CAMILLA REGINA GALVÃO BENGTSON

**ESTUDO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO COM
STREPTOCOCCUS MUTANS E DA DESCONTAMINAÇÃO COM
DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA 2% NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO
DE SISTEMAS ADESIVOS À DENTINA HUMANA**

São Paulo

2007

Camilla Regina Galvão Bengtson

**Estudo *in vitro* da influência da contaminação com
Streptococcus mutans e da descontaminação com digluconato
de clorexidina 2% na resistência de união de sistemas
adesivos à dentina humana**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Míriam Lacalle Turbino

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bengtson CRG. Estudo *in vitro* da influência da contaminação com *Streptococcus mutans* e da descontaminação com digluconato de clorexidina 2% na resistência de união de sistemas adesivos à dentina [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, __/__/2007

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, **Antonio** e **Nadya**, que sempre me incentivaram e animaram durante todas as fases da minha vida com amor, carinho e compreensão. Muito obrigada por acreditarem em mim como pessoa e profissional e permitirem que meus sonhos se tornem reais a cada dia que passa.

E ao **Rodrigo** com amor e gratidão pela compreensão, carinho, presença e apoio durante a elaboração deste trabalho. Obrigada por estar ao meu lado incentivando e ajudando a crescer cada vez mais como ser humano.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profª. Drª. Míriam Lacalle Turbino** pela confiança e oportunidade de compartilhar seus conhecimentos. Sua sábia orientação e apoio em todos os momentos foram essenciais para a realização desse trabalho.

À **Profª. Drª. Maria Regina L. Simionato** do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por abrir as portas do seu laboratório, ensinar a metodologia e compartilhar conhecimentos sobre Microbiologia.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, pelo apoio necessário para realização deste trabalho.

À **Profª. Drª. Márcia Martins Marques**, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Dentística, pela oportunidade e apoio durante todo o programa.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Luiz Pinheiro**, pelo tempo dispensado na avaliação deste trabalho com seriedade e critério. Muito obrigada pelas idéias e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Michel Nicolau Youssef**, pelas valiosas contribuições nas fases finais desse trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo, pelos ensinamentos e convívio compartilhados.

Aos Funcionários do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia de São Paulo, em especial a **Sônia Aparecida Grigio Alves (Soninha)**, pela ajuda no laboratório durante a execução deste trabalho.

Ao **Celso**, técnico responsável pela Microscopia Eletrônica de Varredura do IPEN pela disponibilidade e auxílio no preparo e análise das amostras.

À **Luciana Espejo** pelo treinamento e ajuda no Laboratório de Microbiologia. Obrigada pela paciência e carinho que você teve comigo durante todo o tempo de realização desse trabalho.

À minha amiga **Valéria Soprano** por me acolher em sua casa, me apoiar e compartilhar momentos felizes da minha empreitada em São Paulo. Muito obrigada!

Ao **Washington Steagall Junior** pelo empréstimo do cilindro, pela ajuda com as figuras e pelos conhecimentos estatísticos.

Ao **Fernando Aparecido Kawaguchi (Cidão)** pela ajuda, até altas horas da noite, na fase experimental desse trabalho.

Ao **Sérgio Brossi Botta** pelas idéias na fase de elaboração desse trabalho e por conseguir os dentes para essa pesquisa.

A todos os amigos de pós-graduação pela convivência e pela ajuda em algumas dificuldades. Sou muito grata a todos vocês pelas contribuições e experiências trocadas durante todo o mestrado.

Ao **Cristiano Almeida de Oliveira** pelo cuidado na correção do texto em inglês.

À **Aguida Feliziani**, funcionária da biblioteca da FOU SP, pelo auxílio na revisão e formatação do texto.

À minhas irmãs, **Eliza** e **Clarissa**, que mesmo à distância torcem por mim.

Ao **Cnpq** e à **CAPES**, pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Bengtson CRG. Estudo *in vitro* da influência da contaminação com *Streptococcus mutans* e da descontaminação com digluconato de clorexidina 2% na resistência de união de sistemas adesivos à dentina humana [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar, *in vitro*, a influência da contaminação com *Streptococcus mutans* e da desinfecção com solução de digluconato de clorexidina 2% na adesão de dois sistemas adesivos (um sistema adesivo com condicionamento ácido prévio e um sistema adesivo autocondicionante) à dentina de molares humanos. Para o estudo, foram utilizados 80 terceiros molares humanos hígidos, com a face oclusal lixada até a exposição de uma superfície plana de dentina. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=10) de acordo com o sistema adesivo utilizado e tratamento superficial realizado: G1 – Controle Single Bond 2 (SB); G2 – Controle Clearfil SE Bond (SE); G3 – Desinfecção com clorexidina SB; G4 – Desinfecção com clorexidina SE; G5 – Contaminação com *Streptococcus mutans* SB; G6 – Contaminação com *Streptococcus mutans* SE; G7 – Contaminação com *Streptococcus mutans* e desinfecção com clorexidina SB e G8 – Contaminação com *Streptococcus mutans* e desinfecção com clorexidina SE. Corpos de prova em resina composta foram confeccionados nas superfícies tratadas e os dentes foram armazenados em água destilada à 37°C por 24 horas. As amostras foram seccionadas verticalmente obtendo-se espécimes com área de secção transversal de aproximadamente 0,8mm², que foram tracionados a velocidade de 0,5mm/min em máquina de ensaios universal. Cinco espécimes de cada grupo tiveram a interface adesiva analisada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados de resistência de união foram analisados usando os testes estatísticos ANOVA e Tukey (p<0,05). Os modos de fraturas foram avaliados por meio de lupa estereoscópica

(25X). Discos de dentina foram obtidos de 6 dentes adicionais, para observação em MEV das superfícies submetidos aos mesmos tratamentos realizados para o teste de microtração. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos controles (G1 = $31,52 \pm 6,24$ e G2 = $42,88 \pm 2,31$), o tratados com clorexidina (G3 = $34,41 \pm 6,92$ e G4 = $40,14 \pm 2,91$) e os grupos que foram submetidos à contaminação com *Streptococcus mutans* e descontaminação com clorexidina (G7 = $31,12 \pm 5,31$ e G8 = $39,09 \pm 3,86$). Os grupos submetidos à contaminação com *Streptococcus mutans* que não foram descontaminados antes da aplicação dos sistemas adesivos tiveram resultados significativamente menores que os grupos estéreis e descontaminados (G5 = $23,61 \pm 7,13$ e G6 = $33,15 \pm 3,35$). O sistema adesivo Clearfil SE Bond apresentou valores de resistência de união significativamente maiores que o sistema adesivo Single Bond 2, independente do tratamento da superficial dentina. Pôde-se concluir que a contaminação *in vitro* com *Streptococcus mutans* comprometeu a adesão dos dois sistemas adesivos e a solução de digluconato de clorexidina 2% foi capaz de eliminar a contaminação, restabelecendo os valores de resistência de união obtidos com o substrato estéril.

Palavras-Chave: Adesivos Dentinários; *Streptococcus mutans*; Clorexidina.

Bengtson CRG. *In vitro* study of the influence of *Streptococcus mutans* contamination and 2% chlorhexidine digluconate disinfection on bond strength of adhesive systems to human dentin [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate, *in vitro*, the influence of *Streptococcus mutans* contamination and 2% chlorhexidine digluconate disinfection on the bond strength of two adhesive systems (an etch-and-rinse system and a self-etch system) to human dentin molars. Flat dentinal surfaces were prepared in 80 extracted human third molars. Teeth were randomly divided into 8 groups (n=10) according to the adhesive system and the dentin superficial treatment: G1 – Single Bond 2 (SB) control; G2 – Clearfil SE Bond (SE) control; G3 – Desinfection with chlorhexidine SB; G4 – Desinfection with chlorhexidine SE; G5 – Contamination with *Streptococcus mutans* SB; G6 – Contamination with *Streptococcus mutans* SE; G7 – Contamination with *Streptococcus mutans* and disinfection with chlorhexidine SB e G8 – Contamination with *Streptococcus mutans* and disinfection with chlorhexidine SE. Composite resin blocks were built up over treated surfaces, and teeth were then stored in water at 37 degrees C for 24 h. Samples were vertically sectioned, obtaining specimens with 0.8mm² cross-sectional area. Specimens were stressed in tension at 0.5 mm/min crosshead speed. Five specimens of which group were observed under SEM. Bond strength results were evaluated using ANOVA and Tukey tests(p<0.05). The modes of failures were verified using optical microscope (25X). Dentin disks were obtained from 6 additional teeth treated in the same manner for observation under SEM. No statistically significant differences of bond strength values were found between controls groups (G1 = 31,52 ± 6,24 e G2 = 42,88 ± 2,31), groups treated with chlorhexidine (G3 = 34,41 ± 6,92 e G4 = 40,14 ± 2,91) and

groups contaminated with *Streptococcus mutans* ($G7 = 31,12 \pm 5,31$ e $G8 = 39,09 \pm 3,86$). The groups contaminated with *Streptococcus mutans* that were not disinfected before the adhesive systems application presented significantly lesser results than sterile or disinfected groups ($G5 = 23,61 \pm 7,13$ e $G6 = 33,15 \pm 3,35$). Clearfil SE Bond presented significant high bond strength values than Single Bond 2, independent of dentin superficial treatment. It was concluded that the contamination *in vitro* with *Streptococcus mutans* reduced bond strength of the two adhesives systems and 2% chlorhexidine digluconate solution eliminated the contamination, reestablishing the bond strength values gotten with sterile substrates.

Key-works: Dentin-Bonding Agents; *Streptococcus mutans*; Chlorhexidine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Dente antes de ser lixado (A) e após exposição da superfície plana de dentina (B).	48
Figura 4.2 - Cuidados com a esterilização: cilindro de ar comprimido estéril (A) e fluxo laminar(B).....	49
Figura 4.3 - Confeção do bloco de resina sobre a superfície dentinária.	53
Figura 4.4 - Contaminação dos dentes em tubos de ensaio individualizados contendo a suspensão bacteriana padronizada.	55
Figura 4.5 - Corte dos dentes para obtenção dos corpos de prova em forma de palitos.	57
Figura 4.6 - Corpos de prova obtidos no corte do dente (A) e colados no jig de Geraldeli (B).....	58
Figura 4.7 - Amostras coladas em suportes metálicos e cobertas com ouro: palitos (A) e superfícies dentinárias (B).	60
Figura 5.1 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Single Bond 2 (G1).	66
Figura 5.2 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond (G2).	66
Figura 5.3 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Single Bond 2 em dentina tratada com digluconato de clorexidina 2% (G3).	67
Figura 5.4 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond em dentina tratada com digluconato de clorexidina 2% (G4).	67

Figura 5.5 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Single Bond 2 em dentina contaminada com <i>Streptococcus mutans</i> (G5).....	68
Figura 5.6 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond em dentina contaminada com <i>Streptococcus mutans</i> (G6).....	68
Figura 5.7 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Single Bond 2 em dentina contaminada com <i>Streptococcus mutans</i> e tratada com digluconato de clorexidina 2% (G7).	69
Figura 5.8 - Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond em dentina contaminada com <i>Streptococcus mutans</i> e tratada com digluconato de clorexidina 2% (G8).....	69
Figura 5.9 - Superfície dentinária após lixamento e esterilização em radiação gama (Grupo controle). Camada de esfregaço obliterando a entrada dos túbulos.	71
Figura 5.10 -Superfície dentinária após condicionamento com ácido fosfórico 37% durante 15 segundos. Observar a exposição da entrada dos túbulos dentinários.....	71
Figura 5.11-Superfície dentinária após limpeza com digluconato de clorexidina 2%. Remoção parcial da camada de esfregaço. Tampões obliterando a entrada dos túbulos (setas).....	72
Figura 5.12-Superfície dentinária após contaminação por <i>Streptococcus mutans</i> . Aglomerados bacterianos em toda superfície.....	72
Figura 5.13-Superfície dentinária após contaminação por <i>Streptococcus mutans</i> . Aglomerados bacterianos em toda superfície.....	73
Figura 5.14-Superfície dentinária após contaminação por <i>Streptococcus mutans</i> . Entrada dos túbulos dentinários (setas).....	73

- Figura 5.15-Superfície dentinária após contaminação por *Streptococcus mutans* e condicionamento com ácido fosfórico. Remanescentes bacterianos na entrada dos túbulos dentinários (setas).....74
- Figura 5.16-Superfície dentinária após contaminação por *Streptococcus mutans* e limpeza com digluconato de clorexidina 2%. Ausência de contaminação bacteriana.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Análise de variância para os valores da resistência de união pelo ensaio de microtração	62
Tabela 5.2 - Médias e diferenças estatísticas entre os grupos experimentais	63
Tabela 5.3 - Número de espécimes utilizados, perdidos e o total em cada grupo ...	64

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Substrato dentinário	19
2.2 Adesivos dentais	21
2.3 Estudos microbiológicos.....	26
2.4 Clorexidina	32
2.5 Ensaios laboratoriais	41
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5 RESULTADOS	61
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE	95
ANEXO	97

1 INTRODUÇÃO

Após a realização do condicionamento ácido do substrato de esmalte por Buonocore (1955), as restaurações estéticas ou não, vêm apresentando gradativa evolução relativa à sua qualidade. São muitos os materiais restauradores utilizados rotineiramente na Odontologia Estética, tais como: resinas compostas, cerâmicas e cerômeros.

Apesar de toda essa evolução, a Dentística Restauradora atual ainda encontra limitações no que se refere a um bom selamento das margens do preparo cavitário. A pesquisa por um material que promova vedamento ideal é tema de diversos estudos, pois essa propriedade é uma das grandes responsáveis pelo sucesso clínico das restaurações.

Dentro deste cenário, a adesão ao substrato dentinário sempre foi mais crítica quando comparada ao esmalte. Isso se deve, em parte, à composição aquosa e permeabilidade variável próprias do tecido dentinário, às características hidrofóbicas dos monômeros resinosos e às alterações fisiológicas a que esse substrato está sujeito. Várias pesquisas foram e estão sendo realizadas no sentido de aprimorar a adesividade dos materiais resinosos à dentina. Um exemplo é a evolução dos sistemas adesivos que alcançou o estágio de estabelecer a adesão por meio da formação da camada híbrida (NAKABAYASHI; KOJUMA; MASUHARA, 1982). Entretanto, a efetividade dos sistemas adesivos disponíveis atualmente, ainda depende de sua estabilidade e sensibilidade frente a diversas variáveis a que os procedimentos adesivos estão expostos.

O mecanismo de união do material restaurador à dentina é um fenômeno complexo e dependente de fatores intrínsecos do substrato como: quantidade, diâmetro e disposição espacial dos túbulos dentinários, quantidade de dentina intertubular, formação de dentina reacionária, permeabilidade e umidade da dentina e fatores externos como o a secagem excessiva ou presença demasiada de água no substrato no momento da aplicação do sistema adesivo (HEWLETT, 2003). A presença de agentes contaminantes na superfície de adesão no momento da realização do procedimento restaurador também é fator que pode comprometer a qualidade da camada híbrida formada.

Estudos têm revelado a presença de remanescentes bacterianos nas paredes de preparos cavitários, mesmo após a remoção total do tecido cariado (BESIC, 1943; CRONE, 1968; SHOVELTON, 1968). Essas bactérias persistentes em cavidades preparadas e aquelas que infiltram pela interface entre o material e as paredes da cavidade podem induzir lesões de cárie recorrentes, danos pulpares e hipersensibilidade. A contaminação bacteriana pode ainda interferir na qualidade física e na adesividade dos materiais resinosos, aumentando a microinfiltração nas margens de restaurações adesivas (GUIRADO et al., 2006).

