difusão em ágar, que G3 teve o diâmetro médio do halo formado significativamente mais elevado do que os halos observados nos grupos G1 e G2. O que nos mostra que dentre os adesivos incorporados com CHX testados, G3 apresentou propriedades antibacterianas maiores 72 horas após a polimerização. Isso pode ter ocorrido por diversos fatores, tais como o pH de 1,4, ou ao monômero HEMA presente no primer do sistema adesivo AdheSE, que possui alta hidrofília e características químicas próximas as do solvente (Anusavice, KJ., *et al.*, 2013; Andrade, AP., *et al.* 2008) assim como a CHX incorporada ao primer. Resultados semelhantes foram conseguidos por Kim SR e Shin DH., 2014 que testaram o adesivo Clearfil SE Bond e outros, utilizando Clorexidina 0,12% (CHX, Bukwang) e ácido fosfórico gel 37% (PA, Vericom) como controles positivos, encontraram que a atividade antibacteriana da clorexidina 0,12% e ácido fosfórico gel 37% eram mais fortes do que a dos outros grupos, exceto por Clearfil SE Bond, que teve o maior halo de inibição. A atividade antibacteriana dos sistemas adesivos depende de vários fatores, como: o pH, que desse adesivo é em torno de 2,0; a presença de componentes antibacterianos na composição química e a viscosidade do material. Assim o caráter ácido do primer dos sistemas adesivos autocondicionantes tem sido apontado como um dos principais fatores relacionados à inibição bacteriana (Gondim, JO., *et al.*, 2008; Andrade, AP., *et al.*, 2008).

A adição da CHX ou seu uso previamente ao sistema adesivo, ainda em baixas concentrações como 0,5% pode melhorar a resistência adesiva, auxiliando na inativação das metaloproteinasas de matriz, mas ainda sendo necessários posteriores estudos clínicos, para definir sua concentração e tempo de aplicação ideal.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste estudo *in vitro*, pode-se concluir que:

- As concentrações de CHX com 0,5 e 1% contribuíram para o aumento dos valores de resistência de união e o sistema adesivo Clearfil SE Bond teve as maiores médias no teste de microcislamento.
- O sistema adesivo AdheSE Bond apresentou os melhores resultados no teste antibacteriano com *S.mutans*.

Referências bibliográficas

1. Salz U, Zimmermann J, Zeuner F, Moszner N. Hydrolytic stability of self-etching adhesive systems. *J AdhesDent*. 2005 summer; 7(2):107-16.
2. Langer A, Ilie N. Dentin infiltration ability of different classes of adhesive systems. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan; 17(1):205-16.
3. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*. 2002 Sep-Nov; 30(7-8):371-82.
4. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater*. 2010 Apr;26(4):320-5.
5. Araújo MS, Souza LC, Apolonio FM, Barros LO, Reis A, Loguercio AD, Saboia VP. Two-year clinical evaluation of chlorhexidine incorporation in two-step self-etch adhesive. *J Dent*. 2015 Jan; 43(1):140-8.
6. Hajizadeh H, Ghavamnasiri M, Majidinia S. Randomized clinical evaluation of the effect of chlorhexidine on postoperative sensitivity of posterior composite resin restorations. *Quintessence Int*. 2013 Nov-Dec; 44(10):793-8.
7. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008 Jan; 24(1):90-101.
8. Locatelli P.B., *Sistemas Adesivos Autocondicionantes*. Piracicaba, SP: [s.n.], 2004.
9. Strobel S, Hellwig E. The effects of matrix-metallo-proteinases and chlorhexidine on the adhesive bond. *SwissDent J*. 2015; 125(2):134-45.
10. Ricci HA, Sanabe ME, Costa CA, Hebling J. Effect of chlorhexidine on bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to dentin of primary and permanent teeth. *Am J Dent*. 2010 Jun;23(3):128-32.
11. Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS. MMP Inhibitors on Dentin Stability: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*. 2014 Jun 16; 93(8):733-743.
12. André CB, Gomes BP, Duque TM, Stipp RN, Chan DC, Ambrosano GM, Giannini M. Dentine bond strength and antimicrobial activity evaluation of adhesive systems. *J Dent*. 2015 Apr;43(4):466-75.
13. da Silva EM, Glir DH, Gill AW, Giovanini AF, Furuse AY, Gonzaga CC. Effect of Chlorhexidine on Dentin Bond Strength of Two Adhesive Systems after Storage in Different Media. *Braz Dent J*. 2015 Nov-Dec;26(6):642-7.