Estudos microbiológicos têm demonstrado que dentre as diversas espécies bacterianas presentes na cavidade após o preparo cavitário, o grupo *Streptococcus mutans* é o mais constante, evidenciam ainda a importância desses microrganismos no processo da lesão de cárie e sua permanência nas paredes dos referidos preparos cavitários (KIDD; JOYSTON-BECHAL; BEIGHTON, 1993; MARCHANT et al., 2001).

Assim, tem sido recomendado o uso de soluções antimicrobianas após o preparo da cavidade (RODE; FERREIRA SANTOS, 1990) ou uso de materiais

restauradores que possam inibir o crescimento bacteriano (PINHEIRO et al., 2005). O digluconato de clorexidina representa um agente antimicrobiano promissor, por sua capacidade de reduzir, de forma significativa, os níveis bucais de microorganismos, especialmente de *Streptococcus mutans*.

Pesquisadores (BOCANGEL et al., 2000; CARRILHO et al, 2007; MILLER, 1891; RODE; FERREIRA SANTOS, 1990) têm salientado a importância da desinfecção dos preparos cavitários, porém alertam que a utilização de agentes químicos pode alterar a estrutura dentinária, podendo assim, afetar diretamente a resistência de união entre o sistema adesivo e a estrutura dental.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O estudo da interferência bacteriana na resistência de união de sistemas adesivos à dentina, necessita de uma revisão da literatura que contenha relatos sobre as características físico-químicas e biológicas do substrato dentinário e dos mecanismos que regem a adesividade. Também são de suma importância os trabalhos relativos a microbiota da doença cárie para compreensão da necessidade de desinfecção cavitária antes da realização do procedimento restaurador. Sendo assim, a revisão de literatura foi dividida em trabalhos de pesquisa sobre substrato dentinário, adesivos dentais, estudos microbiológicos, clorexidina e ensaios laboratoriais. Considerando a grande quantidade de trabalhos relativos aos temas abordados, optou-se, em partes desta revisão, por apresentar os autores agrupadamente.

2.1 Substrato dentinário

Ao contrário do esmalte, que é um tecido extremamente mineralizado e contém apenas 3% de matéria orgânica e água e, 97% de sais de cálcio, a dentina é uma mistura biológica com cerca de 18% de matriz orgânica (fibrilas colágenas tipo I), 12% de água e 70% de substâncias inorgânicas (cristais de hidroxiapatita) (MJÖR; FEJERSKOV, 1990). Além disso, o arranjo desses componentes (50% matéria inorgânica e 50% de orgânica e água por volume) faz da dentina um

substrato essencialmente problemático na união com a resina quando comparado com o esmalte (HEWLETT, 2003).

Micromorfológicamente, a dentina é composta por uma matriz colágena infiltrada por túbulos dentinários que são orientados perpendicularmente à junção amelo-dentinária (PASHLEY, 1989). Esses túbulos abrigam prolongamentos das células odontoblásticas e estão constantemente preenchidos pelo fluido pulpar, devido à pressão que é de aproximadamente 10mmHg (MARSHALL, 1993), a umidade torna-se elemento constante na dentina.

O número e o diâmetro dos túbulos variam de acordo com a proximidade da polpa e de sua localização no dente, compondo apenas 1% da superfície dentinária na junção amelo-dentinária e 22% na dentina próxima à polpa (PASHLEY, 1989). Garberoglio e Bränstrom, em 1976, observaram que, em média, a dentina superficial apresenta um número de 20.000 túbulos/mm² com cerca de 0,9µm de diâmetro; a dentina média apresenta 29.000 túbulos/mm², com cerca de 1,2µm de diâmetro, e a dentina profunda apresenta 45.000 túbulos/mm² com 2,5 µm de diâmetro. Assim quanto mais próximo da polpa, maior será a permeabilidade dentinária e sua umidade intrínseca.

Cada túbulo está envolvido por dentina peritubular, que é extremamente mineral, composta principalmente por hidroxiapatita. Entre os túbulos encontra-se a dentina intertubular, constituída essencialmente de fibrilas colágenas envolvidas por cristalitos de apatita (NAKABAYASHI; KOJUMA; MASUHARA, 1982). A dentina intertubular é considerada substrato favorável para hibridização, ocupando cerca de 96% da dentina cortada próximo da junção amelo-dentinária e apenas 12% quando próxima da polpa (GARBEROGLIO; BRÄNNSTROM, 1976).

2.2 Adesivos dentais

O estudo pioneiro relacionado a micro-retenção ao tecido dental foi realizado por Buonocore (1955), e teve como objetivo aumentar a união de acrílicos ao esmalte dentário. Assim, foram testados os ácidos fosfórico a 85% e fosfomolibídico na tentativa de alterar quimicamente a superfície do esmalte. Os resultados demonstraram que a utilização de ácido fosfórico favorece a força de união por criar micro-retenções, aumentando, desta forma a área de contato da superfície do esmalte, além de resultar ligações polares fortes entre os grupos fosfatos e o acrílico, caracterizando assim, uma forma de união química.

Desde então a odontologia adesiva tem evoluído rapidamente, devido principalmente ao fato de contribuir para o conceito da odontologia restauradora atual, que volta sua atenção para tratamentos mais conservadores, quando evita desgastes desnecessários para confecções das tradicionais caixas e retenções que visavam a preservação das características mecânicas do material (ANUSAVICE, 1998; TYAS et al., 2000).

O mecanismo de união de materiais resinosos à dentina está alicerçado basicamente nos três passos fundamentais para realização de um procedimento adesivo: condicionamento, aplicação do primer e aplicação da resina adesiva. Esse mecanismo envolve essencialmente o processo de remoção de minerais dos tecidos dentais e aplicação de monômeros resinosos, que resultam na união mecânica pelas micro-porosidades criadas, descrito por Nakabayashi, Kojuma e Masuhara (1982) e conhecido como hibridização, ou formação da camada híbrida.

Baseados na estratégia de união, dois mecanismos de ação para os sistemas adesivos estão atualmente em uso na Odontologia (VAN MEERBEEK et al., 1998, 2003). A primeira delas necessita de um condicionamento ácido antes da aplicação do adesivo (sistemas adesivos convencionais). A segunda técnica baseia-se na aplicação de monômeros ácidos, sem a necessidade de utilização do agente condicionante, lavagem e controle da umidade na superfície dentinária previamente a aplicação da resina adesiva (sistemas adesivos autocondicionantes).

Além da classificação pelo modo de ação (condicionamento ácido prévio ou autocondicionamento), os sistemas adesivos podem ser classificados de acordo com a maneira de realização ou combinação dos três passos fundamentais para a realização de um procedimento adesivo em substrato dental (condicionamento, aplicação do primer e aplicação da resina adesiva), apresentando-se em sistemas de três passos, dois passos, ou de passo único. Os adesivos autocondicionantes podem ainda ser classificados de acordo com o pH dos monômeros ácidos e agressividade das soluções, em fracos (pH ~ 2), médios (pH entre 1 e 2) ou fortes (pH < 1) (DE MUNCK, 2005).

Os sistemas adesivos utilizados na técnica de condicionamento ácido prévio, utilizam um condicionador ácido (comumente gel de ácido fosfórico entre 30 e 40%), para remover a camada de esfregaço e simultaneamente expor uma malha de fibras colágenas pela desmineralização superficial. Nos orifícios dos túbulos dentinários, a dentina peritubular é quase totalmente dissolvida com exposição das fibras colágenas oferecendo sítios retentivos adicionais nas paredes dos túbulos (VAN MEERBEEK et al., 1998). Após o condicionamento, é recomendada a manutenção da umidade da superfície dentinária, prevenindo o colapso das fibras colágenas, o

que permite molhamento e infiltração do adesivo (GWINNETT; KANCA, 1992; KANCA III, 1992; PASHLEY; CARVALHO, 1997).

O passo seguinte é a aplicação do primer, estes são agentes promotores da união e contém monômeros com propriedades hidrofílicas que têm afinidade ao agregado de fibras colágenas e propriedades hidrofóbicas para co-polimerizar com a resina adesiva. Os monômeros são dissolvidos em água ou solventes orgânicos, como acetona e etanol, que devido à sua volatilidade podem deslocar água da superfície dentinária e a umidade da rede colágena. Assim, o primer transforma a superfície dentinária hidrofílica em uma superfície hidrofóbica e absorvitiva que permite que a resina adesiva penetre com mais eficiência na rede colágena exposta. Com isso, formam-se os *tags* nos túbulos dentinários desobstruídos e a estabilização da camada híbrida formada (NAKABAYASHI; KOJUMA; MASUHARA, 1982).

A versão de três passos dos sistemas adesivos com condicionamento ácido prévio consiste na aplicação do primer e resina adesiva em passos separados, após o condicionamento com ácido fosfórico. A versão de dois passos propõe, após o condicionamento ácido da dentina, a aplicação do primer e da resina adesiva em uma única etapa (VARGAS; COBB; DENEHY, 1997).

Os sistemas adesivos autocondicionantes parecem ser os produtos mais promissores no que se refere à facilidade do uso e menor sensibilidade da técnica. Estes sistemas são utilizados no substrato seco e não requerem a fase do condicionamento com ácido fosfórico, o que diminui o tempo de aplicação clínica, e também reduz significativamente o risco de incorporação de erros durante a aplicação e manipulação. Outra importante vantagem é que a infiltração dos produtos ocorre simultaneamente com a fase do condicionamento, evitando o

colapso das fibrilas de colágeno pela secagem com ar e também, a ocorrência de fibrilas desprotegidas pela resina aplicada (CARVALHO et al., 2005; TAY et al., 2002; VAN MEERBEEK et al., 2003). Após este passo simultâneo de condicionamento e infiltração, uma camada de resina adesiva hidrófoba é então aplicada sobre a dentina tratada.

Quando um primer autocondicionante é aplicado a uma superfície de dentina coberta com a camada de esfregaço, ele condiciona através dessa camada para dentro da dentina mineralizada subjacente. Esse mecanismo de ação tem sido descrito desde 1994, quando da utilização do phenyl-P, o primeiro monômero ácido responsável em preparar esmalte e dentina para união dos materiais restauradores resinosos aos substratos dentais (CHIGIRA et al., 1994; WATANABE; NAKABAYASHI; PASHLEY, 1994). No entanto, a diferença na acidez dos primers pode refletir no efeito da desmineralização, e isso está relacionado com a habilidade de remover a camada de esfregaço e o tampão que oblitera a entrada dos túbulos dentinários (OKUDA et al., 2002).

Existem três tipos básicos de adesivos autocondicionantes: fracos, médios e fortes (VAN MEERBEEK et al. 2003). Adesivos autocondicionantes fortes têm um pH muito baixo (<1) e exibem um mecanismo e ultra-morfologia interfacial assemelhando-se ao que produz os adesivos com condicionamento ácido. Adesivos autocondicionantes fracos (pH próximo a 2) dissolvem a superfície da dentina apenas parcialmente, então um número substancial de cristais de hidroxiapatita permanecem no interior da camada híbrida. Grupos específicos de carboxil ou fosfato de monômeros funcionais podem então interagir quimicamente com a hidroxiapatita residual (YOSHIDA et al., 2004). Acredita-se que esses dois tipos de união (micromecânica e química) são vantajosos em termos de durabilidade da

restauração. O componente de união micromecânica pode em particular promover resistência a estresse abrupto de descolagem. A interação química pode resultar em adesões que melhor resistem à ruptura hidrolítica e, portanto mantém as margens da restauração seladas por um longo período (DE MUNCK et al., 2005).

Quanto à forma de aplicação estão disponíveis no mercado sistemas adesivos autocondicionantes de dois passos, compostos por um componente de resina adesiva fotopolimerizável utilizado após a aplicação de um primer autocondicionante e mais recentemente foi introduzida a técnica autocondicionante de adesão em um passo único. Os adesivos de passo único reúnem as etapas de condicionamento, infiltração e adesão em um único procedimento. Apesar destes sistemas de união serem comercializados como simplificados, devido ao menor número de passos de aplicação, eles são na realidade misturas complexas de monômeros resinosos hidrófilos e hidrófobos, solventes, água e outros aditivos (REIS et al., 2007; TAY; PASHLEY, 2001).

É descrito na literatura que características microscópicas da camada híbrida e de força de adesão em dentina são similares para adesivos autocondicionantes e com condicionamento ácido prévio, sendo ambos de dois passos. Os sistemas adesivos pertencentes à técnica com condicionamento ácido prévio de três passos possuem valores significativamente superiores aos sistemas adesivos de dois passos (convencionais ou autocondicionantes). E os piores resultados relatados foram para os sistemas adesivos autocondicionantes de passo único (DE MUNCK et al., 2003; INOUE et al., 2003; VAN MEERBEEK et al., 2003).

Tendo em vista a complexidade do mecanismo de formação da camada híbrida, a aplicação do sistema adesivo deve ser realizada de forma criteriosa, observando tanto os fatores intrínsecos do substrato dentinário (permeabilidade e

umidade) quanto fatores externos (contaminação desse substrato com fluidos bucais) já que esses são fatores que podem interferir na adesão do material resinoso à dentina (PARK; LEE, 2004; VAN SCHALKWYK et al., 2003).

2.3 Estudos microbiológicos

Besic (1943) realizou estudo em pacientes com idade entre dezesseis e vinte e cinco anos, apresentando lesões de cárie oclusal em molares. Em alguns dos casos todo tecido cariado foi removido, em outros o tecido cariado foi apenas parcialmente removido. Foram realizadas culturas microbiológicas com o tecido removido. A seguir, as cavidades foram secas e uma bolinha de algodão foi acomodada sobre a dentina. Sobre esta foi colocada uma camada de guta-percha e cimento de fosfato de zinco. Foram realizadas culturas subseqüentes após duas semanas, dois meses e um ano e meio de selamento. O autor obteve como resultados, que os *Lactobacillus* não sobreviveram mais que dez meses do selamento das lesões. *Staphylococcus* permaneceram viáveis após um ano e *Streptococcus* foram os mais resistentes em um terço dos casos após mais de um ano de acompanhamento. Um dos três casos que apresentaram culturas positivas após um ano e meio de selamento da cavidade era representante dos dentes que o tecido cariado foi clinicamente totalmente removido antes da selamento. Em trinta por cento dos casos em que as culturas apresentavam-se positivas, estas eram constituídas de *Streptococcus*. Concluiu que era necessário utilizar agentes de esterilização nas lesões de cárie profundas e próximas à polpa, não com o objetivo

de paralisar a progressão da lesão de cárie, pois essa cessa com o selamento da cavidade, mas para eliminar a possibilidade de sobrevivência dos microrganismos e, portanto, crescimento bacteriano e injúria pulpar.

Crone (1968) estudou, através de testes microbiológicos, as lesões de cárie dentinárias. Para a pesquisa foram selecionados dentes permanentes com lesões de cárie aguda. Amostras de dentina cariada amolecida foram obtidas com curetas estéreis e transferidas para caldo de cultura, depois de homogeneizados, 0,1ml foi semeado em diferentes meios de cultura para avaliação microbiológica. As bactérias predominantemente encontradas foram bastonetes e cocos Gram-positivos. Os dentes tiveram a remoção total do tecido cariado e foram encubados em tubos de ensaio com caldo enriquecedor a 37°C durante quatorze dias. Após esse período, vinte e nove dentes do total de cento e treze apresentaram crescimento bacteriano (26%) e, em oitenta e quatro dentes (74%), nenhum crescimento bacteriano foi observado. Histologicamente, cinquenta e cinco dentes (52%) apresentaram túbulos dentinários infectados e em cinquenta dentes (48%) não foi observada contaminação bacteriana. Os resultados sugerem que a remoção total do tecido cariado não retira completamente os microorganismos da parede pulpar.

Em revisão de literatura sobre as lesões de cárie dentinárias profundas, Shovelton (1968) relatou que, mesmo após remoção total do tecido cariado, túbulos dentinários infectados ainda estão presentes, embora o número de microrganismos remanescentes nesses locais seja significativamente menor que na região superficial do tecido cariado. Além disso, observou que a microbiota residual da lesão pode permanecer latente abaixo da restauração, podendo reativar-se através da entrada de fluido salivar pela interface dente/restauração.

Qvist e Qvist (1977) estudaram *in vivo* a presença, após de 1 a 4 meses, de bactérias em cavidades Classe V seladas. Para isso registraram a presença bacteriana inicial em 58 cavidades. Após o período de selamento, bactérias foram encontradas nas 13 cavidades seladas com Concise, em 14 das 15 cavidades seladas com resina e Concise, em 12 de 15 cavidades submetidas ao condicionamento ácido e seladas somente com Concise e em 8 de 15 cavidades submetidas ao condicionamento ácido e seladas com Concise e resina. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos em que as cavidades foram seladas apenas com Concise e aquele em que foi realizado o condicionamento ácido antes da restauração com Concise e resina. Observaram também que a ocorrência bacteriana nos túbulos dentinários foi superior nos grupos que receberam condicionamento ácido antes da restauração.

Friedman (1979) estudou qualitativamente e quantitativamente a presença de remanescentes bacterianos presentes em dentina esclerosada após a remoção do tecido cariado. Foram selecionados molares, pré-molares, caninos e incisivos humanos com lesões de cárie profunda. Os dentes foram extraídos e preservados em água estéril sob refrigeração, para manutenção das bactérias viáveis. Foram retiradas três amostras de cada dente: uma da lesão de cárie, outra da dentina dura e manchada, obtida após remoção do tecido cariado e a terceira da dentina totalmente hígida. Esses espécimes foram diluídos em 0,3ml de água estéril e incubados em diferentes meios de cultura. Os resultados obtidos foram bastante uniformes, sendo que 100% das amostras de dentina cariada e da esclerosada produziram crescimento bacteriano e 100% das amostras de dentina hígida não produziram. Entre as bactérias encontradas todas as amostras de dentina cariada

mostraram a presença de *Streptococcus mutans* e algumas mostraram a presença de *Streptococcus salivarius* ou *Streptococcus mitis*.

Em estudos microbiológicos de lesão de cárie, Leung, Loesche e Charbeneu (1980) observaram que houve aumento das unidades formadoras de colônia por miligrama de 105,162 para 232,086 em cavidades que tiveram remoção parcial do tecido cariado, seladas com cera por 4 semanas. Para essa pesquisa foram selecionados 40 dentes permanentes com lesões de cárie profunda. A abertura da lesão foi feita com alta rotação, sendo parte do tecido cariado removido com curetas e o restante permanecendo na cavidade. A lesão foi selada com hidróxido de cálcio ou cera. Após quatro semanas o restante do tecido cariado foi removido em ambos os grupos. Os procedimentos microbiológicos consistiram na contagem bacteriana antes e depois do período experimental. Os pesquisadores concluíram que o tratamento das lesões de cárie dentinária com hidróxido de cálcio resultou em diminuição de mais de 90% da média numérica de ufc/mg após 4 semanas.

Bergenholtz et al. (1982) em estudo histopatológico do tecido pulpar de dentes com restauração de cavidades Classe V com diferentes materiais (compósito, amalgama, silicato e gutapercha) demonstraram que as bactérias que infiltram pela interface material restaurador/substrato dental causam danos pulpares.

Grieve, Alani e Saunders (1991) estudaram o efeito de uma resina composta e dois sistemas adesivos associados a microinfiltração bacteriana na polpa dental. Foram preparadas cavidades Classe V na superfície vestibular de caninos de 18 ferrets. Após o condicionamento ácido das margens de esmalte, as cavidades foram restauradas somente com a resina composta ou em combinação com um dos sistemas adesivos utilizados, Scotchbond e Gluma. Uma cavidade em cada animal foi restaurada com Kalzinol para controle. Os animais foram mortos após 7,14 e 28

dias. Foi realizado o estudo histológico da polpa dos dentes estudados, sendo as alterações pulpares classificadas qualitativamente e quantitativamente de acordo com critério padrão. Foram detectadas variações na resposta pulpar em todos os períodos analisados. Não foi observada inflamação pulpar no grupo controle. Foram identificadas bactérias Gram-positivas na interface da restauração, nas paredes cavitárias e ainda nos túbulos dentinários em que foi detectada inflamação pulpar.

Hoshino et al. (1992) estudaram a invasão bacteriana em polpas não expostas ao meio bucal. Foram utilizados terceiros molares permanentes humanos portadores de lesões de cárie oclusal em dentina sem exposição pulpar e terceiros molares hígidos para controle. Após a exodontia, os dentes foram seccionados horizontalmente para remoção do tecido pulpar. As amostras foram incubadas em ágar BHI, em anaerobiose a 37°C. Foi observado contaminação bacteriana em seis dos nove dentes com lesões de cárie profunda sem exposição pulpar e nenhuma contaminação no grupo controle. As bactérias predominantemente encontradas foram anaeróbios obrigatórios, sendo 91% bastonetes Gram-positivos, 7% cocos Gram-positivos e 2% cocos Gram-negativos.

Kidd, Joyston-Bechal e Beighton (1993) tiveram como proposta estudar a atividade de cárie durante o preparo cavitário. Para a pesquisa selecionaram pacientes adultos com lesões de cárie primárias ou secundárias em restaurações deficientes. Foram coletados três tipos de amostras de cada dente: dentina cariada inicial, dentina após remoção do tecido cariado utilizando o critério clínico e dentina após remoção total do tecido cariado auxiliada com corante detector de cárie. As amostras foram transferidas para caldo de cultura e 0,1ml da solução semeada em placas para avaliação de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* e total de viáveis. Embora tenha sido detectada a presença de bactérias nas cavidades sem cárie, o

número de microrganismos é significativamente maior nas lesões de cárie dentinária. Foi detectada a presença de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* nas amostras coletadas.

Para estudar a microbiota predominante das lesões de cárie, Marchant et al. (2001) selecionaram crianças com lesões de cárie em dentes decíduos indicados para exodontia e o grupo controle foi composto de crianças da mesma faixa etária sem lesões de cárie. Foram coletados, das lesões de cárie, a dentina infectada e dos dentes sem lesões, o biofilme. As amostras foram diluídas e homogeneizadas, 100ml de cada diluição inoculados em meios seletivos e não seletivos para isolar os microrganismos predominantes. *Streptococcus mutans* constituiu a maior proporção bacteriana das lesões de cárie, e o *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus gordonii* foram mais significantes no biofilme dos dentes sem lesão de cárie.

Frencken e Holmgren (2001) relataram que microrganismos estão presentes na camada superficial da lesão de cárie enquanto nas camadas mais profundas e próximas da polpa são pouco encontrados. Porém, durante o preparo cavitário, quando a dentina é removida com brocas, aproximadamente 45.000 túbulos dentinários por milímetro quadrado podem estar sendo expostos, dificultando a erradicação total de microrganismos. Sendo assim, na realização de preparos cavitários sempre serão encontrados remanescentes microbianos.

Pinheiro et al. (2005) estudaram através da contagem do total de bactérias viáveis e de microscopia eletrônica de varredura, o comportamento da dentina infectada após o selamento com cimento de ionômero de vidro associado a 1% de metronidazol, 1% de ciprofloxacina e 1% de cefaclor. O cimento ionomérico associado a antibióticos apresentou redução significativa superior da microbiota da

dentina infectada quando comparado com o cimento ionomérico convencional, com média de 98,65% de diminuição do total de bactérias viáveis. Além disso, em microscopia eletrônica de varredura, a dentina selada com o cimento ionomérico experimental apresentou agregados bacteriano, dentina intertubular com exposição das fibras colágenas e túbulos dentinários.

Em trabalho *in vitro* Guirado et al. (2006), avaliaram a possível interferência da contaminação por *Streptococcus mutans* na microinfiltração marginal de restaurações com o sistema adesivo Primer & Bond associado à resina composta TPH. Observaram que as cavidades submetidas à contaminação por *Streptococcus mutans* previamente à restauração adesiva apresentaram maior microinfiltração. Além disso, a utilização da clorexidina 2% por 30 segundos para descontaminação da cavidade acarretou em redução microbiana com escores de microinfiltração similares as cavidades estéreis antes da restauração adesiva.

2.4 Clorexidina

Historicamente, a utilização de agentes para a limpeza cavitária iniciou-se com o uso empírico de substâncias que muitas vezes são agressivas aos tecidos dentários, pois a preocupação estava voltada apenas para a esterilização da cavidade (MILLER, 1891). Dentre as substâncias que foram indicadas e usadas, encontravam-se o nitrato de prata, a solução de Howe, o creosoto de faia, fenol, zefiran, timol, álcool, peróxido de hidrogênio a 30%, eugenol (RODE; FERREIRA SANTOS, 1990). Por outro lado, a preocupação com a manutenção de tecidos

saudáveis fez diminuir a utilização de soluções cuja biocompatibilidade com o complexo dentina-polpa fosse incerta (RODE; FERREIRA SANTOS, 1990).

Novas perspectivas para o tratamento e a limpeza das cavidades têm surgido desde relatos da existência de uma camada de esfregaço dentinário (EICK et al., 1970; GWINNETT, 1984; PASHLEY, 1984). Podem ser observados na literatura estudos com substâncias que são capazes de remover totalmente essa camada, as substâncias desmineralizantes como, por exemplo, os ácidos cítrico e fosfórico ou as soluções que removem apenas a camada superficial, como o digluconato de clorexidina e o fluoreto de sódio, que eliminam os microrganismos e mantêm os túbulos obliterados ou ainda substâncias que não removem a camada de esfregaço, como soluções à base de hidróxido de cálcio e álcool (RODE; FERREIRA SANTOS, 1990).

O digluconato de clorexidina representa um agente antimicrobiano promissor para uso odontológico, por sua capacidade de reduzir, de forma significativa, os níveis bucais de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus* (BONDENSTAM et al., 1996; CLARCK; MORGAN; MACENTEE, 1991; EPSTEIN et al., 1991; SANT'ANNA et al., 2001; VAN RIJKOM; TRUIN; VAN'T HOF, 1996). Além disso, quando usado como desinfetante, tem se mostrado efetivo também na redução dos níveis de *Streptococcus mutans* localizados em superfícies radiculares cariadas (FARDAL; TURNBULL, 1986; FURE; EMILSON, 1990). Quando aplicado subgengivalmente, demonstra eficiência no auxílio do tratamento periodontal (KELTJENS et al., 1991; OOSTERWAAL et al., 1989).

A clorexidina foi introduzida como desinfetante geral de amplo espectro antibacteriano, para bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, anaeróbios facultativos e aeróbios. A clorexidina é uma molécula bicatiônica

simétrica formada por dois anéis quatro clorofenil e dois grupos bisguanidas conectados por uma cadeia central de hexametileno. Sua forma mais estável é na forma de um sal e a preparação mais comum é o sal de digluconato por sua alta solubilidade em água (FARDAL; TURNBULL, 1986). Quando em baixas concentrações, provoca lixiviação de substâncias com pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático e, em altas concentrações, é bactericida (BASCONES; MANSO, 1995). O mecanismo de ação responsável pela morte bacteriana caracteriza-se pela alteração eletroforética em todo microorganismo quando a clorexidina é absorvida pela parede celular. Quando ela entra em contato com a membrana celular sua integridade se altera e facilita a liberação dos componentes intracelulares e precipitação citoplasmática (SANT'ANNA et al., 2001).

De acordo com alguns estudos, o digluconato de clorexidina está indicado para a desinfecção dentinária quando da realização de preparos cavitários, por possuir eficiência contra microorganismos da cavidade bucal e do processo da doença cárie e não interferir negativamente nas propriedades mecânicas dos sistemas adesivos (BOCANGEL et al., 2000; BRACKETT et al., 2007; CARRILHO et al., 2007; DE CASTRO et al., 2003; EL-HOUSSEINY; JAMJOUR, 2000; FILLER, 1994; GÜRGAN; BOLAY; KIREMITCI, 1999; PERDIGÃO; DENEHY; SWIFT, 1994; RABELLO; COELHO, 1998; SAY et al., 2004). Entretanto, alguns pesquisadores relatam que uso desse desinfetante durante os procedimentos adesivos pode promover alteração na propriedade que algumas resinas hidrofílicas possuem de se unirem micromecanicamente à dentina (CAO et al., 1995; GÜRGAN; BOLAY; KIREMITCI, 1999; MEIERS; KRESIN, 1996; MEIERS; SHOOK, 1996; TULUNOGLU et al., 1998). A presença dessas substâncias poderia, teoricamente, servir como uma

barreira à penetração do agente adesivo, evitando assim o contato íntimo deste com a dentina e, conseqüentemente, interferindo no processo de adesão.

Filler et al. (1994) avaliaram o efeito da solução de clorexidina na resistência de união da resina composta ao esmalte. Os testes de cisalhamento demonstraram não haver diferenças significativas com relação à resistência de união entre o esmalte tratado com a clorexidina ($13,67 \pm 3,22$ MPa) e o esmalte não tratado ($13,23 \pm 3,22$ MPa). Os autores observaram também um elevado número de fraturas do tipo adesiva.

Perdigão, Denehy e Swift (1994) avaliaram o efeito da clorexidina a 2% nas superfícies de dentina e sua influência na resistência de união da resina à mesma. A clorexidina foi utilizada após a remoção da camada de esfregaço pelo condicionamento com ácido fosfórico e posteriormente foi realizada a restauração utilizando o sistema adesivo All-Bond 2 e a resina composta Z 100. Os resultados desse estudo demonstraram não haver diferenças estatísticas na resistência ao cisalhamento do grupo controle e do grupo em que houve aplicação do desinfetante. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou que a clorexidina a 2% depositou debris na superfície dentinária e dentro dos túbulos dentinários da dentina condicionada com ácido fosfórico a 10%.

Cao et al. (1995), demonstraram que desinfetantes cavitários podem interferir na resistência ao cisalhamento de adesivos à dentina humana, porém essa interferência depende do tipo do adesivo e do desinfetante utilizado. Para o estudo utilizaram sete desinfetantes dentinários (Ácido fosfórico a 32% com cloreto benzalquônio, Cavity Cleanser, Concepsis, Concepsis Scrub, Hibiclens, Tubulicid e Ácido fosfórico a 10% com cloreto de benzalquônio) e três sistemas adesivos (All-Bond 2, Amalgambond Plus e Permagen). Piores resultados foram obtidos para o

Amalgambond Plus, seguido pelo All-Bond 2 e Permagen respectivamente quando algum tipo de desinfetante foi utilizado.