14. Montagner AF, Perroni AP, Correa MB, Masotti AS, Pereira-Cenci T, Cenci MS. Effect of pre-treatment with chlorhexidine on the retention of restorations: a randomized controlled trial. *Braz Dent J* 2015;26:234- 241.
15. Frankenberger R, Strobel WO, Lohbauer U, Kramer N, Petschelt A. The effect of six years of water storage on resin composite bonding to human dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004;69:25-32
16. Busanello, L. Influência da incorporação de clorexidina em adesivos autocondicionantes na resistência da união em dentina sadia. - São Paulo; SP: [s.n], 2014.
17. Camilotti V, Ioris MD, Busato PMR, Ueda JK, Mendonça MJ. Avaliação da influência da solução de irrigação na resistência adesiva de um cimento resinoso. *Rev. odontol. UNESP*. 2013 Apr; 42(2): 83-88.
18. Penmetsa RK, Rekha A S, Poppuri KC, Prashanth P S, Garapati S. An in vitro evaluation of antibacterial properties of self etching dental adhesive systems. *J ClinDiagn Res*. 2014 Jul; 8(7):ZC01-5.
19. Instituto Mamirauá. BioEstat 5.3.Tefé – AM- Brasil, 2007.
20. Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine ina two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent*. 2009 Oct; 37(10):807-12.
21. Perote LC, Kamozaqi MB, Gutierrez NC, Tay FR, Pucci CR. Effect of Matrix Metalloproteinase-inhibiting Solutions and Aging Methods on Dentin Bond Strength. *J Adhes Dent*. 2015 Aug;17(4):347-52.
22. Abu Nawareg M, Elkassas D, Zidan A, Abuelenain D, Abu Haimed T, Hassan AH, Chiba A, Bock T, Agee K, Pashley DH. Is chlorhexidine-methacrylate as effective as chlorhexidine digluconate in preserving resin dentin interfaces? *J Dent*. 2016 Feb;45:7-13.
23. Gunaydin Z, Yazici AR, Cehreli ZC. In Vivo and In Vitro Effects of Chlorhexidine Pretreatment on Immediate and Aged Dentin Bond Strengths. *Oper Dent*. 2016 May-Jun; 41 (3):258-67.
24. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res*. 2007b Jan;86(1):90-4.
25. Stanislawczuk R, Pereira F, Muñoz MA, Luque I, Farago PV, Reis A, Loguercio AD. Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces. *J Dent*. 2014 Jan;42(1):39-47.
26. Anusavice, KJ, Schen C, Rawls HR. *Philips Materiais Dentários*. 12 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2013.

27. Kim SR, Shin DH. Antibacterial effect of self-etching adhesive systems on *Streptococcus mutans*. *RestorDentEndod*. 2014 Feb; 39(1):32-8.
28. Andrade, AP.; Shimaoka, AM.; Russo, EMA.; Carvalho, RCR. Estudo comparativo da resistência de união de sistemas adesivos autocondicionantes com diferentes pHs aplicados ao esmalte e à dentina. *Revista Gaúcha de Odontologia*. abr./jun., 2008; 56 (2): 115-119.
29. Van Landuyt KL, Kanumilli P, De Munck J, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bond strength of a mild self-etch adhesive with and without prior acid-etching. *J Dent*. 2006 Jan; 34(1):77-85.
30. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2010 Oct;118(5):494-501.
31. Li H, Li T, Li X, Zhang Z, Li P, Li Z. Morphological effects of MMPs inhibitors on the dentin bonding. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jul 15;8(7):10793-803.
32. Tekçe N, Tuncer S, Demirci M, Balci S. Do matrix metalloproteinase inhibitors improve the bond durability of universal dental adhesives? *Scanning*. 2016 Nov;38(6):535-544.
33. Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho RM et al. Relation between surface area for adhesion and tensile bond strength– Evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994; 10:236-40
34. Rocha R, Soares FZ, Rodrigues CR, Rodrigues Filho LE. Influence of aging treatments on microtensile bond strength of adhesive systems to primary dentin. *J Dent Child (Chic)*. 2007 May-Aug;74(2):109-12.
35. Gondim JO, Duque C, Hebling J, Giro EM. Influence of human dentine on the antibacterial activity of self-etching adhesive systems against cariogenic bacteria. *J Dent*. 2008 Apr;36(4):241-8.

ANEXOS



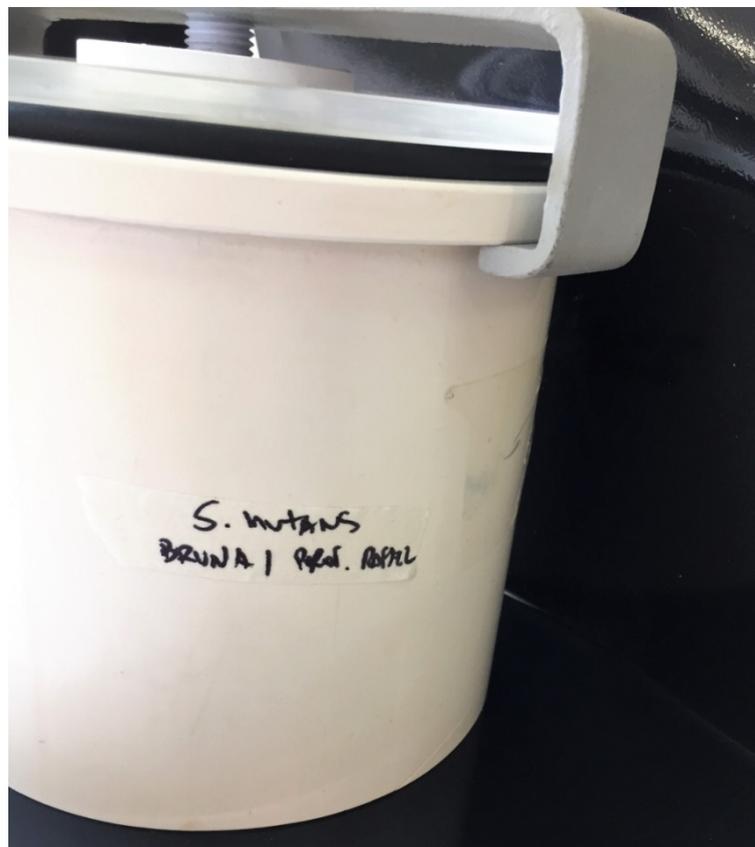
Anexo 1- Pipeta Pasteur estéril, utilizada para realizar o teste de difusão em Agar.



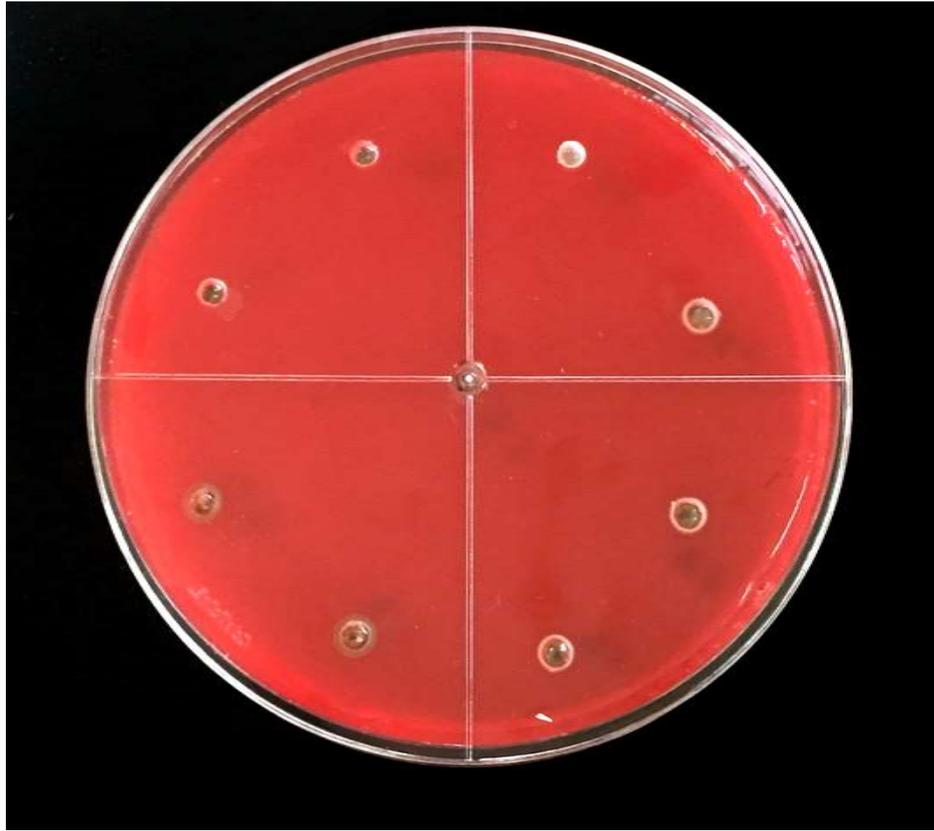
Anexo 2 – Micropipeta utilizada para diluição dos adesivos e clorexidina.