Meiers e Shook (1996) avaliaram o efeito de dois desinfetantes de cavidade, Bisco Cavity Cleanser (digluconato de clorexidina 2%) e Oral-5 (iodine/iodine-potássio/sulfato), na resistência de união da resina à dentina. Estes foram aplicados sobre a superfície dentinária de molares humanos extraídos durante 20s e lavados, previamente à realização das restaurações com dois sistemas adesivos diferentes (Syntac e Tenure). Os resultados mostraram valores de resistência ao cisalhamento significativamente menores apenas para os grupos tratados com o adesivo Syntac, independente do desinfetante testado. Além disso, maior número de falhas adesivas foram demonstradas para o adesivo Syntac, enquanto que para o sistema adesivo Tenure houve maior número de falhas coesivas em resina.

Meiers e Kresin (1996) utilizaram os mesmos adesivos e desinfetantes para avaliar interferência na microinfiltração marginal, não encontrando nenhuma diferença significativa entre os grupos tratados com clorexidina 2%. Observaram em microscopia eletrônica de varredura que a camada de esfregaço mostrou diferenças na resposta ao condicionamento ácido produzido pelos sistemas adesivos quando tratadas previamente com os desinfetantes cavitários. Sugerem que a camada de esfregaço tratada com clorexidina se torna mais ácido resistente, impermeável e firmemente aderida, fazendo com que a dentina fique protegida da ação de fluidos bucais.

Rabello e Coelho (1998) estudaram a influência da utilização de um agente desinfetante cavitário, clorexidina a 2%, antes e após o condicionamento ácido fosfórico a 37%, sobre a resistência ao cisalhamento de um sistema adesivo dentinário (Stae). Os dentes foram divididos em três grupos de acordo com a

sequência de tratamento da superfície dentinária: grupo 1, clorexidina a 2% seguida de ácido fosfórico a 37%; grupo 2, ácido fosfórico a 37% seguido de clorexidina a 2%; e grupo 3, controle, no qual o agente desinfetante não foi usado. Após o tratamento das superfícies dentinárias e fixação dos compósitos, as amostras foram testadas utilizando-se uma máquina Instron para ensaios mecânicos. Os valores da resistência ao cisalhamento (Média±DP,MPa) foram: grupo 1, 19,33±5,37; grupo 2, 19,73±4,72; e grupo 3, 20,63±5,75. Nenhuma diferença significativa ficou estatisticamente evidente entre os grupos.

Tulunoglu et al. (1998), em estudo in vivo, avaliaram a microinfiltração marginal de dois desinfetantes cavitários (clorexidina 2% e desinfetante a base de álcool), aplicados durante 20s, antes da utilização dos sistemas adesivos Syntac e Prime & Bond em restaurações classe V com resina composta. Enquanto o desinfetante cavitário a base álcool não interferiu na capacidade dos agentes adesivos prevenirem a microinfiltração, por outro lado, a solução de clorexidina produziu microinfiltração significativamente maior em ambos os sistemas adesivos, quando comparados aos grupos controles.

O efeito da clorexidina 2% (Concepis) na resistência de união da resina à dentina foi avaliado por Gürkan, Bolay e Kiremitci (1999). Para isso utilizaram as superfícies linguais de 64 terceiros molares humanos hígidos. Essas superfícies foram lixadas até a exposição da dentina e os dentes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=16). No grupo 1 (grupo controle), a superfície dentinária foi tratada com ácido fosfórico 35%, aplicou-se o primer e o adesivo (Permagen). No grupo 2, foi aplicado o desinfetante cavitário, o ácido fosfórico, o primer e o adesivo, nessa ordem. No grupo 3, o desinfetante cavitário foi aplicado após o condicionamento ácido. E no grupo 4, o desinfetante foi aplicado conforme o grupo 3, porém foi lavado

antes da aplicação do primer. Foram confeccionados corpos de prova de 4mm de diâmetro em resina composta nessas superfícies e os espécimes foram submetidos ao teste de cisalhamento. A aplicação da clorexidina antes ou após o condicionamento ácido, diminuiu a resistência ao cisalhamento da resina composta à dentina; entretanto, lavando-se o desinfetante antes do procedimento adesivo, a resistência de união não é afetada.

Bocangel et al. (2000), avaliaram a influência de três agentes desinfetantes, hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina a 2% e flúor acidulado a 1,23%, na adesão do sistema adesivo Scotchbond Multipurpose Plus à dentina. Os desinfetantes foram utilizados durante 40s para a clorexidina e hipoclorito e 4min para o flúor, e lavados previamente ao condicionamento da dentina com ácido fosfórico. Os autores concluíram que as soluções desinfetantes não afetaram adversamente a resistência à tração do sistema adesivo à dentina.

El-Housseiny e Jamjoum (2000) estudaram a influência do digluconato de clorexidina 2% e de soluções detectoras de cárie na resistência ao cisalhamento do sistema adesivo Scotchbond Multipurpose Plus à dentina e ao esmalte. As soluções foram aplicadas durante 10s e lavadas antes da utilização do sistema adesivo, não sendo encontrada diferença estaticamente significativa nos resultados de resistência à união entre os grupos. O estudo avaliou também as superfícies utilizando microscopia eletrônica de varredura, onde foi evidenciado que as soluções não removeram a camada de esfregaço e promoveram a formação de um precipitado sobre os dois tipos de substratos. Após o condicionamento ácido, tanto a dentina como o esmalte apresentaram-se parcialmente desmineralizados.

Para avaliar o efeito do digluconato de clorexidina na adesão de três sistemas adesivos, de Castro et al. (2003), utilizaram o teste de microtração. Para este

estudo, os autores utilizaram 24 terceiros molares humanos hígidos, com sua face oclusal lixada até a exposição de uma superfície plana de dentina. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=3) de acordo com o sistema adesivo utilizado (Prime & Bond NT, Single Bond e Clearfil SE Bond), aplicação (sim ou não) de clorexidina e o momento da aplicação (antes ou depois do condicionamento ácido). Foram confeccionados corpos de prova em resina composta nas superfícies tratadas e os dentes foram armazenados em água à 37°C por 24 horas. Os dentes foram seccionados verticalmente obtendo-se espécimes com área de secção transversal de aproximadamente 1mm². Os espécimes foram tracionados a velocidade de 0,5mm/min. Discos de dentina foram obtidos de 3 dentes adicionais, para observação em microscopia eletrônica de varredura das superfícies submetidos aos mesmos tratamentos realizados para o teste de microtração. Concluíram que o desinfetante não interferiu na força de adesão dos materiais resinosos testados nas situações apresentadas.

Say et al. (2004) avaliaram a interferência de dois desinfetantes cavitários, Consepsis (clorexidina 2%) e Ultracid F (EDTA), na força de tração e cisalhamento de dois sistemas adesivos. Os desinfetantes cavitários foram utilizados durante 20s após o condicionamento ácido da dentina. Concluíram que o uso dessas soluções como desinfetantes cavitários não afetam a resistência à tração e ao cisalhamento dos sistemas adesivos One Step e Optibond Solo.

Carrilho et al. (2007), estudaram o uso de digluconato de clorexidina 2% na preservação da camada híbrida. Realizaram preparos Classe I em terceiros molares humanos hígidos e dividiram essas cavidades ao meio no sentido vestibulo-lingual. Uma metade foi restaurada da maneira convencional com o sistema adesivo Single Bond 2 (condicionamento ácido e aplicação do primer/adesivo) e a outra foi tratada

com digluconato de clorexidina 2% após o condicionamento ácido antes de ser restaurada. Os espécimes foram armazenados em saliva artificial com e sem inibidores de proteases. Foram avaliados as forças de resistência de união e o modo de fratura imediatamente a preparação dos espécimes e após 6 meses de armazenamento. A aplicação do desinfetante não interferiu negativamente na força de microtração do sistema adesivo Single Bond quando o teste foi aplicado imediatamente após o seccionamento dos dentes. Porém, quando o teste foi aplicado 6 meses depois do seccionamento, o grupo que recebeu aplicação de clorexidina após o condicionamento ácido teve valores de resistência adesiva maiores que o grupo controle. Inibidores de proteases não tiveram efeito significativo na resistência adesiva dos grupos testados.

Brackett et al. (2007), avaliaram em estudo *in vivo* a interferência do digluconato de clorexidina 2% na preservação da camada híbrida. Utilizaram para esse estudo 12 pares de pré-molares hígidos agendados para extração com finalidade ortodôntica. Foram realizados preparos Classe I nesses dentes, que foram posteriormente restaurados e avaliados após dois e seis meses. O sistema adesivo utilizado foi Single Bond Plus, que para o grupo controle foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante, enquanto que o grupo experimental recebeu aplicação de solução de digluconato de clorexidina 2% por 30 segundos após o condicionamento ácido. Além do experimento *in vivo*, foi realizado o teste de microtração em laboratório, usando dentes hígidos extraídos, para avaliar a interferência da substância antimicrobiana na resistência de união do sistema adesivo utilizado. Não encontraram diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo experimental, e ainda constataram que a clorexidina foi

capaz de preservar a camada híbrida nos grupos após 6 meses da realização da restauração.

2.5 Ensaios laboratoriais

Testes laboratoriais de resistência de união são comumente realizados a fim de se avaliar a eficácia ou mesmo prever o comportamento clínico de um sistema restaurador, ainda que seja impossível reproduzir *in vitro* exatamente o que ocorre na situação clínica (RETIEF, 1991). A análise racional que envolve esses métodos de ensaio é que quanto mais forte a união entre os dentes e os materiais, mais resistência estes terão frente às tensões geradas pela contração da polimerização e pelos desafios da cavidade bucal. Os testes de cisalhamento e microtração têm sido os instrumentos científicos mais utilizados para aferição da resistência adesiva, tanto à dentina quanto ao esmalte (PASHLEY et al., 1999; DE MUNCK et al., 2005).

Sano et al. (1994), publicaram um estudo sobre resistência adesiva em pequenas áreas do substrato, modificando a metodologia do teste de tração com a redução das dimensões dos corpos de prova. Este foi o estudo pioneiro com a metodologia do teste de microtração. Neste caso, as áreas de união variavam entre 0,5 X 0,5mm e 3,0 X 3,0mm. Os autores concluíram que a resistência de união é dependente da área aderida, sendo que quanto menor a área, maior o valor de resistência obtido. Além disso, os autores encontraram menor ocorrência de falhas coesivas nos espécimes com área reduzida. A razão atribuída para tais fenômenos foi que uma interface adesiva pequena, como essa utilizada no ensaio de

microtração, continha menos defeitos e concentradores de estresse na interface do substrato, quando comparada com os espécimes maiores utilizados nos ensaios de cisalhamento e tração. Desta forma, durante a aplicação do teste, a concentração de tensões nesses defeitos, inicia a formação e propagação de trincas, resultando conseqüentemente na ruptura a níveis de carga baixos.

De acordo com a teoria de defeito de Griffith (1921), a resistência à tração de materiais friáveis diminui quando se aumenta a área de união. O mesmo pode ser verdadeiro em áreas de união à dentina. A zona de união não é uniforme microscopicamente, contendo bolhas de ar, separações de fase, rugosidade superficial e espessura não uniforme de película de adesivo (PASHLEY et al., 1995).

Phrukkanon, Burrow e Tyas (1998) realizaram trabalho com objetivo de determinar o efeito da área de adesão nas forças de tração e cisalhamento de quatro sistemas adesivos (Scotchbond MP Plus, OptiBond FL, OptiBond Solo e One-Setp). Para tanto, utilizou-se sessenta molares humanos extraídos, os quais foram cortados verticalmente. Em seguida removeu-se o esmalte oclusal de forma que metade do dente foi usada pra avaliar a resistência adesiva frente a força de tração e a outra metade, à força de cisalhamento. A dentina exposta na superfície oclusal foi tratada com um dos diferentes sistemas adesivos seguindo-se as recomendações do fabricante e restaurada com resina composta. Desta forma, cada metade de dente reconstruída foi seccionada em pelo menos três espécimes em forma de barras quadrangulares, as quais, em seguida, foram trabalhadas com ponta diamantada em alta rotação que possibilitava a produção de espécimes cilíndricos com 1,2, 1,4 ou 2,0mm de diâmetro na região da interface adesiva. Estes foram armazenados em água durante 48 horas à 37°C para, em seguida, serem avaliados quanto a resistência adesiva. Para todos os materiais, o grupo com 2,0mm de

diâmetro na área da secção transversal apresentou resistência adesiva significativamente menor do que o grupo de 1,2mm de diâmetro; independente do teste aplicado. Além disso, a maioria dos espécimes de 1,2 ou 1,4mm de diâmetro apresentou falha adesiva na interface entre dentina e adesivo. Os resultados indicaram que áreas superficiais de adesão menores estão associadas a valores de resistência adesiva maiores e que o efeito da força, seja ela de tração ou de cisalhamento, é semelhante.

Schreiner et al. (1998) realizaram um trabalho para testar a hipótese de diferença entre os valores de resistência de união obtidos ao empregar-se o teste de cisalhamento e o teste de microtração. Para a avaliação da resistência de união pela técnica de microtração, utilizaram-se 30 dentes divididos em cinco grupos dependendo do sistema adesivo testado (Clearfil Liner Bond, Prime e Bond, Scotchbond Multipurpose com ácido fosfórico e com ácido maleico e Scotchbond Bond Multipurpose Plus). Após a realização das restaurações, os dentes foram seccionados e preparados para o teste, cuja área de adesão foi de aproximadamente $1,7\text{mm}^2$. Assim, após armazenamento por 24 horas a 37°C em solução salina, realizaram-se as leituras. Para a avaliação da resistência de união pela técnica de cisalhamento, empregou-se 35 dentes divididos nos mesmos 5 grupos. Neste caso, a área de união testada foi de 3,4mm de diâmetro. Todos os espécimes, independente do tipo de teste, foram posteriormente observados em microscópio óptico e em MEV. Para o teste de microtração o sistema adesivo Clearfil apresentou valores de resistência de união estatisticamente significante maiores que os outros sistemas adesivos. Para o teste de cisalhamento não houve diferença entre os grupos. Os autores concluíram que o teste de microtração é um meio mais fiel para se avaliar a resistência de união que o teste de cisalhamento.

Cardoso, Braga e Carrilho (1998) estudaram a força de união dos sistemas adesivos Single Bond, Scotchbond Multi-Purpose Plus e Etch&Prime 3.0 utilizando os testes de tração, microtração e cisalhamento. A média dos valores obtidos para o teste de microtração com área de secção transversal de aproximadamente $0,25\text{mm}^2$ foi $31,69 \pm 10,67$, para o teste de cisalhamento $9,68 \pm 5,08$ e para o teste de tração $6,85 \pm 3,96$. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os adesivos no teste de microtração, mas nos testes de tração e cisalhamento o sistema adesivo Single Bond apresentou valores estatisticamente maiores que os outros adesivos estudados. Os autores concluíram que dependendo da metodologia aplicada para se estudar a adesividade de sistemas adesivos, as diferenças entre esses sistemas podem variar.

Devido à menor ocorrência de fraturas coesivas, à maior facilidade de alinhamento dos corpos de prova garantindo uma melhor axialidade da carga, à possibilidade de avaliação de pequenas regiões clinicamente relevantes e à obtenção de múltiplos espécimes com um único dente, fizeram com que o teste de microtração tem se tornado uma das metodologias mais utilizadas para testar a resistência de união dos sistemas adesivos ao substrato dental (DE MUNCK et al., 2005; PASHELY et al 1995).

Suzuki, Gonzatto e Samuel (1998) tiveram como objetivo em sua pesquisa, avaliar a correlação entre os testes de tração e microinfiltração. Vinte molares humanos hígidos, extraídos e autoclavados, foram seccionados no sentido transversal ao longo de seu eixo. Os fragmentos foram incluídos separadamente em tubos de PVC. A seguir os fragmentos foram unidos com resina composta Concise (3M) e Z 100 (3M) com o sistema adesivo indicado. Após a união, os corpos de prova foram submetidos a 100 ciclos térmicos e imersos em solução aquosa de azul

de metileno, a 0,5%. Após 24h, os corpos de prova foram submetidos ao ensaio de tração em uma máquina de ensaio universal (EMIC DL-2000). Após a separação dos fragmentos, os níveis de microinfiltração foram analisados com o auxílio de um microscópio. Os resultados dos dois ensaios foram submetidos ao teste de correlação de Spearman. Os valores para Concise e Z-100 foram, respectivamente, -0,709 e -0,874, mostrando uma forte correlação negativa entre os testes, ou seja, quanto maior a força de união, menor o nível de microinfiltração.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Avaliar *in vitro* a influência da contaminação com *Streptococcus mutans* na adesão de dois sistemas adesivos (um sistema adesivo convencional e um sistema adesivo autocondicionante) à dentina de molares humanos.

3.2 Avaliar a influência da solução de digluconato de clorexidina 2% na adesão de sistemas adesivos em dentina de molares humanos com e sem contaminação por *Streptococcus mutans*.

3.3 Avaliar e comparar a eficiência de um sistema adesivo convencional e um autocondicionante em diferentes tratamentos da superfície dentinária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A realização dessa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP), parecer de aprovação nº174/06 (ANEXO A).

Foram utilizados 80 terceiros molares humanos hígidos e não irrompidos, devido à menor probabilidade de apresentarem trincas (HAYASHI, 1994), fornecidos pelo Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os dentes foram limpos com curetas periodontais, lavados, secos e observados em lupa estereoscópica (Olympus, Japan) com 25X de aumento para confirmar a ausência de defeitos e trincas pré-existentes, sendo em seguida armazenados, por no máximo três meses, em água destilada a 4°C.

4.1 Exposição e esterilização da dentina

Para se estudar a adesão em dentina, os dentes selecionados tiveram suas faces oclusais lixadas com auxílio de lixas d'água de carboneto de silício (BUEHLER, USA) de granulação decrescente, sob refrigeração, adaptadas a uma politriz Ecomet 3 (BUEHLER, USA), de modo que houvesse a exposição de uma superfície plana de dentina e que uma camada de esfregaço padrão fosse criada. Foram utilizadas lixas de granulação 120 e 240 para expor a dentina. Em seguida foi

usada lixa 400 por 10 segundos e lixa 600 por 60 segundos, rotacionando o dente em 90° para um melhor polimento da superfície dentinária (Figuras 4.1).

Figura 4.1 – Dente antes de ser lixado (A) e após exposição da superfície plana de dentina (B)

Após a obtenção das superfícies desejadas, os dentes foram lavados em água corrente, sendo depois imersos em 2ml de água destilada em tubos de ensaio individualizados. Foram submetidos à esterilização em radiação gama, em irradiador de ^{60}Co (Gammacell), com atividade de 8,35kCi e taxa de dose 5,01kGY/h.

Para confirmar a esterilização, um dente de cada grupo foi colocado em solução de Tryptic Soy Broth (TSB) e incubado por 24 horas a 37°C. Após esse período foi feita a medida da densidade óptica dessa solução, utilizando comprimento de onda de 600nm em espectrofotômetro. Não sendo constatada proliferação bacteriana nas soluções de TSB, cada dente teste foi transferido para 2ml de água destilada estéril em tubos individuais, e estocados por 24 horas em estufa Orion (FANEM, Brasil) a 37°C para remoção do meio de cultura e evitar desidratação (TÜRKÜN et al., 2005).

Após a estocagem em água destilada estéril, os dentes de cada grupo foram secos com papel absorvente estéreis sob o fluxo laminar para serem utilizados nas próximas etapas do experimento.

4.2 Cuidados com a esterilização

Para reduzir a probabilidade de ocorrência de contaminação secundária todos os procedimentos das fases de manipulação das cepas bacterianas e de utilização dos sistemas adesivos foram realizados no interior de um fluxo laminar. Com o mesmo intuito, foi utilizado um cilindro de ar contendo ar comprimido estéril, composto de 21% de oxigênio e 79% de nitrogênio (White Martins, Brasil), sendo neste adaptado uma seringa tríplice, para realização da secagem dos substratos durante os procedimentos adesivos (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Cuidados com a esterilização: cilindro de ar comprimido estéril (A) e fluxo laminar(B)

4.3 Materiais utilizados

Os materiais utilizados nessa pesquisa estão descritos no Quadro 4.1.

Material / Fabricante	Composição	Lote
Sistema Adesivo Single Bond / 3M ESPE	Ácido fosfórico 35% Bis-GMA, HEMA, PAA, etanol e água	5EC
Sistema Adesivo Clearfil SE Bond / KURARAY	<i>Primer:</i> MDP, HEMA, dimetacrilatos hidrófilos, CQ, água <i>Adesivo:</i> MDP, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilatos hidrófilos, micropartículas	51331
Digluconato de Clorexidina 2% / Ao Farmacêutico	Digluconato de Clorexidina 2%	-----
Resina Composta Filtek Z-250 / 3M ESPE	Bis-GMA, UEDMA, Bis-EMA, partículas inorgânicas de zircônia/sílica (60% em volume)	6UN
Abreviações: Bis-GMA = bisfenol-glicidil-metacrilato; HEMA = 2-hidroxietilmetacrilato; PAA = co-polímero de ácido polialcenóico; CQ = canforquinona; MDP = 10-metacrililoixidecil dihidrogênio fosfato; UEDMA = uretanoetil dimetacrilato; Bis-EMA = bisfenol-polietileno glicol dimetacrilato.		

Quadro 4.1 – Materiais utilizados, composição e lote

4.4 Grupos experimentais

Os dentes foram divididos em oito grupos de acordo com o tratamento do substrato dentinário e sistema adesivo estudados, sendo cada grupo experimental composto por 10 dentes (n=10).

Grupo 1 (G1) – Dentina sem contaminação bacteriana e sistema adesivo com condicionamento ácido prévio;

Grupo 2 (G2) – Dentina sem contaminação bacteriana e sistema adesivo autocondicionante;

Grupo 3 (G3) – Dentina sem contaminação bacteriana, com aplicação de digluconato de clorexidina 2% e sistema adesivo com condicionamento ácido prévio;

Grupo 4 (G4) – Dentina sem contaminação bacteriana, com aplicação de digluconato de clorexidina 2% e sistema adesivo autocondicionante;

Grupo 5 (G5) – Dentina com contaminação bacteriana e sistema adesivo com condicionamento ácido prévio;

Grupo 6 (G6) – Dentina com contaminação bacteriana e sistema adesivo autocondicionante;

Grupo 7 (G7) – Dentina com contaminação bacteriana, descontaminação com digluconato de clorexidina 2% e sistema adesivo com condicionamento ácido prévio;

Grupo 8 (G8) – Dentina com contaminação bacteriana, descontaminação com digluconato de clorexidina 2% e sistema adesivo autocondicionante.

4.4.1 Preparo dos grupos sem contaminação da dentina (G1 e G2)

Nas superfícies dentinárias previamente lixadas e esterilizadas, foram aplicados os sistemas adesivos dos grupos correspondentes seguindo as recomendações do fabricante (Quadro 4.2). Para o G1 foi utilizado o material Single Bond 2, sistema adesivo representante da técnica com condicionamento prévio. E para o G2 o material utilizado foi o Clearfil SE Bond, adesivo com primer auto-condicionante, que dispensa a aplicação prévia de ácido fosfórico, por condicionar a superfície através de monômeros acídicos incorporados ao primer, sendo essa etapa seguida pela aplicação do bond.

Sistemas Adesivos	Classificação	Procedimentos de união
Single Bond 2	Dois passos com cond. ácido	Condicionamento - aplicar 15s, lavar 10s, manter úmido. Adesivo - aplicar 2 camadas, ar 2-5s, fotoativar 10s.
Clearfil SE Bond	Dois passos autocondicionante	<i>Primer</i> - aplicar e esperar 20s, leve jato de ar. Adesivo - aplicar, leve jato de ar, fotoativar 10s.

Quadro 4.2 – Sistemas adesivos utilizados e fabricantes, classificação e procedimentos de união

Após a aplicação dos sistemas adesivos, um bloco de resina composta Z-250, com dimensões aproximadas de 5X5X5mm, foi construído na superfície dentinária através da técnica incremental, sendo cada camada, de aproximadamente 1mm, fotoativada por 40 segundos. O aparelho fotopolimerizador utilizado foi Jetlite 4000 Plus (J. Morita, USA) com intensidade de 1000 mW/cm², medida pelo aparelho

radiômetro Curing Radiometer P/N 10503–Model 100 (Demetrom Researchb Corp., USA), ao início de cada grupo.

Figura 4.3 – Confeção do bloco de resina sobre a superfície dentinária

4.4.2 Preparo dos grupos com aplicação de digluconato de clorexidina 2% (G3 e G4)

Após a secagem da superfície dentinária com papel absorvente, a mesma foi limpa com um aplicador embebido na solução de digluconato de clorexidina 2% (Ao Farmacêutico, Brasil), friccionando-se a região por 20 segundos, lavagem com um jato de água e secagem com um breve jato de ar comprimido, por 2-4s, à distância de 15cm, mantendo-se a dentina umedecida. Logo após, foi realizada a aplicação dos adesivos e confecção do bloco de resina conforme descrito para os grupos G1 e G2.

4.4.3 Preparo dos grupos com contaminação da dentina (G5 e G6)

4.4.3.1 Preparação e padronização dos inóculos bacterianos

Foi utilizada cepa padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), conservada à temperatura de -20°C em Tryptic Soy Broth (TSB) acrescido de 40% de glicerol.

Uma alíquota de 50µl da cepa de *S. mutans* foi transferida para 5ml de TSB, incubada durante 24 horas, a 37°C em microaerofilia.

A padronização do número de bactérias por mililitro de meio foi realizada por meio da medida de densidade óptica, utilizando comprimento de onda de 600nm em espectrofotômetro. A absorbância adotada foi de 0,65, correspondendo à concentração de $3,3 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia de *S. mutans*/ml, determinada pela contagem de ufc de *S. mutans* em placa de Tryptic Soy Agar (TSA).

4.4.3.2 Contaminação das amostras

Cada dente foi colocado em tubos de ensaios individuais contendo 10ml da suspensão bacteriana padronizada (Figura 4.4). Os tubos foram encubados a 37°C em microaerofilia durante 72 horas para estabelecer dentina contaminada (ÖZER et

al., 2003). Após a incubação os dentes foram retirados dos tubos e secos com papel absorvente estéril e um breve jato de ar.

Figura 4.4 – Contaminação dos dentes em tubos de ensaio individualizados contendo a suspensão bacteriana padronizada

4.4.3.3 Confeção dos corpos de prova

A aplicação dos sistemas adesivos e confecção dos corpos de prova em resina composta, foram realizadas de acordo com os grupos G1 e G2.

4.4.4 Preparo dos grupos com contaminação da dentina e limpeza com digluconato de clorexidina 2% (G7 e G8)

A contaminação da dentina nesses grupos foi realizada conforme descrito para os grupos G5 e G6, porém após esse procedimento, foi realizada a limpeza da

superfície dentinária com um aplicador embebido na solução de digluconato de clorexidina 2%, friccionando-se a região por 20 segundos. Foi feita a lavagem com jato de água e secagem com leve jato de ar comprimido durante 2-4s, à distância de 15cm, mantendo-se a dentina umedecida. A aplicação dos sistemas adesivos e confecção dos corpos de prova em resina composta seguiram as mesmas etapas que nos grupos G1 e G2.

4.5 Teste de Microtração

Após 24 horas de armazenamento em água destilada, os dentes foram embutidos em tubos de PVC (Tigre) com resina acrílica quimicamente ativada (JET Clássico), na proporção 1:1, cuidando para que o limite amelodentinário ficasse 3mm acima da resina de embutimento. Cada bloco dente/adesivo/resina foi seccionado sob refrigeração constante com um disco de corte diamantado acoplado à máquina de corte Labcut 1010 (Extec) em planos paralelos, seguindo o longo eixo do dente. Posteriormente, cortes seqüenciais, perpendiculares aos primeiros foram feitos, obtendo-se corpos de prova em forma de palito, com área de secção transversal de aproximadamente $0,8 \text{ mm}^2$. Para que o seccionamento dos corpos de prova fosse feito, os tubos de PVC com os dentes foram fixados a um dispositivo em L adaptado ao suporte da máquina de corte Labcut 1010, de maneira que o dente ficasse paralelo ao disco de corte (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Corte dos dentes para obtenção dos corpos de prova em forma de palitos

Cada corpo de prova foi observado em lupa estereoscópica com 25X de aumento para verificar se a interface adesiva estava perpendicular ao longo eixo do corpo de prova, já que essa é condição necessária para que apenas forças de tração sejam aplicadas, evitando componentes de torção indesejáveis. Todos os corpos de prova que apresentaram interface adesiva inclinada em relação ao longo eixo do corpo de prova foram descartados. Dos corpos de prova considerados viáveis, 5 de cada variável experimental foram aleatoriamente selecionados para análise microscópica da região adesiva em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os demais tiveram a resistência de união testada através do teste de microtração.

Previamente ao ensaio de microtração, cada corpo de prova teve sua largura e espessura medidas com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Paquímetro Eletrônico Digital – Mitutoyo, Brasil). As extremidades dos corpos de prova foram coladas com cola gel de cianoacrilato (Henkel Loctite) no dispositivo de microtração Jig de Geraldeli de forma a posicionar a área adesiva perpendicularmente ao longo eixo da força de tração (PERDIGÃO et al., 2002) (Figura 4.6). O conjunto foi fixado em máquina de ensaios universal Mini Instron

modelo 4442 (Instron Corporation) e tracionado a uma velocidade de 0,5 mm/min, até que ocorresse a fratura. Nesse momento, o valor da carga de ruptura em Newtons (N) foi registrado e o corpo de prova observado em lupa estereoscópica com 25X de aumento, para verificar o tipo de fratura, classificada como fratura na interface, coesiva em dentina ou coesiva em resina. Apenas os espécimes que apresentaram fratura adesiva foram usados no cálculo da resistência de união (CARRILHO et al., 2002). Para tal, a carga de ruptura de cada corpo de prova foi dividida por sua área de união. Os resultados obtidos foram convertidos para Mega Pascal (MPa).

Figura 4.6 – Corpos de prova obtidos no corte do dente (A) e colados no jig de Geraldeli (B)

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os corpos de prova selecionados para MEV foram parcialmente descalcificados em solução de ácido fosfórico a 36% por 10 segundos, desproteinizados com solução de hipoclorito de sódio a 2% por 60 segundos e lavados em água corrente. Em seguida, estes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol: 30% (20 min.), 50% (20 min.), 70% (20 min.), 95% (20 min.) e 100% (1 hora). Logo após, as amostras foram imersas em hexametildisilazano

(HMDS), por 10 minutos, e deixadas secar no interior de uma capela com sistema exaustor, por 2 horas.