Anexo 3 – Jarra de anaerobiose.



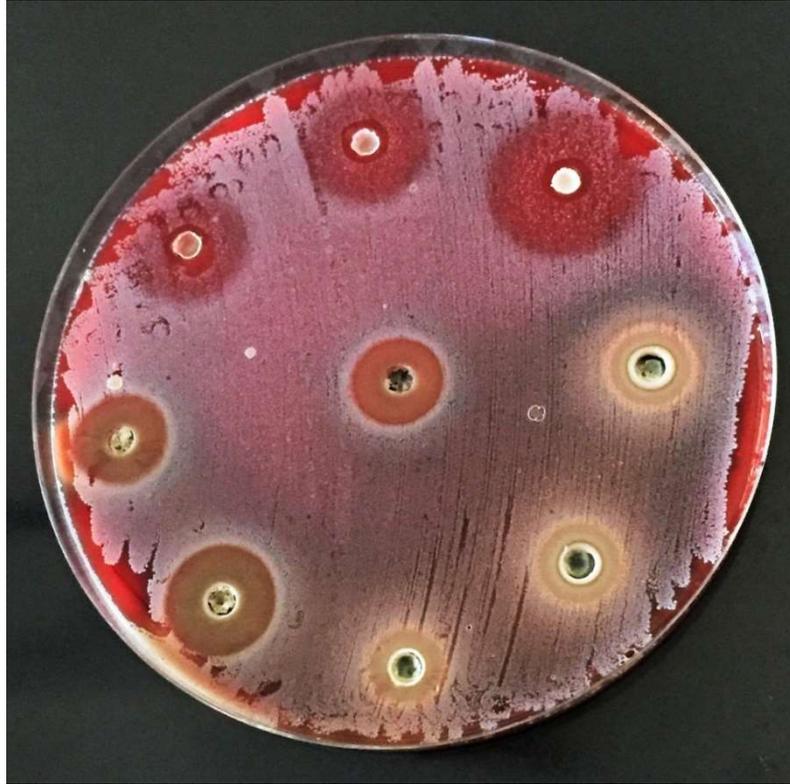
Anexo 4 – Jarra de anaerobiose contendo as placas de petri com o *S. mutans*.



Anexo 5 - Placa de Petri com Agar sangue logo após realizar os furos e acrescentar as soluções adesivas.



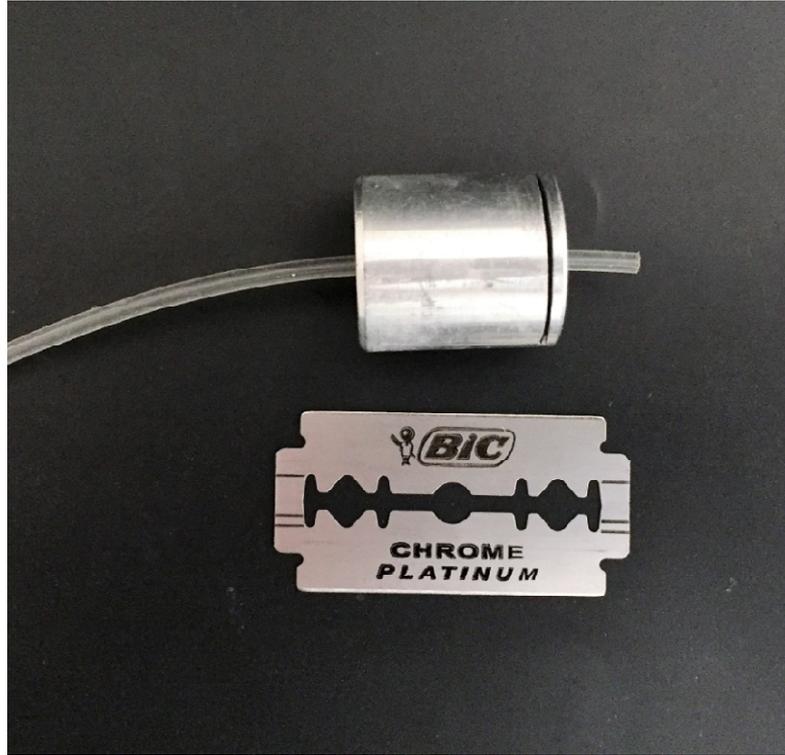
Anexo 6- Placa de Petri com Agar sangue com a marcação para orientação do teste.