Na etapa seguinte, os corpos de prova foram fixados em suportes de alumínio (Sigma Chemical CO, EUA) com uma cola de cianoacrilato (Super Bond Gel, Loctite) e metalizados com uma camada de 20 nanômetros de ouro-paládio (Metalizadora BALTEC MED 020, Liechtenstein). Toda a extensão da zona de união entre a dentina e a resina foi analisada no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, Japão). As eletromicrografias foram obtidas para análise descritiva da região nos aumentos de 1.500x e 3.000x.

Além da análise da interface de união, foi observada em microscopia eletrônica de varredura a superfície dentinária de 6 amostras após os seguintes tratamentos: controle (dentina lixada e esterilizada); condicionamento (dentina condicionada com ácido fosfórico 37% por 15s e lavagem), limpeza (dentina limpa com digluconato de clorexidina 2% por 20s e lavagem); contaminação (dentina contaminada por *Streptococcus mutans*); contaminação e condicionamento (dentina contaminada por *Streptococcus mutans* e condicionada com ácido fosfórico 37%) e contaminação e limpeza (dentina contaminada por *Streptococcus mutans* e limpa com digluconato de clorexidina 2%). A preparação desses substratos seguiu a metodologia descrita para os grupos do ensaio de microtração.

Após o preparo desses dentes, as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2% durante 2 horas. A seguir, as amostras foram lavadas em tampão fosfato, três banhos de 5 minutos cada. Foi realizada a desidratação em concentrações crescentes de etanol. Logo após, as amostras foram imersas em hexametildisilazano (HMDS), por 20 minutos, e deixadas secar no interior de uma capela com sistema exaustor, por 2 horas. Foram então coladas em suportes de

alumínio, metalizadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura nos aumentos de 1500X e 3000X.

Figura 4.7 – Amostras coladas em suportes metálicos e cobertas com ouro: palitos (A) e superfícies dentinárias (B)

4.7 Análise Estatística

Cada dente foi considerado como uma unidade amostral e, assim, todos os corpos de prova de um mesmo dente deram origem a um único valor. As diferenças na resistência de união entre os grupos foram analisadas estatisticamente por meio de Análise de Variância e teste de Tukey com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo estão apresentados em duas etapas: resistência de união, pelo ensaio de microtração e análise das imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

5.1 Teste de Microtração

Os dados obtidos no estudo corresponderam a 80 valores de resistência de união, pelo ensaio de microtração. Esses valores foram decorrentes da média dos valores de resistência de união dos palitos obtidos em cada dente, sendo avaliados dois sistemas adesivos e quatro tratamentos do substrato dentinário, com 10 repetições para cada grupo (Apêndice A).

Os valores apresentaram uma distribuição normal de acordo com o teste de aderência à curva normal pelo cálculo do Qui-quadrado ($\chi^2=4,73$) e homogênea, cujo teste de homogeneidade de Cochran apresentou um valor calculado de 0,2478 (valor crítico de 0,3373). Definida a possibilidade de aplicação de estatísticas paramétricas foi eleito o teste de Análise de Variância. O nível de significância adotado foi de 5% ($p<0,05\%$). Como teste estatístico complementar foi utilizado o teste Tukey para comparação das médias, detectando as diferenças entre os grupos.

Na comparação entre os oito grupos correspondentes aos diferentes tipos de sistemas adesivos testados e tratamento dos substratos dentinários obteve-se uma diferença estatisticamente significativa, o que pode ser observado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Análise de variância para os valores da resistência de união pelo ensaio de microtração

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrados Médios	(F)	Probabilidade (H0)
Grupos	2638,1563	7	376,8795	14,68	0,000%
Resíduo	1848,4844	72	25,6734	-----	-----
Variação total	4486,6406	79	-----	-----	-----

Para comparar as médias entre os oito grupos foi calculado o valor do Tukey ($T=7,08854$). Com estas comparações pode-se notar que em relação aos sistemas adesivos, os grupos do adesivo Clearfil SE Bond obtiveram valores de resistência de união significativamente maiores do que os grupos do adesivo Single Bond 2 exceto para a situação de limpeza da superfície com clorexidina, que o comportamento desses adesivos foi semelhante estatisticamente. Considerando o tratamento da superfície do substrato dentinário, os espécimes apenas contaminados apresentaram valores significativamente menores que os outros grupos, com os dois adesivos utilizados.

Os valores médios e as diferenças estatísticas estão representados na Tabela 5.2 e ilustrados no Gráfico 5.1. Semelhanças estatísticas estão indicadas pela mesma letra.

Tabela 5.2 – Médias e diferenças estatísticas entre os grupos experimentais

Tratamento de superfície	Sistemas Adesivos	
	Clearfil SE Bond	Single Bond 2
Controle	42,88 ± 2,31 ^a	31,52 ± 6,24 ^{b,e}
Clorexidina	40,14 ± 2,91 ^{a,f}	34,41 ± 6,92 ^{b,c,e,f}
Contaminado	33,15 ± 3,35 ^c	23,61 ± 7,13 ^d
Descontaminado	39,09 ± 3,86 ^{a,b}	31,12 ± 5,31 ^{c,e}

Gráfico 5.1 – Valores médios da resistência de união dos sistemas adesivos em função do tratamento do substrato dentinário

Pela análise do Gráfico 5.1, observa-se o maiores valores médios encontrado para o sistema adesivo Clearfil SE Bond em comparação ao Single Bond 2, com o qual não foi obtida diferença estatística apenas na situação de limpeza do substrato com clorexidina. Também se pode observar pela inclinação das retas que o comportamento dos sistemas adesivos foi semelhante entre os quatro tipos de tratamentos do substrato dentinário, independente do adesivo dentinário testado.

5.1.1 Análise do padrão de fratura

Na Tabela 5.3 está apresentado o número de espécimes utilizados para cada grupo experimental e o número de espécimes perdidos (inutilizados). Além disso, estão apresentados separadamente os espécimes que, de acordo com a avaliação realizada em microscopia óptica apresentaram fraturas coesivas em resina (FCR), fraturas coesivas em dentina (FCD) e ainda os que apresentaram fraturas envolvendo a interface, localizadas na camada híbrida ou em mais de um substrato (mistas) (FI).

Tabela 5.3 – Número de espécimes utilizados, perdidos e o total em cada grupo

Grupo	FI	FCD	FCR	Espécimes inutilizados	Total de palitos
Controle SE	129	16	0	3	145
Controle SB	117	3	0	5	120
Clorexidina SE	125	4	0	1	129
Clorexidina SB	111	3	0	4	114
Contaminado SE	95	0	0	9	95
Contaminado SB	113	0	0	5	113
Descontaminado SE	103	0	0	4	103
Descontaminado SB	124	1	0	6	125
TOTAIS	917	27	0	37	944

FCR – fraturas coesivas em resina

FCD – fraturas coesivas em dentina

FI – fraturas envolvendo a interface (camada híbrida e mistas)

SE – Clearfil SE Bond

SB – Single Bond 2

Observa-se na Tabela 5.3 que a distribuição do padrão de fratura foi semelhante para todos os grupos, não ocorrendo fratura coesiva em resina em

nenhum dos casos e havendo uma maior tendência de ocorrência de fraturas adesivas para os grupos contaminados.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura

5.2.1 Micromorfologia da interface sistema adesivo/dentina

As eletromicrografias foram obtidas a partir da análise qualitativa da interface de união adesiva sistema adesivo/dentina de 40 amostras, sendo 5 para um dos oito grupos.

A análise descritiva da interface de união demonstrou a formação de camada híbrida e “tags” resinosos no interior dos túbulos dentinários quando do uso do sistema adesivo Single Bond 2, bem como do sistema adesivo Clearfil SE Bond (Figuras 5.1 a 5.8). Esse aspecto foi evidenciado em todos os substratos, independente do tipo de tratamento superficial empregado, não sendo observadas diferenças entre eles.

A espessura da camada híbrida não foi uniforme em toda a extensão da zona de união, independente do sistema adesivo e tratamento superficial empregados.

Figura 5.1 – Formação da camada híbrida e *tags* com uso do sistema adesivo Single Bond 2 (G1)

Figura 5.2 – Formação da camada híbrida e *tags* com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond (G2)

Figura 5.3 – Formação da camada híbrida e *tags* com uso do sistema adesivo Single Bond 2 em dentina tratada com digluconato de clorexidina 2% (G3)

Figura 5.4 – Formação da camada híbrida e *tags* com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond em dentina tratada com digluconato de clorexidina 2% (G4)

Figura 5.5 – Formação da camada híbrida e *tags* com uso do sistema adesivo Single Bond 2 em dentina contaminada com *Streptococcus mutans* (G5)

Figura 5.6 – Formação da camada híbrida e *tags* com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond em dentina contaminada com *Streptococcus mutans* (G6)

Figura 5.7 – Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Single Bond 2 em dentina contaminada com *Streptococcus mutans* e tratada com digluconato de clorexidina 2% (G7)

Figura 5.8 – Formação da camada híbrida e tags com uso do sistema adesivo Clearfil SE Bond em dentina contaminada com *Streptococcus mutans* e tratada com digluconato de clorexidina 2% (G8)

5.2.2 Superfícies dentinárias

As figuras foram obtidas a partir da análise da superfície dentinária de 6 amostras após os seguintes tratamentos: controle, condicionamento, limpeza, contaminação, contaminação e condicionamento, e contaminação e limpeza.

Na amostra do grupo controle foi possível observar toda a superfície dentinária coberta pela camada de esfregaço, não sendo possível a visualização dos túbulos dentinários (Figura 5.9). Na amostra submetida ao condicionamento ácido, foi evidenciada a remoção da camada de esfregaço com total desobliteração das entradas dos túbulos (Figura 5.10). A superfície tratada com digluconato de clorexidina 2% apresentou remoção de parte da camada de esfregaço, mantendo as entradas dos túbulos ocluídas (Figura 5.11).

Nas superfícies que foram contaminadas com *Streptococcus mutans*, foi observada a presença de aglomerados bacterianos na amostra que não recebeu nenhum tratamento descontaminante (Figuras 5.12 a 5.14). Para a superfície posteriormente condicionada, houve remoção da camada de esfregaço desobstruindo a entrada dos túbulos dentinários e redução no número de bactéria (Figuras 5.15). A superfície descontaminada com digluconato clorexidina 2% apresentou aspecto semelhante à superfície estéril, limpa com a mesma substância, não apresentando remanescentes bacterianos (Figura 5.16).

Figura 5.9 – Superfície dentinária após lixamento e esterilização em radiação gama (Grupo controle). Camada de esfregaço obliterando a entrada dos túbulos

Figura 5.10 – Superfície dentinária após condicionamento com ácido fosfórico 37% durante 15 segundos. Observar a exposição da entrada dos túbulos dentinários

Figura 5.11 – Superfície dentinária após limpeza com digluconato de clorexidina 2%. Remoção parcial da camada de esfregaço. Tampões obliterando a entrada dos túbulos (setas)

Figura 5.12 – Superfície dentinária após contaminação por *Streptococcus mutans*. Aglomerados bacterianos em toda superfície

Figura 5.13 – Superfície dentinária após contaminação por *Streptococcus mutans*. Aglomerados bacterianos em toda superfície

Figura 5.14 – Superfície dentinária após contaminação por *Streptococcus mutans*. Entrada dos túbulos dentinários (setas)

Figura 5.15 – Superfície dentinária após contaminação por *Streptococcus mutans* e condicionamento com ácido fosfórico. Remanescentes bacterianos na entrada dos túbulos dentinários (setas)

Figura 5.16 – Superfície dentinária após contaminação por *Streptococcus mutans* e limpeza com digluconato de clorexidina 2%. Ausência de contaminação bacteriana

7 DISCUSSÃO

O sucesso clínico de uma restauração baseia-se, sobretudo, no selamento que o material restaurador proporciona às margens do preparo cavitário. No caso de restaurações em que se utiliza associação de resinas compostas e sistemas adesivos, o bom selamento está relacionado à capacidade que o material apresenta em resistir aos esforços mecânicos imediatos, decorrentes da contração de polimerização da resina restauradora, ou tardios devido às ações fisiopatológicas do aparelho estomatognático.

Dessa forma, pesquisar o comportamento físico-mecânico das interfaces estabelecidas pelos sistemas adesivos e o substrato dentário constitui-se recurso importante para a elaboração de prognóstico restaurador, sobretudo quando se considera o número extenso de materiais disponíveis, bem como a velocidade com que são lançados e retirados do mercado, muitas vezes não havendo tempo para que sua performance seja criteriosamente avaliada.

São os ensaios de resistência de união, os meios laboratoriais mais comumente empregados para esta finalidade (RETIEF, 1991), na maioria das vezes utilizando os testes de tração e de cisalhamento. Por apresentar resultados mais refinados, os testes de microcisalhamento e microtração têm sido atualmente mais empregados como instrumentos metodológicos para avaliação da eficácia de um sistema restaurador (DE MUNCK et al., 2005; PASHLEY et al., 1999).

Neste estudo, foram realizados testes de microtração proposto por SANO et al., 1994, que propõe a utilização de áreas adesivas de 0,8-1mm². A redução da área adesiva para valores menores possibilita, por exemplo, melhorar a distribuição das

tensões na interface e diminuir a ocorrência de defeitos na interface resina-dente. A utilização desse método favorece a obtenção de falhas quase que exclusivamente adesivas, permitindo desta forma, análise mais fiel da resistência de união entre o material e a estrutura dentária (PASHLEY et al., 1995; PHRUKKANO; BURROW; TYAS, 1998; SCHREINER et al., 1998). Além disso, essa metodologia permite avaliar a resistência à fratura em áreas restritas, permite o cálculo de valores em um único dente, permite testes de união em superfícies irregulares e facilita avaliação ao microscópio eletrônico de varredura (PASHLEY et al., 1995).

Foram escolhidos para esse estudo sistemas adesivos com diferentes mecanismos de ação. O sistema adesivo Single Bond 2 é classificado como convencional, tendo a fase de condicionamento ácido em passo separado previamente à aplicação de uma combinação de *primer* hidrófilo com resinas adesivas hidrófobas (NAKABAYASHI; KOJUMA; MASUHARA, 1982; VAN MEERBEEK et al., 1998; VARGAS; COBB; DENEHY, 1997), sendo, portanto a técnica de aplicação conduzida em dois passos. Como representante dos sistemas adesivos autocondicionantes foi utilizado o sistema adesivo Clearfil SE Bond, que compreende a aplicação de um *primer* ácido e uma resina adesiva hidrófoba (dois passos também) (TAY et al., 2002; VAN MEERBEEK et al., 2003). Ambos desenvolvem uma adesão à dentina formada às custas de retenções micromecânicas (camada híbrida), embora existam diferenças ultra-estruturais entre eles. Os diferentes tipos de camada híbrida não são, por si só, os responsáveis pelos valores de resistência de união; no entanto, a variação da técnica empregada para a sua formação permite um resultado mais ou menos favorável sob o ponto de vista de uniformidade de adesão.