Anexo 7 – Placa de Petri após 48 horas de incubação e crescimento do *S. mutans*, mostrando os halos de inibição de cada solução.



Anexo 8 - Soluções adesivas de teste em eppendorfs protegidos da luz.



Anexo 9 – Dispositivo para corte padrão do tubo Tygon no tamanho de 2mm.



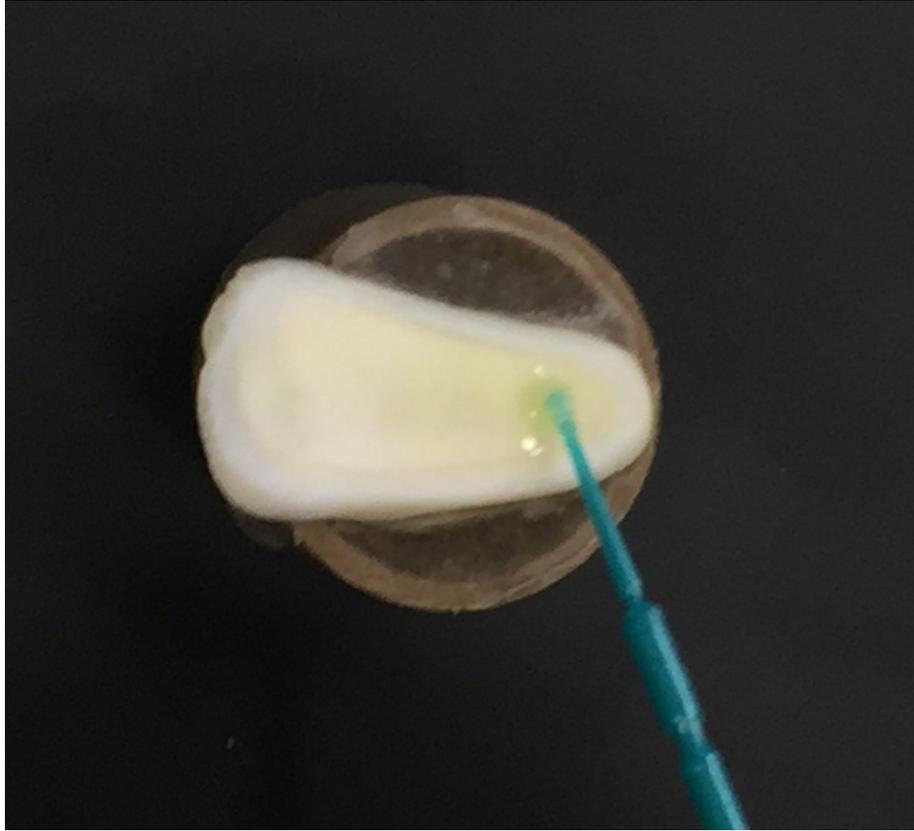
Anexo 10- Dispositivo para corte padrão, lâmina de corte e matriz de Tygon.



Anexo 11 – Corpo de prova com a aplicação de ácido fosfórico 37%.



Anexo 12 – Lavagem do ácido fosfórico com água abundante.



Anexo 13 – Aplicação do adesivo Single Bond Plus conforme instruções do fabricante.



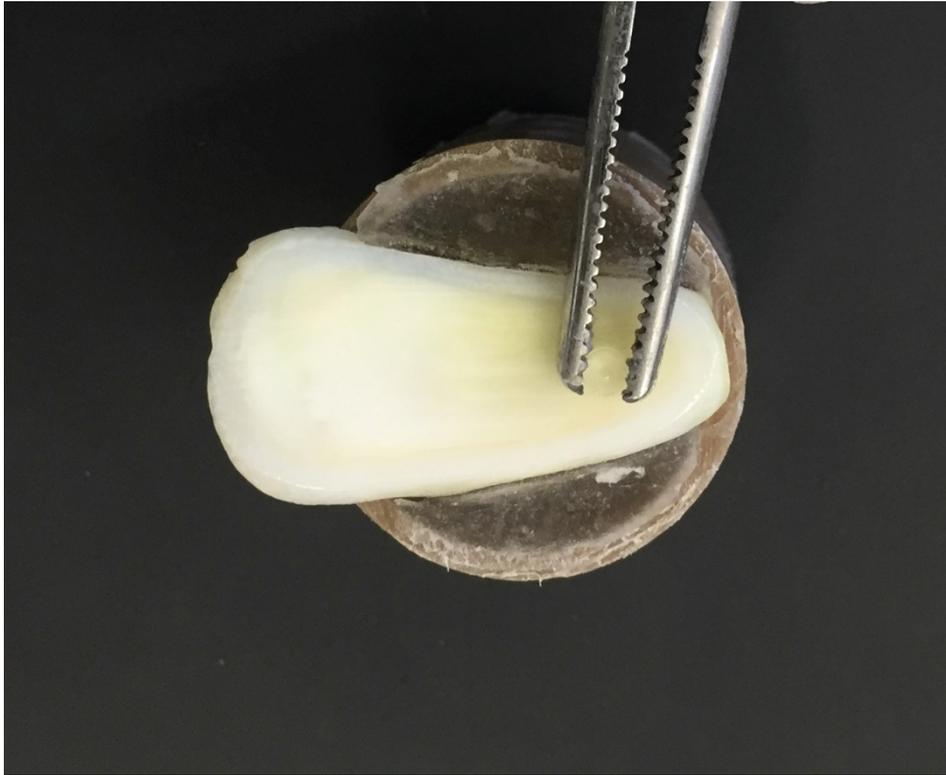
Anexo 14- Aplicação de leves jatos de ar após a aplicação do adesivo.



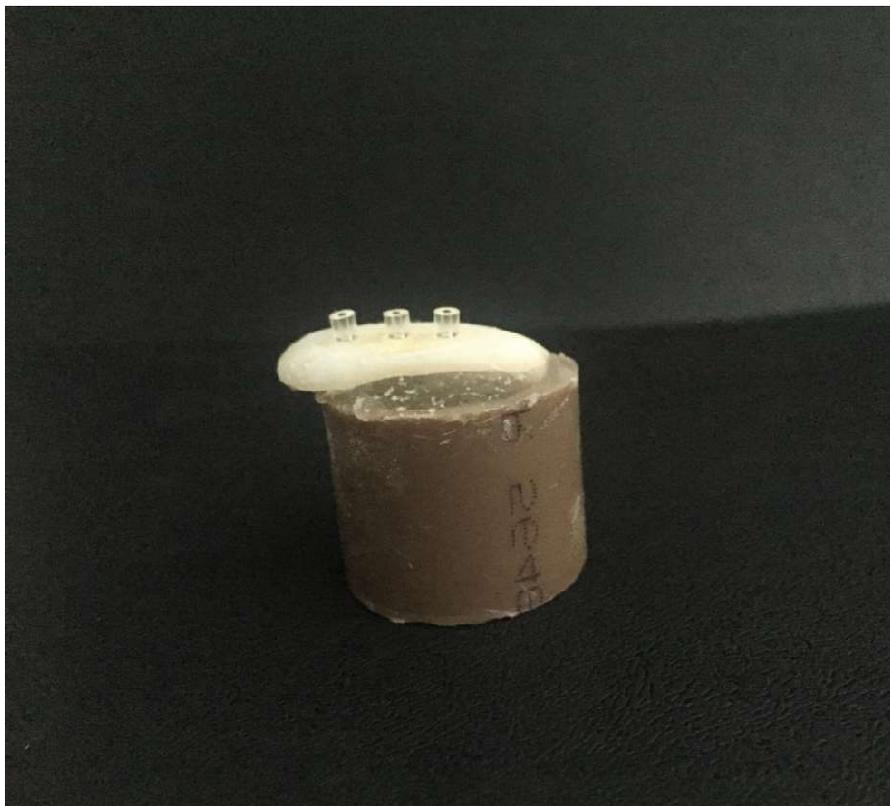
Anexo 15- Fotopolimerização.



Anexo 16- Fotopolimerização.



Anexo 17 – Posicionamento da matriz de Tygon sobre a superfície do dente para confeccionar os cilindros de resina composta.



Anexo 18 – Cilindros de resina composta já confeccionados dentro da matriz de Tygon.



Anexo 19 – Vista lateral de um corpo de prova posicionado no suporte para teste de microcisalhamento.