Para sistemas adesivos que possuem a técnica de condicionamento ácido prévio, essa etapa faz com que haja a dissolução da camada de esfregaço e a desmineralização dos cristais de apatita, expondo uma rede de colágeno, que permite a infiltração do agente adesivo, formando a camada híbrida (NAKABAYASHI; KOJUMA; MASUHARA, 1982; PASHLEY; CARVALHO, 1997). Nessa fase é muito importante a manutenção da umidade da dentina, pois a água é responsável pela sustentação das fibras colágenas em condição expandida e mantém a permeabilidade intradentinária necessária para a difusão da resina adesiva (PASHLEY; CARVALHO, 1997). A permeabilidade aos monômeros na rede dentinária intertubular desmineralizada é variável crítica no processo de adesão à dentina. Desta forma, a água deve preencher o espaço ocupado anteriormente pela porção mineral até o momento da sua substituição pelo monômero resinoso (GWINNETT; KANCA, 1992; KANCA III, 1992). Tão logo que a estrutura mineral que circundava a rede de colágeno seja substituída pelos monômeros resinosos presentes no primer e no adesivo, uma camada híbrida de resina e dentina é formada (NAKABAYASHI; KOJUMA; MASUHARA, 1982; PASHLEY; CARVALHO, 1997).

A camada híbrida em sistemas adesivos autocondicionantes como o Clearfil SE Bond é obtida a partir do uso de um primer composto por monômeros ácidos, que dissolvem a fase mineral da camada de esfregaço e permitem que o adesivo penetre até o tecido dentinário subjacente (CHIGIRA et al., 1994; WATANABE; NAKABAYASHI; PASHLEY, 1994). Sendo o primer autocondicionante aplicado diretamente sobre a camada de esfregaço, elimina-se a necessidade de controle inicial da umidade de superfície. Acredita-se que os sistemas adesivos autocondicionantes desmineralizam a dentina e infiltram seus monômeros

simultaneamente, evitando o colapso das fibrilas de colágeno pela secagem com ar e também, a ocorrência de fibrilas desprotegidas pela resina aplicada (CARVALHO et al., 2005; REIS et al., 2007; TAY; PASHLEY, 2001). Essa característica faz com que sejam produtos com menor sensibilidade à técnica, além de diminuir o tempo de aplicação clínica e reduzir o risco de incorporação de erros durante a manipulação. Pode-se esperar maior uniformidade nos resultados de adesão, uma vez que as variações morfológicas regionais da dentina estariam encobertas pela camada de esfregaço (TAY et al., 2002; VAN MEERBEEK et al., 2003; YOSHIDA et al., 2004). Esse fenômeno corrobora com nossos resultados, uma vez que tivemos maior variabilidade nos valores de resistência adesiva dos espécimes obtidos com o sistema adesivo Single Bond 2 (desvios padrão variando entre 5,31 e 7,13), do que com aqueles obtidos com o Clearfil SE Bond (desvios padrão entre 2,31 e 3,86), independente do tratamento superficial que a dentina foi submetida (Tabela 5.2).

No presente trabalho, os valores de resistência de união obtidos para ambos materiais estão em concordância com os resultados da literatura consultada, quando utilizada a mesma metodologia. Para o adesivo com condicionamento ácido prévio, os valores estão próximos de 35MPa e para o adesivo autocondicionante de 40MPa (CARDOSO; BRAGA; CARRILHO, 1998; DE MUNCK et al., 2003; INOUE et al., 2003; VAN MEERBEEK et al., 2003). Embora esse trabalho tenha revelado diferença estatisticamente significativa entre os valores de resistência adesiva dos dois sistemas adesivos utilizados, exceto pela situação de limpeza do substrato com digluconato de clorexidina 2% (Tabela 5.2), os trabalhos de Inoue et al. (2003), De Munck et al. (2003) e Van Meerbeek et al. (2003) mostram apenas uma tendência de que a adesão imediata dos sistemas adesivos autocondicionantes de dois passos seja superior a dos sistemas adesivos com condicionamento ácido com passo

separado, também de dois passos, sem que seja detectada diferença estatisticamente significativa.

Como pode ser observado, a formação da camada híbrida é um fenômeno complexo que envolve fatores intrínsecos do substrato como: a quantidade, diâmetro e disposição espacial dos túbulos dentinários, quantidade de dentina intertubular, formação de dentina reacionária, permeabilidade e umidade da dentina, que estão na dependência de sua proximidade com a polpa (MARSHALL, 1993; MJÖR; FEJERSKOV, 1990; PASHLEY, 1989). Fatores externos como a secagem excessiva do substrato ou a presença demasiada de água no momento da aplicação do sistema adesivo também podem comprometer a qualidade da camada híbrida (KANCA III, 1992). A contaminação do substrato é outro fator que pode influenciar na força de resistência de união de sistemas adesivos. Trabalhos em que o substrato dentinário foi contaminado com saliva (PARK; LEE, 2004) ou sangue (VAN SCHALKWYK et al., 2003), mostram um decréscimo nos valores de adesão da resina ao dente. Outro tipo de contaminação que pode ocorrer nas paredes de um preparo cavitário é a presença de bactérias oriundas da cavidade bucal, principalmente aquelas que estão ligadas ao processo da doença cárie.

Tratamentos restauradores atuais visam o mínimo de intervenção, com a preservação da maior extensão possível de estrutura dental intacta (ANUSAVICE, 1998; TYAS et al., 2000). Nesse conceito, a camada mais superficial da lesão de cárie (a camada infectada) é removida, e com ela grande parte dos microrganismos presentes na cavidade também é eliminada. Entretanto, quando a dentina cariada é removida com brocas, aproximadamente 45.000 túbulos dentinários por milímetro quadrado podem estar sendo expostos, dificultando a erradicação total de microrganismos (GARBEROGLIO; BRÄNSTROM, 1976). Sendo assim, na

realização de preparos cavitários, remanescentes bacterianos permanecem na dentina afetada, portanto, sob a futura restauração (FRENCKEN; HOLMGREN, 2001).

Estudos *in vitro* demonstraram que após o preparo cavitário, bactérias podem ser encontradas nas paredes da cavidade, na lama dentinária, e na junção amelo-dentinária (FRIEDMAN, 1979; QVIST; QVIST, 1977). Experimentos histológicos e bacteriológicos executados para determinar a quantidade de microrganismos viáveis em superfície de dentina ao final de preparos cavitários mostraram que somente uma pequena fração de dentes está estéril após o preparo (CRONE, 1968; FRIEDMAN, 1979; KIDD, JOYSTON-BECHAL; BEIGHTON, 1993; SHOVELTON, 1968). Besic (1943) e Leung, Loesche e Charbeneu (1980) salientam que os remanescentes bacterianos deixados sob as restaurações podem vir a sobreviver por até um ano ou duplicarem de quantidade em um mês. É afirmado por Bergenholtz et al. (1982), Grieve et al. (1991) e Qvist e Qvist (1977) que a presença de bactérias persistentes em preparos cavitários e aquelas que infiltram pela interface entre o material e as paredes da cavidade podem induzir cáries recorrentes, danos pulpares e hipersensibilidade.

A seguir são citados alguns trabalhos científicos relativos à microbiota das lesões de cárie, o que evidencia a diversidade de microrganismos que habitam este sítio: Crone (1968) relatou predomínio de bactérias bastonetes e cocos Gram-positivos. Hoshino (1992) encontrou maior quantidade de anaeróbios facultativos como: *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Arachnia*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Actinomyces*. Friedman (1979) e Marchant et al. (2001) observaram maior proporção de *Streptococcus mutans* nas lesões de cárie dentinária. Kidd, Joyston-Bechal e Beighton (1993) detectaram a presença de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*

nas amostras coletadas. Os autores referem ainda que a determinação da diversidade de tipos de bactérias residentes nas lesões de cárie dentinárias está na dependência de vários fatores: substrato (dentina decídua ou permanente), profundidade da lesão, pH do meio, alimentação do indivíduo e até mesmo a metodologia utilizada para qualificação e quantificação das bactérias.

Após estas observações, para este estudo, foi tomado o cuidado de escolher uma cepa padrão de *Streptococcus mutans*, por esse microorganismo ser muito importante no processo de lesão de cárie e estar presente nas paredes das cavidades mesmo após o preparo (CRONE, 1968; FRIEDMAN, 1979; KIDD, JOYSTON-BECHAL; BEIGHTON, 1993; MARCHANT et al., 2001). Sendo uma cepa identificada, garante que todos os grupos experimentais tenham a contaminação de forma padronizada.

Suzuki et al. (1998) e Okuda et al. (2002) provaram a existência de correlação negativa entre os testes de microinfiltração e tração, isto é, quanto maior o nível de microinfiltração menor a força de união. Assim, podemos correlacionar a pesquisa de Guirado et al. (2006) que observaram em estudo laboratorial o aumento da microinfiltração nas margens de restaurações adesivas quando o substrato foi previamente contaminado com *Streptococcus mutans*, com os nossos resultados onde foi possível detectar a queda de valores de adesão, independente do sistema adesivo utilizado, grupos 5 e 6 (Tabela 5.2) quando o substrato estava contaminado por *Streptococcus mutans*.

As imagens do substrato dentinário contaminado, obtidas em microscopia eletrônica de varredura, mostram a presença de *Streptococcus mutans* em grande parte da superfície dentinária (Figuras 5.12, 5.13 e 5.14). Mesmo após o condicionamento com ácido fosfórico a 37% usado na técnica do adesivo Single

Bond 2 (Figura 5.15), ainda são encontrados remanescentes bacterianos na superfície dentinária e entrada dos túbulos. Pode-se sugerir que a presença física dessas bactérias compromete o condicionamento da dentina subjacente pelos monômeros ácidos presentes no primer autocondicionante do sistema adesivo Clearfil SE Bond, conseqüentemente a difusão da resina adesiva. Além disso, a presença bacteriana na interface adesiva pode funcionar como regiões de defeitos concentrando pontos de fragilidade, e quando são aplicadas tensões esses locais tendem a se fraturar com mais facilidade.

A esterilização da cavidade após o preparo cavitário é preocupação secular de pesquisadores como Miller (1891), que realizou testes com diferentes anti-sépticos para serem utilizados com este objetivo. Dadas as limitações da época, estes testes foram efetuados com tendência ao empirismo. Com a evolução tecnológica, o desenvolvimento e conhecimento da biologia do dente, da microbiologia e do mecanismo de ação dos anti-sépticos, a procura de soluções mais eficazes e compatíveis aos tecidos dentários passou a ser realizada com caráter mais científico (RODE; FERREIRA SANTOS, 1990).

O relato da formação de uma camada de esfregaço durante o preparo cavitário (EICK et al., 1970) levou a um novo enfoque sobre a limpeza cavitária. Segundo Pashley (1984), a camada de esfregaço é um depósito de microrganismos e de seus produtos, podendo interferir negativamente na adesão do material restaurador e deve ser removida. Entretanto, a parte mais profunda da camada de esfregaço funciona como uma barreira mecânica, formando tampões, que impedem a saída de líquidos e uma possível invasão microbiana nos túbulos dentinários (GWINNETT, 1984).

Uma solução ideal para limpeza e desinfecção da dentina de um preparo cavitário deveria possuir alguns quesitos, tais como: ser bactericida ou pelo menos bacteriostática, remover os resíduos da camada de esfregaço, manter os tampões, ser biocompatível, de fácil aquisição e utilização. O digluconato de clorexidina é um agente antimicrobiano com excelentes características para ser utilizado para este fim. Sua eficiência na redução dos níveis bucais de *Streptococcus mutas* e *Lactobacillus* tem sido comprovada em diversos trabalhos (BASCONES; MANSO, 1995; BONDESTAM et al., 1996; CLARCK et al., 1991; EPSTEIN et al., 1991; SANT'ANNA et al., 2001; VAN RIJKOM; TRUIN; VAN'T HOF, 1996). Também tem se mostrado eficiente no auxílio ao tratamento das patologias periodontais (FARDAL; TURNBULL, 1986; KELTJENS et al., 1991; OOSTERWAAL et al., 1989). E quando usado como desinfetante, tem se mostrado efetivo na redução dos níveis de *Streptococcus mutans* alojados em superfícies radiculares com lesões de cárie (FURE; EMILSON, 1990).

As imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura do substrato dentinário contaminado com *Streptococcus mutans* e posteriormente descontaminado com digluconato de clorexidina 2% (G7 e G8), mostraram que a substância foi eficaz na eliminação dos microrganismos presentes na superfície dentinária (Figura 5.16). Fato que provavelmente explique porque os valores de resistência de união obtidos nos grupos descontaminados ($SB = 31,12 \pm 5,31$ e $SE = 39,09 \pm 3,86$) foram estatisticamente semelhantes aos valores do grupo em que o substrato utilizado encontrava-se estéril ($SB = 31,52 \pm 6,24$ e $SE = 42,88 \pm 2,31$), independente do sistema adesivo utilizado.

Na literatura há consenso na literatura quanto à eficácia da clorexidina como agente antimicrobiano (BONDESTAM et al., 1996; CLARCK et al., 1991; EPSTEIN et

al., 1991; FURE; EMILSON, 1990; KELTJENS et al., 1991; OOSTERWAAL et al., 1989; SANT'ANNA et al., 2001), no entanto, quando se trata da ingerência dessa substância nas propriedades adesivas de materiais resinosos à dentina o assunto se torna controvertido (BRACKETT et al., 2007; CAO et al., 1995; CARRILHO et al., 2007; EL-HOUSSEINY; JAMJOUR, 2000; FILLER, 1994; GÜRGAN; BOLAY; KIREMITCI, 1999; MEIERS; KRESIN, 1996; MEIERS; SHOOK, 1996; PERDIGÃO; DENEHY, SWIFT, 1994; RABELLO; COELHO, 1998; SAY et al., 2004; TULUNOGLU et al., 1998).

Através de estudos com testes de cisalhamento Cao et al. (1995), Gürgan, Bolay e Kiremitci (1999) e Meiers e Shook (1996) demonstraram que a aplicação do digluconato de clorexidina influenciou negativamente na resistência adesiva à dentina. No entanto, outros estudos com a mesma metodologia (EL-HOUSSEINY; JAMJOUR, 2000; FILLER, 1994; PERDIGÃO, DENEHY; SWIFT, 1994; RABELLO; COELHO, 1998; SAY et al., 2004) concluíram que a solução não interfere na resistência do adesivo à dentina. Bocangel et al. (2000) e Say (2004), utilizando os ensaios de tração demonstraram que a utilização da clorexidina a 2% também não alterou a adesão à dentina. Os valores encontrados com o teste de microtração em nossa pesquisa demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados somente com digluconato de clorexidina 2% ($G3 = 34,41 \pm 6,92$ e $G4 = 40,14 \pm 2,91$) e os grupos não tratados ($G1 = 31,52 \pm 6,24$ e $G2 = 42,88 \pm 2,31$). Estando, portanto de acordo com os estudos de De Castro et al. (2003), Carrilho et al. (2007) e Brackett et al. (2007), que não encontraram alterações na resistência adesiva, mesmo quando o agente desinfetante foi utilizado após o condicionamento da dentina.

Além disso, os trabalhos presentes na literatura divergem quanto ao momento em que se deve realizar a limpeza da cavidade. Assim como Bocangel et al. (2000), de Castro et al. (2003), Meiers e Kresin (1996), Meiers e Shook (1996) e Rabello e Coelho (1998), neste estudo optou-se pela limpeza cavitária ativa, prévia ao condicionamento ácido e aplicação do sistema adesivo, baseando-se na necessidade clínica de reduzir o número de microrganismos presentes na camada de esfregaço, assim como da necessidade de diminuir a infiltração microbiana nos túbulos dentinários, após o condicionamento com ácido fosfórico. Esse fenômeno foi observado em microscopia eletrônica de varredura, onde o digluconato de clorexidina 2% foi capaz de remover superficialmente a camada de esfregaço dentinário e eliminar os remanescentes bacterianos (Figuras 5.11 e 5.16), mantendo a entrada dos túbulos obliterada.

Sabendo que, mesmo após o preparo cavitário, bactérias são encontradas nas paredes da cavidade (FRIEDMAN, 1979; QVIST; QVIST, 1977) e que a presença desses microrganismos, além de ocasionar danos pulpares e cáries recorrentes (GRIEVE et al., 1991), prejudica a adesão de materiais resinosos ao substrato dentinário, a limpeza cavitária realizada antes de procedimentos adesivos parece ser uma etapa importante quando se deseja uma restauração de qualidade. O digluconato de clorexidina 2% é uma substância com excelentes características antimicrobianas (CLARCK et al., 1991), com baixa toxicidade ao tecidos bucais (BASCONES; MANSO, 1995), que não interfere nas propriedades de adesão de materiais resinosos e, quando utilizado por 20 segundos no substrato dentinário, é clinicamente de fácil manipulação e eficiente na remoção da parte superficial da camada de esfregaço, inclusive na eliminação dos microrganismos, sendo, portanto uma substância promissora quando utilizado como desinfetante cavitário.

7 CONCLUSÕES

A metodologia e os resultados apresentados permitem-nos concluir que:

7.1 A contaminação *in vitro* por *Streptococcus mutans* interferiu negativamente na adesão dos dois sistemas adesivos (sistema adesivo com condicionamento ácido prévio e sistema adesivo autocondicionante) à dentina de molares humanos.

7.2 A solução de digluconato de clorexidina 2% foi capaz de eliminar a contaminação *in vitro* por *Streptococcus mutans* em dentina de molares humanos e restabelecer os valores de resistência de união obtidos com esse substrato estéril.

7.3 A solução de digluconato de clorexidina 2% não interferiu na adesão dos sistemas adesivos utilizados à dentina de molares humanos, quando utilizado o substrato estéril.

7.4 O sistema adesivo autocondicionante apresentou melhores resultados de resistência de união que o sistema adesivo com condicionamento ácido prévio, independente do tratamento superficial dado ao substrato dentina.

REFERÊNCIAS¹

Anusavice KJ. Buonocore memorial lecture. Materials of the future: preservative or restorative. Oper Dent 1998;23(4):162-7.

Bascones A, Manso FJ. Aspectos clínicos del uso de clorhexidina. Av Odontoestomtol 1995;11(B):145-58.

Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed AS. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. J Oral Pathol 1982;11(6):439-50.

Besic FC. The fate of bacteria sealed in dental cavities. J Dent Res 1943;22(5):349-54.

Bocangel JS, Kraul AOE, Vargas AG, Demarco FF, Matson E. Influence of disinfectant solutions on the tensile bond strength of a fourth generation dentin bonding agent. Pesq Odontol Bras 2000;14(2):107-11.

Bondestam O, Gahnberg L, Sund ML, Linder L. Effect of chlorhexidine gel treatment on the prevalence of mutans streptococci and lactobacilli in patients with impaired salivary secretion rate. Spec Care Dent 1996;16(3):123-7.

Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers *in vivo*. Oper Dent 2007;32(2):107-11.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res 1955;34(6):849-53.

Cao DS, Hollis RA, Christensen RP, Christensen GJ. Effect of tooth disinfecting procedures on dentin shear bond strength. (Res 493) J Dent Res 1995;74(Espec Issue):73.

Cardoso PEC, Braga RR, Carrilho MRO. Evaluation of micro-tensile, shear and tensile tests determining the bond strength of three adhesive systems. Dent Mater 1998;14(11):394-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Carrilho MRO, Reis A, Loguercio AD, Rodrigues Filho LE. Resistência de união à dentina de quatro sistemas adesivos. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16(3):251-6.

Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldini S, Tay FR, Pashley DH et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007;86(1):90-4.

Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials* 2005;26(9):1035-42

Chigira H, Yukitani W, Hasegawa T, Manabe A, Itoh K, Hayakawa T et al. Selfetching dentin primers containing phenyl-P. *J Dent Res* 1994;73(5):1088-95.

Clark DC, Morgan J, Macentee MI. Effects of 1% chlorhexidine gel on the cariogenic bacteria in high-risk elders: a pilot study. *Spec Care Dent* 1991;11(3):101-3.

Crone FL. Deep dentinal caries from a microbiological point of view. *Int Dent J* 1968;18(3):481-8.

De Castro FL, De Andrade MF, Duarte Junior SL, Vaz LG, Ahid FJ. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent* 2003;5(2):129-38.

De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;82(2):136-40.

De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;84(2):118-32.

Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorenson SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surface and identification of debris by use of electron microscopy. *J Dent Res* 1970;49(6):1359-68.

El-Housseiny AA, Jamjoum H. The effect of caries detector dyes and cavity cleansing agent on composite resin bonding to enamel and dentin. J Clin Pediatr Dent 2000;25(1):57-63.

Epstein JB, McBride BC, Stevenson-Moore P, Merilees H, Spinelli J. The efficacy of chlorhexidine gel in reduction of *Streptococcus mutans* and *actobacillus* species in patients treated with radiation therapy. Oral Surg 1991;71(2):172-8.

Fardal O,Turnbull R. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. J Am Dent Assoc 1986;112(6):863-9.

Filler SJ. Shear bond strengths of composite to chlorhexidine treated enamel. Am J Dent 1994;7(2):85-8.

Frencken JE, Holmgren CJ. Tratamento Restaurador Atraumático (ART) para a cárie dentária. 1ª ed. Trad. De Joseana Pezzi Barison. São Paulo: Santos; 2001.

Friedman MM. The qualitative and quantitative bacterial content of stained dentin: an experimental study. Gen Dent 1979;27(6):38-44.

Fure S, Emilson CG. Effect of chlorhexidine gel treatment supplemented with chlorhexidine varnish and resin on mutans strobotococci and nactinomyces on root surfaces. Caries Res 1990;24(4):242-7.

Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of dentinal tubules. Arch Oral Biol 1976;21(6):355-62.

Grieve AR, Alani A, Saunders WP. The effects on the dental pulp of a composite resin and two dentine bonding agents and associated bacterial microleakage. Int Endod J 1991;24(3):108-18.

Griffith AA. The phenomena of rupture and flow in solids. Phil Trans Royal Soc London 1921;Series A(A221):163-98.

Guirado TE, Tubel MDM, Bengtson NG, Bengtson AL, Pinheiro SL. Avaliação, in vitro, da clorexidina 2% utilizada como agente de limpeza cavitária em restaurações de resina composta [lb099]. Braz Oral Res 2006;20(Suppl):101.

Gürkan S, Bolay S, Kiremitci A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *J Oral Rehabil* 1999;26(10):836-40.

Gwinnett AJ. Smear layer: morphological considerations. *Oper Dent* 1984;9(3):3-12.

Gwinnett AJ, Kanca J. Micromorphology of the bonded dentin interface and its relationship to bond strength. *Am J Dent* 1992;5(6):73-7.

Hayashi Y. High resolution electron microscopy of a small crack at the superficial layer of enamel. *J Electron Microsc* 1994;43(6):398-401.

Hewlett ER. Resin adhesion to enamel and dentin: a review. *J Calif Dent Assoc* 2003;31(6):469-76.

Hoshino E, Ando N, Sato M, Kota K. Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. *Int Endod J* 1992;25(1):2-5.

Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G. Micro-tensile bond strength of eleven contemporary adhesives to enamel. *Am J Dent* 2003;16(5):329-34.

Kanca III J. Resin bonding to wet substrate. I. Bonding to dentin. *Quintessence Int* 1992;23(1):39-41.

Keltjens HM, Schaeken MJ, Van der Hoeven JS, Hendriks JC. Effects of chlorhexidine gel on periodontal health of abutment teeth in patients with overdentures. *Clin Oral Implants Res* 1991;2(2):71-4.

Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993;27(5):402-8.

Leung RL, Loesche WJ, Charbeneau GT. Effect of Dycal on bacteria in deep carious lesions. *J Am Dent Assoc* 1980;100(2):193-7.

Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* 2001;35(6):397-406.

Marshall Jr GW. Dentin: microstructure and characterization. Quintessence Int 1993;24(9):606-17.

Meiers JC, Kresin JC. Cavity desinfectants and dentine bonding. Oper Dent 1996;21(4):153-9.

Meiers JC, Shook LW. Effect of disinfectants on the bond strength of composite to dentin. Am J Dent 1996;9(1):11-4.

Miller WD. On the comparative rapidity with which different antiseptic should be used for sterilizing cavities before fillings? Dent Cosmos 1891;33(5):337-47.

Mjör IA, Fejerskov O. Embriologia e histologia oral humana. Trad. Utreta LS, Ramalho LTO, Leonardo RT. São Paulo: Panamericana; 1990.

Nakabayashi N, Kojuma K, Masuhara E. The promotion of adhesion by infiltration of monomers into tooth substrates. J Biomed Mater Res 1982;16(3):265-73.

Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of resin dentin interface: nanoleakage vs microtensile bond strength. Oper Dent 2002;27(3):289-96.

Oosterwaal PJ, Mikx FH, van den Brink ME, Renggli HH. Bactericidal concentrations of chlorhexidine-digluconate, amine fluoride gel and stannous fluoride gel for subgingival bacteria tested in serum at short contact times. J Periodontol Res 1989;24(2):155-60.

Özer F, Karakaya Ş, Ünlü N, Erganiş O, Kav K, Imazato S. Comparison of antibacterial activity of two dentin bonding systems using agar well technique and tooth cavity model. J Dent 2003;31(2):111-6.

Park JW, Lee KC. The influence of salivary contamination on shear bond strength of dentin adhesive systems. Oper Dent. 2004;29(4):437-42.

Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate - a review. Scanning Microsc 1989;3(1):161-76.

Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. Oper Dent 1984;9(3):13-29.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentin adhesion. *J Dent* 1997;25(5):355-72.

Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent Mater* 1995;11(2):117-25.

Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakagima M, Yoshiyama M, Shono Y. The microtensile bond test: a review. *J Adhes Dent* 1999;1(4):299-309.

Perdigão J, Denehy GE, Swift EJ. Effects of chlorhexidine on dentin surfaces and shear bond strengths. *Am J Dent* 1994;7(2):81-4.

Perdigão J, Geraldeli S, Carmo AR, Dutra HR. In vivo influence of residual moisture on microtensile bond strengths of one-bottle adhesives. *J Esth Rest Dent* 2002;14(1):31-8.

Phrukkanon S, Burrow MF, Tyas MJ. Effect of cross-sectional surface area on bond strengths between resin and dentin. *Dent Mat* 1998;14(2):120-8.

Pinheiro SL, Simionato MR, Imparato JC, Oda M. Antibacterial activity of glass-ionomer cement containing antibiotics on caries lesion microorganisms. *Am J Dent* 2005;18(4):261-6.

Qvist V, Qvist J. Marginal leakage along concise in relation to filling procedure. *Scand J Dent* 1977;85(5):305-12.

Rabello TB, Coelho AJM. Efeito da clorexidina sobre a adesão dentinária e preservação pulpar. *Rev Bras Odontol* 1998;55(3):136-9.

Reis AF, Bedran-Russo AKB, Giannini M, Pereira PNR. Interfacial ultramorphology of single-step adhesives: nanoleakage as a function of time. *J Oral Rehabil* 2007;34(3):213-21.

Retief DH. Standardizing laboratory adhesion tests. *Am J Dent* 1991;4(5):231-6.

Rode SN, Ferreira Santos JF. Limpeza cavitária: remoção da camada de "smear". *Rev Bras Odontol* 1990;47(5):46-51.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength – evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994;10(4):236-40.

Sant'anna GR, Bönecker MJS, Duarte DA, Suga SS. *Cariologia: diagnóstico, controle e tratamento*. São Paulo: Santos; 2001 [Caderno de Odontopediatria].

Say EC, Koray F, Tarim B, Soyman M, Gulmez T. In vitro effect of cavity disinfectants on the bond strength of dentin bonding systems. *Quintessence Int* 2004;35(1):56-60.

Schreiner RF, Chapell RP, Glaros AG, Eick JD. Microtensile testing of dentin adhesives. *Dent Mat* 1998;14(3):194-201.

Shovelton DS. A study of deep carious dentine. *Int Dent J* 1968;18(2):392-405.

Suzuki RM, Gonzatto D, Samuel SMW. Correlação entre microinfiltração e resistência à tração. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica*, 1998, Águas de São Pedro. Anais..., Águas de São Pedro: SBPqO. 1998. p. 25. [Res.A060]

Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001;17(4):296-308.

Tay FR, King NM, Chan KM, Pashley DH. How can nanoleakage occur in selfetching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent* 2002;4(4):255-69.

Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry: a review. FDI Commission project 1- 97. *Int Dent J* 2000;50(1):1-12.

Tulunoglu O, Ayhan H, Olme A, Bodur H. The effect of cavity desinfectants on microleakage in dentin bonding systems. *J Clin Pediatr Dent* 1998;22(4):229-305.

Türkün LS, Ates M, Türkün M, Uzer E. Antibacterial activity of two adesive systems using various microbiological methods. *J Adhes Dent* 2005;7(4):315-20.

Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent* 1998;26(1):1-20.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture: adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;28:215-35.

Van Rijkom HM, Truin GJ, Van't Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 1996;75(2):790-5.

Van Schalkwyk JH, Botha FS, van der Vyver PJ, de Wet FA, Botha SJ. Effect of biological contamination on dentine bond strength of adhesive resins. *SADJ* 2003;58(4):143-7.

Vargas MA, Cobb DS, Denehy GE. Interfacial micromorphology and shear bond strength of single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater* 1997;13(5):316-24.

Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res* 1994;73(6):1212-20.

Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004;83(6):454-8.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Valores da resistência de união (MPa), pelo ensaio de microtração, obtidos com os sistemas adesivos em função do tratamento da superfície dentinária

Adesivo	Tatamento da Superfície Dentinária				
	Amostra	Controle	Clorexidina	Contaminado	Descontaminado
Clearfil SE Bond	1	44,51	40,93	29,32	37,13
	2	43,98	45,81	34,78	41,49
	3	41,67	39,58	35,27	35,45
	4	47,29	40,60	35,52	35,68
	5	40,23	40,29	39,05	42,16
	6	42,86	40,74	31,70	41,66
	7	40,15	42,38	33,05	44,69
	8	41,95	36,39	34,72	42,43
	9	45,04	39,34	28,85	32,92
	10	41,13	35,34	29,21	37,28
Single Bond 2	1	30,20	36,36	18,04	32,84
	2	27,76	48,26	27,54	32,06
	3	36,23	36,39	39,81	20,16
	4	38,50	30,20	17,63	36,88
	5	31,43	34,21	29,79	32,17
	6	42,27	37,73	24,13	34,93
	7	31,33	32,22	16,47	35,78
	8	22,51	21,64	20,01	34,10
	9	23,34	29,50	20,70	26,08
	10	31,66	37,58	22,00	26,15

ANEXO

ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOUSP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 174/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"Avaliação pelo teste de microtração da influência da contaminação bacteriana, in vitro, da dentina de molares humanos, na adesão de sistemas adesivos"**, de responsabilidade da Pesquisadora **Camilla Regina Galvão Bengtson**, sob orientação da Professora Doutora **Miriam Lacalle Turbino**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de novembro de 2006

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP