

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GEOVANE EVANGELISTA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE SISTEMAS ADESIVOS
SOBRE DIFERENTES CEPAS DE BACTÉRIAS DE LESÕES DE CÁRIE EM
DENTINA DE DENTES DECÍDUOS**

Alfenas/MG

2016

GEOVANE EVANGELISTA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE SISTEMAS ADESIVOS SOBRE
DIFERENTES CEPAS DE BACTÉRIAS DE LESÕES DE CÁRIE EM DENTINA DE
DENTES DECÍDUOS.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Linha de pesquisa: Epidemiologia das doenças bucais.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Coelho de Lima

Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Rodrigues Rosselli

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Moreira, Geovane Evangelista.

Avalliação do efeito antimicrobiano de sistemas adesivos sobre diferentes cepas de bactérias de lesões de cárie em dentina de dentes decíduos. / Geovane Evangelista Moreira. -- Alfenas/MG, 2016.

74 f.

Orientadora: Daniela Coelho de Lima.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Cárie Dentária. 2. Adesivos Dentinários. 3. Produtos com Ação Antimicrobiana. 4. Streptococcus mutans. 5. Lactobacillus. I. Lima, Daniela Coelho de. II. Título.

CDD-617.672

GEOVANE EVANGELISTA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE SISTEMAS ADESIVOS SOBRE
DIFERENTES CEPAS DE BACTÉRIAS DE LESÕES DE CÁRIE EM DENTINA DE
DENTES DECÍDUOS.**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas.

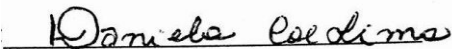
Linha de pesquisa: Epidemiologia das doenças bucais.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Coelho de Lima


Coorientadora: Profa. Dra. Eliana Rodrigues Rosselli

Aprovado em: 14/03/2016.

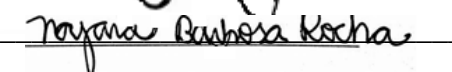
Prof.
Instituição:

Assinatura: 

Prof.
Instituição:

Assinatura: 

Prof.
Instituição:

Assinatura: 



A Deus por ter proporcionado esta nova
experiência no conhecimento científico;
Ao meu pai Joãozinho por ser meu companheiro;
A minha mãe Irene por ser exemplo de força;
A minha avó Cezarina pelas orações;
Aos meus irmãos Gislaine e Genilson pelo
parceria
A minha namorada pelo seu zelo;
Aos amigos por toda ajuda e incentivo nesta
conquista.



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar na elaboração dessa dissertação e pelas horas em que Ele não me deixou desanimar e me incentivou com Sua força.

Aos meus pais pelo cuidado que tiveram comigo ao longo desse período. Me ajudaram a nunca desistir das dificuldades que se achegavam durante o meu crescimento como pessoa. Foram os primeiros amigos e professores que tive na vida e hoje nesse barco da vida rumo ao doutorado continuam sendo os melhores companheiros de viagem. Obrigado mãezinha e paizinho.

Aos meus irmãos, que me ajudam com o cuidado da nossa família e dos meus pais por mim. A minha irmã por estar mais presente e meu irmão pela parceria em todos os momentos. Obrigado por isso e por terem feito as minhas vezes dentro de casa.

A minha querida orientadora, Professora Doutora Daniela Coelho de Lima. Tenho muito orgulho dela, na nossa amizade e de toda a família a qual ela faz parte, principalmente a minha pequena amiga Ana Clara, que é um anjo na vida desta mulher. Com seu “jeitão pra frente” me colocou em muitas situações agradáveis e felizes, principalmente desafiadoras. Fizemos uma boa parceria nos projetos de extensão, nos trabalhos apresentados em eventos, nas pesquisas que tínhamos juntos (Asilo e Unati). Sentiremos falta das gargalhadas juntos, mensagens no facebook, reuniões da Neusa, na sala dela, em sua casa.

A minha namorada Tassiana e aos seus pais. Vivi momentos alegres e cresci bastante afetivamente ao seu lado. Obrigado amor pelo cuidado e por me ouvir nas horas que precisei.

Aos professores que tive mais contato. Ao Prof. Jorge Klèber Chavasco pelas muitas gargalhadas durante os nossos experimentos no laboratório; a Profa. Eliana Rodrigues Rosselli por me colocar pra frente e ser meu braço direito nesta pesquisa; ao Prof. Denismar Nogueira mesmo tão requisitado deu toda a atenção necessária. Ambos foram essenciais em todos os momentos deste trabalho, doaram tempo, paciência e cuidado.

A amiga-irmã, Bianca Espósito, pela parceria nos estudos, conselhos; ao Da-|Ré pelas conversas gostosas e pelo companheirismo. A Thati, Lysandro, Ribamar, Laís pelas boas conversas e risadas.

A amiga Neuza que me salvou muitas vezes com seu computador, telefone, cafezinho e bons papos. As bolsistas dos projetos de extensão, Mariane e Ana Carolina aprendi muito com elas.

Aos professores Alessandro Pereira; Leandro Araújo Fernandes, Ronaldo Mariano, João Adolfo, Maísa Brigagão, Thomaz Araújo, Rafael Tobias, Vivien Thiemy, Marcela Haddad pelo conhecimento passado a mim, pelas dicas e críticas construtivas aos meus seminários e trabalhos.

Aos funcionários da biblioteca, Marlon, Ronan, Fátima pelas correções e instruções dadas a esta dissertação.

A Unifal/MG por toda ajuda financeira e logística. A Faculdade de Odontologia pelo espaço cedido junto ao programa. Aos funcionários da pós-graduação e da microbiologia pelo convívio.

Aos meus familiares próximos pelas orações e incentivos. A Pastoral Universitária Católica de Alfenas (PUCA) por ter sido minha formadora espiritual e ter me capacitado mais uma vez como profissional do Reino de Deus. Os vários momentos juntos de partilhas, orações, pregações me fizeram crescer como pessoa.

A todos aqueles que estiveram próximos a mim, Hélio Júnior, Luciano, João Paulo Vanessa Oliveira, Marília Beatriz, Eduardo Oliveira, David Braga, Valdirene e tantos outros que colaboraram indiretamente.

RESUMO

Os sistemas adesivos podem ter suas características, principalmente o efeito antimicrobiano de alguns deles, modificadas quando aplicados em diferentes substratos. Assim, este estudo avaliou a capacidade antimicrobiana de sistemas adesivos sobre diferentes cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus specie* de lesões de cárie em dentina de dentes decíduos. Por meio do teste de contato direto, subcultivo e da técnica de difusão em agar os sistemas adesivos: Clearfil SE Bond, Clearfil SE Protect (contendo MDPB) e Adper Single Bond 2 foram avaliados sobre 57 cepas diferentes de bactérias (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus specie*) extraídas de dentes decíduos. Para avaliação do crescimento bacteriano no subcultivo e comparação entre os sistemas adesivos e controles, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis (rank médio) seguido do Student-Newman-Keuls. Considerando a técnica de difusão em agar, as zonas de inibição foram mensuradas em milímetros pelo método visual e a análise descritiva foi realizada. Os resultados demonstraram que todas as cepas utilizadas na técnica de difusão em agar foram sensíveis ao primer do Clearfil SE Protect ($p < 0,0001$). No entanto, quando realizados os testes de contato direto e subcultivos, não houve diferença significativa estatisticamente entre os sistemas adesivos (Clearfil SE Protect versus Adper Single Bond 2: $p=0,3312$; Clearfil SE Protect versus Clearfil SE Bond: $p=0,8714$; Clearfil SE Bond versus Adper Single Bond 2: $p=0,4181$). Foi possível concluir que todos os sistemas adesivos testados apresentaram capacidade antimicrobiana sobre as diferentes cepas, independente das características específicas de cada dente e indivíduo.

Palavras-chave: Cárie dentária. Adesivos dentinários. Produtos com ação antimicrobiana. *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus*.

ABSTRACT

The antimicrobial effect of some adhesive systems may have its characteristics modified when applied to different substrates. This study evaluated the antimicrobial effect of adhesive system on different bacterial strains of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species of carious lesions in dentin of primary teeth. The direct contact test, subculture and agar diffusion technique were performed with the adhesive systems - Clearfil SE Bond, Clearfil SE Protect containing MDPB and Adper Single Bond 2 on 57 different strains of bacteria (*Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species) extracted from primary teeth. The Kruskal-Wallis test (mean rank) followed by Student-Newman-Keuls test was applied for evaluation of bacterial growth in subculture and comparison between adhesives systems and control. Considering agar diffusion technique, the zones of inhibition were measured in millimeters by the visual method and the descriptive analysis was performed. The results showed that all strains used in the agar diffusion technique was sensitive to primer Clearfil SE Protect ($p < 0.0001$), and the minimum value of inhibition zone was 12 mm similar to that observed for chlorhexidine 0.12% (11 mm). However when performed the contact direct test and subcultures, there was no statistically significant difference among adhesive systems (Clearfil SE Protect vs. Adper Single Bond 2: $p = 0.3312$; Clearfil SE Protect versus Clearfil SE Bond: $p = 0.8714$; Clearfil SE Bond vs. Adper Single Bond 2: $p = 0.4181$). It was concluded that *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species were statistically similar sensibility against the tested adhesives, which was independent of the tooth, the individual and the type of adhesive system.

Palavras-chave: Dental caries. Dentin-bonding agents. Products with antimicrobial action. *Streptococcus mutans*. *Lactobacillus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Túbulos dentinários, micrografia típica da dentina peritubular e dentina intercanalicular.....	20
Figura 2	- Representação esquemática das áreas de cárie em dentina.....	21
Figura 3	- Distribuição dos sistemas adesivos, controles do meio e cepas bacterianas nas microplacas.....	31
Figura 4	- Distribuição das alíquotas retiradas de cada poço.....	32
Figura 5	- Disposição dos discos impregnados com os sistemas adesivos, componentes e controles na placa após a inoculação da cepa bacteriana testada.....	33
Figura 6	- Aspecto visual de uma microplaca após TCD.....	34
Figura 7	- Representação do subcultivo em agar BHI após TCD.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Componentes, composições e lote dos sistemas adesivos utilizados. Alfenas/MG, 2016.....	30
Tabela 2	- Rank médio do crescimento bacteriano em subcultivo de acordo com os grupos testados. Alfenas/MG, 2016.....	35
Tabela 3	- Halos de inibição em milímetros em volta dos discos contendo adesivos e componentes sobre diferentes cepas de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Lactobacillus specie</i> . Alfenas/MG, 2016.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	- Brain heart infusion (Infusão de cérebro e coração)
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	- Dióxido de carbono
CIV	- Cimento de ionômero de vidro
CSP	- Clearfil SE Protect
CSB	- Clearfil SE Bond
g/L	- Gramas por litro
MAS	- Agar Mitis Salivarius
MDPB	- 12-metacriloxidodecilmiridínio de brometo
mL	- Mililitros
mm	- milímetros
mm ²	- Milímetros quadrado
MMPs	- Matrix metalloproteinases
MN	- Minnesota, Estado Americano
mol/L	- Massa molecular expressa em gramas por litro
NaCl	- Cloreto de Sódio
pH	- Potencial hidrogeniônico
RC	- Resina composta
TCD	- Teste de Contato Direto
USA	- Estados Unidos da América
°C	- Grau Celsius
μL	- Microlitro
%	- Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS SISTEMAS ADESIVOS	17
2.2	O SUBSTRATO DENTINÁRIO E A DENTINA AFETADA	20
2.3	OS MICRORGANISMOS RELACIONADOS A DOENÇA CÁRIE.....	23
3	OBJETIVO	27
4	MATERIAL E MÉTODO	28
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	28
4.2	CONDUTA JUNTO A UNIFAL/MG.....	29
4.3	PROCEDIMENTO MICROBIOLÓGICO.....	29
4.4	TESTE DE CONTATO DIRETO (TCD)	30
4.5	TÉCNICA DE DIFUSÃO EM AGAR.....	32
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICES	67
	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

A evolução significativa apresentada nos sistemas adesivos dentais e resinas compostas, nas últimas décadas, fez com que a dentina se tornasse um substrato para as restaurações, pois até então, os sistemas adesivos restringiam-se apenas ao esmalte. Com os avanços dos sistemas adesivos foi possível garantir retenção e adesividade igualmente na região de esmalte e dentina, além de longevidade as restaurações de resina composta (MONTEIRO VIEIRA et al., 2014; NAKABAYASHI, 1982).

Além disso a Odontologia atual se baseia na filosofia da mínima remoção de tecido dental hígido e visa a obtenção de resultados satisfatórios, tanto do ponto de vista estético quanto biológico. Além disso, preconiza ações preventivas e mediadas pela realização de diagnósticos precoces por meio de programas educativos (CLAVIJO et al., 2007; DE QUEIROZ MOTA, DE SOUSA LEITE; TARGINO, 2014; DURAND; MONTEIRO JUNIOR; MAIA, 2008; GONDIM, 2006; IMPARATO, 2010; MOURA et al., 2011).

Entretanto, se as ações e medidas não forem suficientes para impedir que o processo de evolução da doença cárie aconteça a níveis avançados, o tecido terá que ser substituído por um material restaurador (GONDIM, 2006; IMPARATO, 2010).

O sucesso ou insucesso clínico das restaurações depende da habilidade do cirurgião-dentista, da técnica abordada, do tipo de produto usado no tratamento e da capacidade deste em resistir à recidiva de microrganismos cariogênicos, seja pela liberação de fluoretos seja por outros efeitos antibacterianos (BARATIERI et al., 2002; CARVALHO et al. 1998; DELFINO et al., 2006).

A atividade antimicrobiana dos materiais restauradores é importante quando se relaciona este efeito as propriedades indesejáveis de contração de polimerização e alterações volumétricas advindas das variações térmicas nas resinas (CARVALHO et al., 1995; HALLER; TROJANSKI, 1998; LINS et al., 2005). Estes fenômenos que ocorrem com o material determinam a formação de “espaços” entre a restauração e o dente, criando um ambiente favorável ao acúmulo e proliferação de microrganismos (MJÖR, 2005; TYAS, 2005), microinfiltração química e molecular; manchamento da margem da restauração, cáries secundárias ou mesmo patologias pulpares irreversíveis (DIEDRICH, 2015; GORDAN et al., 1997; WATTS; HIND, 1999).

Com relação a microinfiltração por bactérias e a respeito da permanência destas abaixo das restaurações após o preparo cavitário, ambos os casos podem desencadear o

desenvolvimento da doença cárie (AMBIKATHANAYA et al., 2013; FEUERSTEIN et al., 2007; SHAFIEI; MEMARPOUR, 2012). Devido a cárie dentária estar associada a inúmeros fatores, faz-se necessário a identificação das bactérias cariogênicas mais prevalentes, sendo as principais espécies os *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus species* (KURAMITSU; WANG, 2006; NISHIKAWARA et al., 2007; SALONEN et al., 1990; THIBODEAU; O'SULLIVAN; TINANOFF, 1993). Elas estão intimamente ligadas aos índices de cárie de um indivíduo, apresentando uma associação positiva entre os seus níveis e a alta prevalência da doença (LLENA-PUY; MONTANANA-LLORENS; FORNER-NAVARRO, 1999; ROETERS et al, 1995; THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1996).

Assim, para que os efeitos nocivos causados pela cárie dentária sejam controlados existe a necessidade do conhecimento do potencial antibacteriano dos materiais restauradores (BARATIERI et al., 2002; IMAZATO et al., 1997; MENEZES; SANTOS; PEIXOTO, 2012).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Um dos princípios fundamentais que deve ser respeitado ao realizar o preparo cavitário é o de que a dentina deve permanecer úmida para a formação adequada de uma camada entre dentina e o sistema adesivo: a camada híbrida (PASHLEY et al., 2007). Caso isto não ocorra, pode haver o rompimento da linha de união do material ao dente e conseqüentemente, a formação das fendas conforme às forças forem geradas durante o fenômeno da contração de polimerização das resinas ou até mesmo durante os esforços mastigatórios (GWINNETT; YU, 1995; SANO et al., 1999; SARRET, 2005).

Com relação ao procedimento de desmineralização da dentina durante o ataque ácido, pode ocorrer preenchimento incompleto com formação de espaços, os quais podem ser ocupados por água, levando a uma degradação hidrolítica da camada híbrida. Clinicamente pode acarretar em sensibilidade pós-operatória, formação de nichos de estagnação de biofilme e possivelmente a recorrência da lesão cáriosa (GWINNETT; YU, 1995; SANO et al., 1999).

O rompimento da camada formada entre dentina e esmalte desencadeia a formação das fendas entre esmalte e resina, o que não necessariamente determina o desenvolvimento de lesões cárias secundárias, mas pode servir como um nicho retentor de biofilme bacteriano e dessa forma ser um fator que favoreça sua instalação e progressão, principalmente em pacientes de alto risco à cárie (BERGENHOLTZ et al., 1982; FEUERSTEIN et al., 2007; KARANIKAKOUMA et al., 2001).

Papagiannoulis, Kakaboura e Eliades (2002) realizaram um estudo clínico in vivo e in vitro para investigar o potencial anti-cariogênico de uma resina composta liberadora de flúor (RC) e de um cimento de ionômero de vidro (CIV). Da etapa in vivo participaram quatro pacientes, com baixa atividade de cárie e com extração indicada dos quatro primeiros pré-molares (n=16). Os pré-molares receberam restaurações com gap artificial de 40 µm de largura em uma das margens. Após seis meses, os dentes foram avaliados sob microscopia de luz polarizada para análise da presença de lesões cárias. As regiões sem gap estavam livres de lesões e apenas algumas regiões com gap apresentaram lesão cária adjacente, sendo que os dentes restaurados com RC apresentaram menor comprimento e profundidade da lesão cária. Nesse estudo, o tamanho do gap não foi por si só determinante para o desenvolvimento da lesão de cárie adjacente, mostrando que o início da lesão não está diretamente relacionado ao defeito marginal, mas sim ao acúmulo de placa com potencial cariogênico.

Apesar das restaurações modernas adotarem princípios da Odontologia minimamente invasiva no contexto da cariologia, o foco do tratamento restaurador é a redução do risco de cárie no indivíduo. Portanto, torna-se desejável que o material restaurador e sistema adesivo apresentem uma ação cariostática, a fim de que isso possa minimizar a colonização de microrganismos na interface dente/restauração, diminuir a instalação e recidiva de cárie; e caso essa atividade venha a se manter, possa inclusive condicionar o desenvolvimento de uma microbiota menos cariogênica na superfície do material restaurador e dificultar a penetração de bactérias na interface existente (IMAZATO et al., 2001; IMAZATO et al., 2006; LINS et al., 2005; MEHDAWI et al., 2009).

Os sistemas adesivos utilizados juntamente com as resinas podem possuir ação antimicrobiana contra os efeitos das bactérias cariogênicas presentes na cavidade bucal. Tais materiais apresentam em sua composição monômeros que possuem grupos hidrófilos, geralmente um ácido, o fosfato hidrogênico ou o carboxilato. Estes conferem a quase todos os agentes de união um pH baixo, por exemplo, o adesivo Xeno Bond F (Dentsply) apresenta pH de 0,85 e o Single Bond (3M ESPE) pH de 4,5 (IMAZATO et al., 2003; MEIERS; MILLER, 1996). Portanto, a comprovada ação antibacteriana dos agentes de união depende da composição e da acidez (EMILSON; BERGENHOLTZ, 1993; MEIERS; MILLER, 1996; IMAZATO et al., 1998).

Entretanto, de acordo com Emilson e Bergenholtz (1993) a atividade antibacteriana dos agentes de união associada ao baixo pH não é confiável para os tratamentos restauradores, por ser ineficaz na presença das bactérias ácido-tolerantes, como os *Lactobacillus*. Logo, o benefício de um baixo pH exibido pelos agentes de união dentinário parecem ser limitados e de acordo com os autores, pode ocorrer também uma variação na ação bacteriostática dos agentes de união diante da polimerização. Isso ocorre porque há a diminuição do halo de inibição dos materiais, ou seja, redução na diluição de componentes antibacterianos polimerizáveis.

Assim, com o intuito de diminuir ou acabar com os prejuízos causados pelos microrganismos associados à cárie, agentes antibacterianos, tais como: clorexidina, flúor, glutaraldeídos e monômeros resinosos com ação antimicrobiana, têm sido incorporados à composição dos materiais adesivos (IMAZATO et al., 2006; IMAZATO et al., 2008; XIAO et al., 2009).

2.1 A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS SISTEMAS ADESIVOS

Os sistemas adesivos são produtos responsáveis por produzir a adesão do material restaurador às estruturas dentais. São a combinação de monômeros resinosos de diferentes pesos moleculares e viscosidades, diluentes resinosos e solventes orgânicos (acetona, etanol ou água) (CARVALHO et al., 2004).

Alguns experimentos incorporaram agentes antibacterianos como o digluconato de clorexidina em resinas compostas e sistemas adesivos e obtiveram efeito antibacteriano. Entretanto, esse efeito pode ter sua eficiência esgotada com o tempo, além de deteriorar as propriedades mecânicas dos materiais restauradores (HIRAISHI et al., 2008).

Os primeiros estudos que tentaram incorporar esse agente antimicrobiano apresentaram deficiência na resistência mecânica e adesiva, e o potencial preventivo desses sistemas adesivos ainda é questionado (ABIDO, 2011; SHAFIEI; MEMARPOUR, 2012). Tal indagação se refere, principalmente, a sua atividade após fotoativação, o que implica na inexistência no mercado de um sistema adesivo autocondicionante com clorexidina (ESTEVES; REIS; RODRIGUES, 2010; FEUERSTEIN et al., 2007; IMAZATO et al., 1999; IMAZATO et al., 2008)

A clorexidina na verdade tem sido utilizada como agente de desinfecção antes da realização das restaurações, pois possui a capacidade de reduzir, de forma significativa, os níveis bucais de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus* (GRANDE, 2008; SANT'ANNA et al., 2001). Atualmente, o produto vem sendo indicado por seu efeito benéfico na preservação da força de união dentina-resina ao inibir as metaloproteinases (MMPs) (BRESCHI et al., 2008; PASHLEY et al., 2004).

Outros agentes de união como o GLUMA Dentin Bond (Bayer), o Syntac (Ivoclar/Vivadent) e o ProBOND (LD Caulk/Dentsply) apresentam em sua composição o glutaraldeído. Este por si só é um agente de fixação biológico que desnatura proteínas do fluido dentinário, fazendo com que haja a formação de um tampão (FELTON, BERGENHOLTZ e FOX, 1989).

Felton et al. (1989) confeccionaram cavidades em dentes de primatas e aplicaram compósitos contendo o adesivo GLUMA. Os autores deixaram estas cavidades abertas durante 48 horas e observaram que após este tempo o sistema adesivo aplicado foi eficaz na eliminação de bactérias que invadem os túbulos dentinários. Outros estudos laboratoriais de cultura bacteriana evidenciaram que os sistemas adesivos contendo glutaraldeído produzem halos de inibição contra *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* (MEIERS; MILLER, 1996;

EMILSON; BERGENHOLTZ, 1993). Os resultados mostrados pelo uso do glutaraldeído decorrem de seu efeito antibacteriano, uma vez que os adesivos que não possuem glutaraldeído ou qualquer outro agente antimicrobiano na sua composição não demonstraram inibição (NAKABAYASHI; NAKAMURA; YASUDA, 1991; THOMÉ, 2009).

Entretanto, o efeito do glutaraldeído pode ser limitado há poucos dias após a aplicação. Walter et al. (2007) observaram que todos os adesivos que continham glutaraldeído exibiram zonas de inibição contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus*, porém esse efeito teve a duração inferior a uma semana. Assim, diversas foram as tentativas de incluir este antimicrobiano nos sistemas adesivos, seja no acondicionamento ácido ou no adesivo propriamente dito, porém os materiais com glutaraldeído continuavam a prejudicar as capacidades mecânicas dos adesivos (ESTEVES; REIS; RODRIGUES, 2010; THOMÉ, 2009).

Outra alternativa para promover ação cariostática aos sistemas adesivos foi a incorporação de íons flúor (ITOTA et al., 2002). Existe uma grande variedade de mecanismos envolvendo os efeitos cariostáticos do flúor, como a redução da solubilidade da hidroxiapatita, o balanceio na taxa de desmineralização/remineralização e a estabilização das estruturas cristalinas do esmalte. Além disso, apresenta efeito anticariogênico por interferir no metabolismo dos microrganismos e capacidade de tornar o elemento dentário mais resistente aos ataques ácidos promovidos pelas bactérias (JUNIOR et al., 2009; PIRES-DE-SOUZA et al., 2007).

Alguns sistemas adesivos apresentam em sua composição o fluoreto, como é caso do Optibond Solo Plus (Kerr) e Clearfil SE Protect, os quais são efetivos na prevenção da lesão de parede cavitária (ITTHAGARUN et al., 2001).

Entretanto, o efeito cariostático do flúor adicionado nos adesivos parece ser controverso. Rodrigues et al. (2005) compararam in vitro a ação cariostática de ionômeros de vidro convencionais e híbridos e de uma resina composta contendo fluoretos de cálcio. Os autores observaram que a resina composta não apresentou efeito cariostático e os mesmos justificaram esse resultado devido ao efeito cariostático do fluoreto e do cálcio só ocorrer quando os mesmos entram em solução na cavidade bucal.

Hara et al. (2005) também questionaram os efeitos cariostáticos de agentes adesivos, contendo flúor, em um estudo in vitro que comparou quatro agentes adesivos contendo flúor (Optibond Solo, One-up Bond F, Prime & Bond NT e Tenure Quick) com um cimento de ionômero de vidro. Os autores relataram que, apesar dos sistemas adesivos liberarem flúor, os

mesmos não foram capazes de inibir a formação de lesões de cárie secundária como ocorrido com o cimento de ionômero de vidro.

Peris et al. (2007) observaram que o flúor liberado de sistemas adesivos Optibond Solo Plus e Clearfil SE Protect não foi capaz de promover um efeito cariostático frente ao desafio cariogênico *in vitro* e resultou em cárie secundária ao redor de restaurações realizadas em dentes bovinos e conseqüentemente na redução da força de união (ITTHAGARUN et al., 2001; HARA et al. 2005; RODRIGUES et al., 2005).

Segundo Esteves, Reis e Rodrigues (2010) a solução mais adequada para alcançar um sistema adesivo que possua uma efetiva ação antibacteriana, sem prejuízos no processo de adesão ao esmalte e dentina é a imobilização de monômeros antimicrobianos na matriz resinosa (ESTEVES; REIS; RODRIGUES, 2010). Partindo deste princípio, Imazato et al. (1994) preconizou a incorporação do monômero 12-brometo de metacrilóxi-dodecilpiridínio (MDPB), o qual foi inicialmente incorporado nos compósitos resinosos e desempenha semelhante ação a clorexidina, pois aumenta a hidrofilia do adesivo e pode resultar em uma melhor estabilidade da interface adesiva (IMAZATO et al., 2006).

Após os estudos que introduziram o MDPB como antibacteriano em resinas compostas, realizou-se experimentos nos sistemas adesivos (IMAZATO et al., 1997). As pesquisas iniciais apresentaram resultados promissores em relação à inibição de estreptococos sem alterar as propriedades mecânicas de força de compressão, tensão diametral, resistência, capacidade de polimerização e microdureza das resinas (IMAZATO; MCCABE, 1994; IMAZATO et al., 1994).

Além disso o presente monômero tem como função desinfetar a cavidade após a remoção de cárie, na tentativa de eliminar as bactérias remanescentes, sendo comercializado como Clearfil SE Protect (Kuraray). O MDPB é sintetizado pela combinação do agente antibacteriano amônia quaternária e o grupo metacrilol e diferentemente dos outros agentes antimicrobianos, este produto apresenta ação sem ser liberado para o meio e no estágio não polimerizado. O MDPB contido no primer atua como solução bactericida, desinfetando a cavidade sendo o mecanismo antibacteriano decorrente da ligação catiônica aos componentes da parede celular bacteriana, causando distúrbios na função da membrana e acarretando o extravasamento de material citoplasmático (IMAZATO et al., 1994; IMAZATO et al., 1997).

A adição de MDPB resultou em produtos com propriedades físicas e mecânicas compatíveis com outros materiais restauradores que não contenham MDPB. Além disso, os mesmos resultados físico-mecânicos foram observados após a fotopolimerização do mesmo

(ESTEVES; REIS; RODRIGUES, 2010). Com a fotoativação do adesivo, a porção antibacteriana da molécula permanece aprisionada na matriz polimérica e mesmo imobilizada nesta matriz, o MDPB continua, apesar de ser em menor grau, exercendo sua ação pelo contato direto com os microrganismos, ou seja, atuando como solução bactericida, desinfetando a cavidade (IMAZATO et al., 1994; IMAZATO; IMAI; EBISU, 1998).

Ademais, o grau de polimerização dos agentes de união dentinários é aproximadamente 70%, logo, as moléculas de MDPB residuais não polimerizadas podem mostrar efeito bactericida mesmo após a fotoativação, entretanto, o efeito desta porção residual não deve ser superestimado (IMAZATO et al., 1997; SACRAMENTO et al., 2008).

2.2 O SUBSTRATO DENTINÁRIO E A DENTINA AFETADA

A dentina tem como principal característica a presença de túbulos que percorrem toda sua espessura os quais são formados por dentina peritubular, processo odontoblástico, colágeno e fluido dentinário. Tal aspecto faz com que a dentina possua permeabilidade e quando exposta ao meio bucal, essa estrutura tubular da dentina funciona como uma via de transporte de substâncias da cavidade bucal para a polpa e vice-versa (FIGURA 1) (GARBEROGLIO; BRANNSTROM, 1976; OZOK; WU; WESSELINK, 2002).

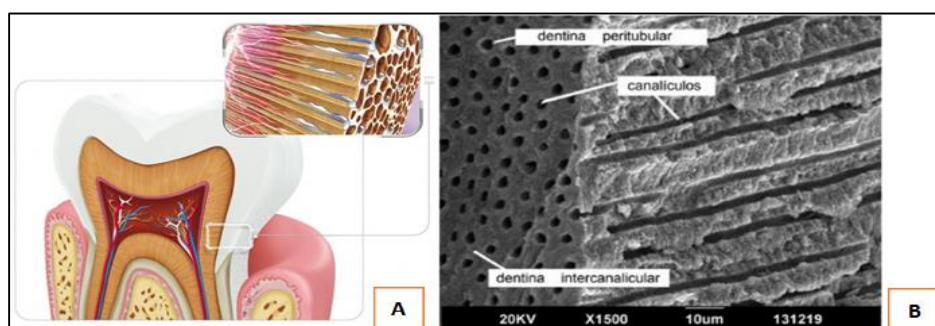


Figura 1 - Aspecto da dentina

a) Esquema dos túbulos dentinários

b) micrografia da dentina peritubular e intercanalicular

Fonte: Odontopedia¹; DELFINO et al. (2010, 383)².

¹ Disponível em: <http://www.odontopedia.info/index.php/T%C3%BAbulos_dentin%C3%A1rios>

² Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ce/v56n340/v56n340a11.pdf>>

O fator que está relacionado com o desenvolvimento da cárie em dentina é a permanência de microrganismos no interior desta e em profundidades variáveis dentro dos túbulos dentinários (IOST et al., 1995; KIDD; JOYSTON-BECHAL; BEIGHTON, 1993).

Morfologicamente, a estrutura dentinária acometida por cárie possui algumas regiões distintas entre si. Conforme a figura 2, a primeira mais externamente é a zona de destruição e a zona de desmineralização superficial ou avançada (a e b). Abaixo destas pode-se notar a zona de invasão bacteriana (c) e zona de desmineralização profunda (d), que é provocada por ácidos e enzimas, e precede a invasão bacteriana. Por fim duas zonas, a de esclerose dentinária (e), mais próxima da polpa e zona de reação (f), que tenta paralisar a lesão, obliterando os túbulos (GUEDES-PINTO, 2003).

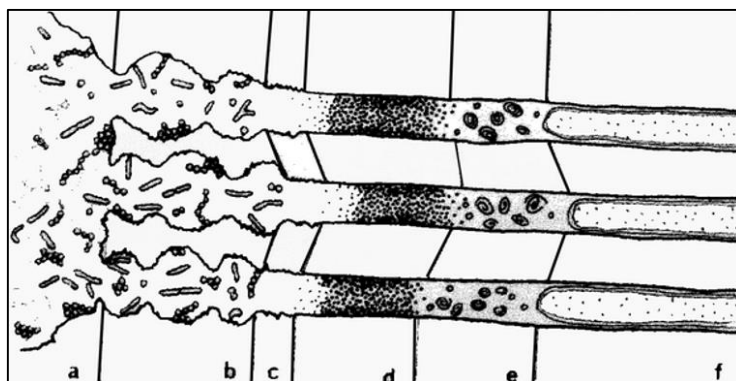


Figura 2 - Representação esquemática das áreas de cárie em dentina.
Fonte: Patoral³

Clinicamente as lesões de cárie em dentina apresentam duas camadas de tecido cariado: a camada de dentina infectada e a de dentina afetada. A primeira apresenta-se com aspecto amarelado e amolecido, completamente destruída, infectada por bactérias, sem sensibilidade e capacidade de remineralização. A segunda camada, mais internamente, apresenta-se com aspecto acastanhado e menos amolecido, com conteúdo mineral maior e conseqüentemente mais endurecido; menor contaminação, tendo capacidade de captar minerais e sendo considerada como tecido vital (FRENCKEN; HOLMAGREN, 2001; OSTROM, 1984; THOMPSON et al., 2008).

É importante durante a intervenção clínica o conhecimento de como está a dentina, pois está serve de guia na remoção da cárie, já que a zona mais profunda pode ser remineralizada, mesmo tendo sido infectada. Além disso, pode haver colágeno que ainda não foi quebrado de forma irreversível (GUEDES-PINTO, 2003).

³ <http://patoral.umayor.cl/patoral/wp-content/uploads/2013/12/101.gif>

Com relação a permeabilidade, a dentina afetada pela cárie apresenta-se mais permeável na dentina intertubular e menos na dentina intratubular. Este fato está associado ao condicionamento ácido que ataca mais profundamente o substrato de dentina intertubular, parcialmente desmineralizada devido à ação do processo cariioso de des-remineralização e mais porosa que a dentina normal (PASHLEY; CARVALHO, 1997), levando a uma maior infiltração do sistema de união. Quanto a infiltração do adesivo na dentina intratubular, ela é dificultada pela presença de depósitos de minerais nos túbulos dentinários, que são resistentes ao ataque ácido (SAY et al., 2005; WANG et al., 2007), atuando como uma barreira que diminui a infiltração do ácido e do sistema adesivo (OMAR et al., 2007).

Nakajima et al. (2000) e Yoshiyama et al. (2002) avaliaram o selamento de restauração com resina composta em dentina livre de cárie, dentina infectada e dentina afetada, e puderam observar que a força de união foi maior em dentina normal. Com o desenvolvimento da cárie, ciclos de desmineralização e remineralização podem promover a produção de grandes cristais de fosfato de cálcio, que são menos solúveis no condicionamento do que a hidroxiapatita da dentina normal. Contudo, os autores sugerem que a lesão seja circunscrita por dentina normal ou esmalte e que se use condicionadores de alta concentração para que ocorra desmineralização da dentina afetada, pois isso contribui melhorando a força de união na mesma.

Por conta das características citadas acima, os parâmetros clínicos de dureza, coloração do tecido remanescente, condicionamento das paredes cavitárias com ácido fosfórico e o uso de corantes evidenciadores como auxiliares na remoção da cárie não garantem a total remoção de microrganismos da dentina (IOST et al., 1995; KIDD; JOYSTON-BECHAL; BEIGHTON, 1993). Apesar de ser efetivo na redução do número de bactérias remanescentes o uso do ácido fosfórico não é capaz de eliminá-las completamente (JENSEN; HANDELMAN, 1980; KRAMER; ZELANTE; SIMIONATO, 1993; LUGLIE et al., 1997).

Assim sendo, para atingir as bactérias que se encontram no interior dos túbulos dentinários os sistemas adesivos estão recebendo em sua composição antimicrobianos. A preferência tem sido por agentes de união que não só atuem sobre a superfície do preparo cavitário, mas que também, em alguma extensão, permeiem a dentina através de seus túbulos dentinários; visto que em algumas situações clínicas são aplicados diretamente sobre a dentina recém preparada, sem o prévio condicionamento com ácido fosfórico e lavagem da cavidade para remoção da smear layer (GONDIM, 2006).

2.3 OS MICRORGANISMOS RELACIONADOS A DOENÇA CÁRIE

A cárie dentária é uma das doenças biofilme-açúcar induzida de caráter multifatorial que está associada a fatores necessários (acúmulo de biofilme), determinantes (exposição de açúcares e fluoretos) e moduladores (biológicos e sociais) (FERREIRA-NÓBILO; SOUSA; CURY, 2014). Podendo ser relacionada a bactérias específicas, a uma dieta rica em carboidratos e a um hospedeiro susceptível em função do tempo (FERREIRA-NÓBILO; SOUSA; CURY, 2014; KEYES, 1962; MARSH, 1995; NEWBRUN, 1992). Fatores como higiene, colonização bacteriana, composição da saliva, entre outros, influenciam o metabolismo das bactérias sobre os dentes, modulando a atividade da cárie, modificando as proporções de microrganismos acidogênicos e acidúricos (KAMIYA; TAIETE; GONÇALVES, 2011; LEITES; PINTO; SOUZA, 2005).

Se os fatores acima estiverem presentes pode ocorrer o desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização no esmalte levando ao desenvolvimento de cárie (CIARKSON; MCKOUGHILIN, 2000).

As bactérias que causam a deterioração aderem-se aos dentes e produzem ácido láctico através do metabolismo de açúcar, conseqüentemente diminui o pH da superfície dos dentes. Em um pH inferior a 5,5, a hidroxiapatita (fosfato de cálcio cristalino ou hidrofosfato de cálcio) começa a dissolver e ocorre saída de íons cálcio e fosfato para o meio bucal. Este processo ocorre concomitantemente com períodos de remineralização promovendo o equilíbrio do processo. No entanto, quando este equilíbrio é alterado com a desmineralização a saliva fica subsaturada em relação à hidroxiapatita e a perda de minerais do dente torna-se superior à reposição dos mesmos para a estrutura dentária (BRAGA et al., 2012; CORRALO, 2003).

Há contudo uma microbiota cariogênica representada por bactérias capazes de colonizar a superfície dentária e produzir ácido, em uma velocidade superior à capacidade de neutralização do processo de desmineralização (MANTZOURANI et al., 2009; TANNER et al., 2011).

O *Streptococcus mutans* é a principal bactéria relacionada ao desenvolvimento da cárie e constitui uma das espécies com maior poder cariogênico. Além disso são fermentadores de grande quantidade de carboidratos; possuem a capacidade acidogênica (produção de ácido láctico) e apresentam a capacidade acidúrica (sobrevivência em pH ácido) (BEIGHTON et al., 2004; HAMADA; SLADY, 1980; IMAZATO et al., 1994; KLEINBERG, 2002; KURAMITSU; WANG, 2006; LEITES et al., 2006; MATTOS-GRANER et al., 1998;

NISHIKAWARA et al., 2007; NOBRE DOS SANTOS et al., 2002; PARISOTTO et al., 2009; TAKAHASHI; NYVAD et al., 2011; VACHIRAROJPISAN et al., 2004).

Além disso, são bactérias que possuem a capacidade de expressar diversos genes de virulência, os quais influenciam em seu crescimento e no acúmulo a superfície dos dentes. Tais características podem estar relacionadas, dentre outros mecanismos, a habilidade destes microrganismos em sintetizar proteínas ligantes de glucano (GBPs), um grupo heterogêneo de proteínas que promovem a adesão celular às superfícies dos dentes (BANAS; VICKERMAN, 2003; HOSHINO; FUJIWARA; KAWABATA, 2012; LYNCH et al., 2007; MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2006). Ainda em relação a virulência dos *Streptococcus mutans* estes podem liberar proteínas antimicrobianas chamadas mutacinas as quais interferem na invasão e proliferação de outras bactérias no biofilme, aumentando seu potencial cariogênico e conferindo significativa vantagem ecológica para esta cepa (BALAKRISHNAN et al., 2002; HAMADA; OOSHIMA, 1975; KAMYIA; TAIETE; GONÇALVES, 2011; KRETH et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2004; NGUYEN et al., 2009; NICOLAS; LAVOIE; LAPOINTE, 2007).

Na cavidade bucal os *Streptococcus mutans* são comumente encontrados em superfícies dentárias e em outros nichos como materiais restauradores, aparelhos ortodônticos, acrílicos e dorso da língua. Além disso, podem ser detectados após a erupção dentária (ALMAS; AL-SANAWI; AL-SHAHRANI, 2005; CAUFIELD et al., 1993; FUJIWARA et al., 1991; LI; TANNER, 2015; MATTOS-GRANER et al., 1998; TANNER et al., 2002).

O número de crianças infectadas com *Streptococcus mutans* aumenta com a idade frente ao aumento da exposição a novas fontes de infecção e mudanças nas condições bucais, tais como, aumento do número de áreas retentivas e mudanças nos hábitos alimentares (aumento do consumo de sacarose) (BRETZ, 2003; THORILD; LINDAU-JONSON; TWETMAN, 2002). A idade em que as crianças são infectadas é importante, visto que filhos de mães altamente infectadas adquirem *Streptococcus mutans* mais cedo, o que implica um desenvolvimento da doença cárie também precoce, resultando em danos mais severos com o passar do tempo (ALALUUSUA et al., 1990; BRAMBILLA et al. 1998; CEPHAS et al., 2011; LI; WANG; CAUFIELD, 2000; LI et al., 2007; MATTOS-GRANER et al., 2001; SODERLING et al. 2001).

O estabelecimento precoce na boca por bactérias cariogênicas está claramente associado ao maior risco à cárie subsequente e pode, inclusive, ser usado como triagem para risco em crianças pequenas. Este fator também pode indicar que a criança foi exposta a uma dieta rica em sacarose, o que teria facilitado a colonização de bactérias ligadas a cárie e contribuído para

um aumento do risco em desenvolver a doença (LI; WANG; CAUFIELD, 2000; MATTOS-GRANER et al., 2001).

Salienta-se ainda que outras bactérias presentes na boca estão associadas ao potencial cariogênico, tais como *Lactobacillus specie* (PARISOTTO et al 2009; RAMOS-GOMÉZ et al., 2002; TAKAHASHI; NYVAD et al., 2011), *Actinomyces israelii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus milleri* e *Veillonella* (KLEINBERG, 2002; MUNSON et al. 2004).

Acreditava-se que os fatores de virulência dos *Lactobacillus*: capacidade acidogênica, acidúrica e de degradar matriz protéica poderiam proporcionar a estas bactérias o crescimento no pH baixo, observado no biofilme e nas lesões cáries (COTTER; HILL, 2003; FITZGERALD et al., 1981). Entretanto, os estudos demonstraram que eles parecem não desempenhar papel preponderante como agente etiológico do início da lesão de cárie. Na verdade são invasores secundários e estão nos estágios mais avançados da doença e contribuem para a progressão das lesões cáries sob circunstâncias específicas, como quando há frequente e alto consumo de sacarose (LEITES et al., 2006; MALTZ, 1996; PARISOTTO et al., 2009; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001; WEYNE, 1989).

Em relação as bactérias cariogênicas e a diversidade destas na cavidade bucal, Li et al. (2007) avaliaram esta diferença em crianças entre 2 a 8 anos de idade com cárie precoce e grave na infância. Eles observaram que a riqueza de espécies foi significativamente maior nas crianças sem a cárie, sugerindo que a diversidade microbiana e complexidade bacteriana na placa dental são significativamente mais baixas em crianças acometidas pela doença.

Aas et al. (2008) buscaram detectar as espécies bacterianas associadas à cárie em dentes decíduos e permanentes em indivíduos de 2 a 21 anos de idade. Eles descobriram que 10 a 20% dos indivíduos com cárie severa não tiveram níveis detectáveis de outras espécies produtoras de ácido. Também verificaram que espécies como *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* e *Atopobium* também podem desempenhar um papel importante na produção de cárie.

Em crianças, a presença de *Lactobacillus* em cáries coronais é incontestável. No entanto, elas encontram-se em menor quantidade do que *Streptococcus mutans* e não são encontrados em cáries incipientes. A presença destes microrganismos também é dependente do tamanho da cavidade: eles são mais numerosos nas médias e grandes cavidades (BADET; THEBAUD, 2008).

Qualquer que seja o método metabólico utilizado pelo lactobacilo, o resultado será uma acidificação do meio ambiente. Estudos demonstraram não só as capacidades acidogênicas de

lactobacilos, mas também a sua tolerância ao ácido (BADET; RICHARD; DORIGNAC, 2001; BORGSTROM et al., 1997). Estas bactérias podem causar um decréscimo no pH do meio ambiente até valores inferiores a 4,5 e são capazes de sobreviver em um pH até 2,2.

Ademais, altas contagens *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus species* e baixo fluxo salivar são características de pacientes com alto risco ao desenvolvimento e progressão da doença cárie (OKADA et al., 2005; PAIVA; FERREIRA, 2009; PEGORARO, 1995; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2002). A presença de *Streptococcus mutans* na saliva é um forte indicador do risco de cárie e a alta contagem de *Lactobacillus species* na saliva revela um grande número de lesões cariosas abertas em plena evolução e uma elevada frequência na ingestão de açúcar (ALALUUSUA et al., 1984; LARMA, 1985; OKADA et al., 2005; PAIVA; FERREIRA, 2009; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2002).

3 OBJETIVO

Avaliar a capacidade antimicrobiana de sistemas adesivos sobre diferentes cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus specie* de lesões de cárie em dentina de dentes decíduos.

4 MATERIAL E MÉTODO

Os materiais e métodos utilizados no presente estudo foram baseados nos trabalhos de Feuerstein et al. (2007); Gondim (2006) e Sampath, Hegde e Hegde (2011).

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo foram coletadas em dentina de dentes decíduos de crianças que participaram da pesquisa desenvolvida na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) com registro no Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP com número 014/2008 (ANEXO A).

Os 45 participantes do estudo foram selecionados na triagem para o atendimento odontológico na clínica de Odontopediatria da FOP/UNICAMP, na faixa de 8 a 11 anos de idade, sem distinção de raça ou sexo, que necessitavam de tratamento odontológico e apresentavam cavidades de cárie nas faces oclusal e/ou ocluso-proximal de molares decíduos.

O acesso a lesão de cárie foi realizado com brocas em alta rotação (carbide #245) para remoção de esmalte e brocas esféricas #2 a #8 em baixa rotação para remoção do tecido cariado. Quando o tecido apresentou aspecto endurecido, verificado pela sensibilidade tátil do operador, realizou-se a primeira coleta de uma pequena amostra de dentina afetada por cárie da parede pulpar com uma cureta esterilizada. A quantidade de dentina removida foi padronizada com o auxílio de um calcador ward nº 4 modificado (na ponta ativa foi realizada uma concavidade com broca diamantada esférica em alta rotação).

O tecido removido foi colocado na ponta ativa do calcador ward nº 4 modificado até preencher a concavidade por completo, em seguida transferiu todo o conteúdo para um tubo de ensaio contendo solução salina a 0,9%. Logo após esta fase clínica, as amostras de dentina armazenadas em tubos de ensaio foram encaminhadas para o laboratório. Foram submetidas a 20 segundos de vibração em um sonicador (amplitude 30 e ciclo 0,25) e em seguida foram diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-3} em solução salina estéril a 0,9%. Para o cultivo de Estreptococos do grupo mutans, alíquotas de 25 μ L de cada diluição foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Mitis Salivarius e Bacitracina –

MSB e para o cultivo de Lactobacilo, alíquotas de 25 µL de cada diluição foram inoculadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura Rogosa Agar.

Após a visualização das colônias bacterianas, cerca de 4 colônias com morfologia típica de *Streptococcus mutans* crescidas em diferentes pontos da superfície do meio foram coletadas e transferidas individualmente para outra placa de Petri (dividida em 4 quadrantes, sendo cada colônia espalhada em um quadrante) contendo meio de cultura Ágar Mitis Salivarius e Bacitracina – MSB, e incubadas a 37° C por 24 horas. As colônias de *Lactobacillus species* foram coletadas e transferidas para outra placa contendo Rogosa Agar. Após esse período, o crescimento de cada quadrante da placa foi armazenado em um eppendorf contendo 700 µl de meio - Skim Milk (5g pó/50ml água deionizada; Difco-BD, Sparks, MD, USA), agitado e congelado a temperatura de -20°C.

As amostras bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus species* armazenadas em meio Skim Milk foram transportadas em gelo seco até a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) para que as análises microbiológicas pudessem ser realizadas.

4.2 CONDUTA JUNTO A UNIFAL/MG

Para a realização do estudo solicitou-se o uso das instalações da instituição em especial ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básica. Para dar prosseguimento ao desenvolvimento do presente estudo foi enviado o projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UNIFAL-MG com aprovação de número 878.834 (ANEXO B).

4.3 PROCEDIMENTO MICROBIOLÓGICO

As 37 cepas de *Streptococcus mutans*, 19 cepas de *Lactobacillus species*, cepas padrão de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356 foram semeadas em placas de Petri contendo Agar Mitis Salivarius (MAS) para *Streptococcus mutans* e Agar Rogosa para *Lactobacillus* e incubadas a 37°C em jarras com CO₂ (overnight) por 48 horas (APÊNDICE A). Após este período, as colônias de ambas as cepas foram coletadas e

transferidas individualmente para um tubo contendo 4 mL de caldo BHI, em seguida foram incubadas a 37°C por 48 horas em jarras com CO₂ (overnight) (APÊNDICE B).

Após o crescimento bacteriano, uma alíquota do meio de cultura foi transferida para 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) até conseguir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala de Mc Farland, padronizando desta forma o inóculo para os testes.

4.4 TESTE DE CONTATO DIRETO (TCD)

Foram utilizados para TCD os sistemas adesivos presentes na Tabela 1.

Tabela 1 - Componentes, composições e lote dos sistemas adesivos utilizados no presente estudo. Alfenas/MG, 2016.

Sistemas adesivos	Composição	Empresa/lote
Clearfil SE Bond	Primer: 10-MDP, HEMA, água; Adesivo: TEGDMA, UDMA, GPDM, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilato hidrofóbica, sílica coloidal	Kuraray Medical, Osaka, Japão/lote nº 01241A(Primer) e 018764 (Adesivo)
Clearfil™SE Protect	Primer: MDPB, MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, fotoiniciador, água; Adesivo: MDP, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilato hidrofóbico, fotoiniciador, silano com sílica coloidal, superfície tratada com NaF	Kuraray Medical, Osaka, Japão/lote nº 180021 (Primer) e 3H0018 (Adesivo)
Adper Single Bond 2	Adesivo: dimetacrilatos, HEMA, copolímero de ácido polialcanóico, 5nm silano com sílica coloidal, etanol, água, fotoiniciador	3M ESPE, St Paul, MN, USA/ lote nº N4000367BR ⁴

Fonte: Do autor.⁴

Neste teste, 5 microplacas de 96 poços foram manuseadas em ambiente estéril (capela de fluxo laminar) e receberam em seu fundo chato os sistemas adesivos, os controles e as cepas bacterianas, sendo estas distribuídas conforme a descrição: microplaca 1- cepas 01 a 12;

⁴ 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl; Bis-GMA: bisphenyl A glycidyl methacrylate; GPDM: glycerol phosphate dimethacrylate; HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate; TEGDMA: triethyleneglycol dimethacrylate; UDMA: urethane dimethacrylate; MDPB: methacryloyloxydodecylpyridinium bromide.

microplaca 2 - cepas 13 a 24; microplaca 3- cepas 25 a 37; microplaca 4 - cepas 38 a 50; microplaca 5 - cepas 51 a 55 e as cepas padrão de ambas as espécies (FIGURA 3).

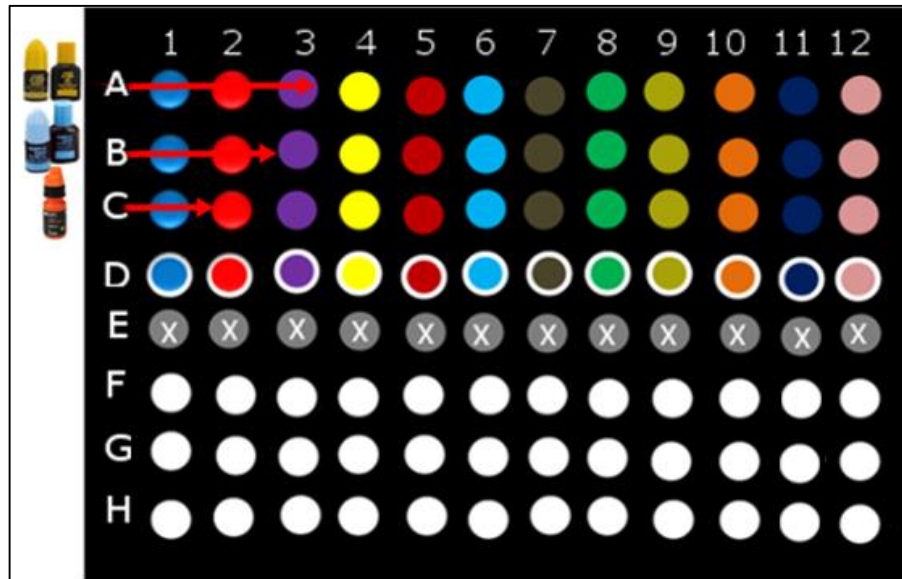


Figura 3 - Distribuição dos sistemas adesivos, controles do meio e cepas bacterianas nas microplacas. Materiais: A1 a A12 - Clearfil SE Bond; B1 a B12 - Clearfil™SE Protect; C1 a C12 - Adper Single Bond 2; D1 a D12 - controle de crescimento (caldo com bactérias, sem os adesivos); E1 a E12 - controle de esterilidade (somente caldo, sem material e bactéria); F1 a F12, G1 a G12 e H1 a H12 - não foram utilizados. Cepas bacterianas: 1A a 1D - cepa 1; 2A a 2D - cepa 2; 3A a 3D - cepa 3; 4A a 4D - cepa 4; 5A a 5D - cepa 5; 6A a 6D - cepa 6; 7A a 7D - cepa 7; 8A a 8D - cepa 8; 9A a 9D - cepa 9; 10A a 10D - cepa 10; 11A a 11D - cepa 11 e 12A a 12D - cepa 12.

Fonte: Do autor

Os sistemas adesivos foram aplicados no fundo do poço com aplicadores descartáveis extra finos (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) seguindo as instruções do fabricante e de acordo com o tempo de fotopolimerização preconizado (Fotopolimerizador Optilight LD MAX da Gnatus).

Todos os poços, conforme o figura 3, receberam 180 μ L de caldo BHI e 10 μ L da suspensão bacteriana preparada de acordo com o descrito no item 4.3. (APÊNDICE C). As placas foram tampadas, colocadas em jarra de CO₂ e incubadas a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação um subcultivo foi realizado para cada cepa bacteriana. Alíquotas de 10 μ L foram retiradas de cada poço e inoculadas em placas Petri contendo agar BHI (FIGURA 4) e após esse processo, foram levadas para incubação com CO₂ por 48 horas a fim de verificar a viabilidade das bactérias, observando a presença ou ausência de colônias bacterianas.



Figura 4 - Distribuição das alíquotas retiradas de cada poço: CSB-Clearfil SE Bond; CSP-Clearfil SE Protect; ASB- Adper Single Bond 2; C- Controle de crescimento; X- Controle de esterilidade.

Fonte: Do autor

4.5 TÉCNICA DE DIFUSÃO EM AGAR

Foi utilizada a técnica de difusão em agar (BAUER et., 1966) para os sistemas adesivos Clearfil SE Bond, Clearfil SE Protect e Adper Single Bond 2 os quais foram colocados sobre discos de papel de filtro estéreis com 5 mm de diâmetro, de acordo com a sequência e tempo de fotopolimerização preconizado pelo fabricante (APÊNDICE D). Além disso, os componentes isolados do Clearfil SE Bond e do Clearfil SE Protect, o primer e o bond, também foram testados (FIGURA 5).

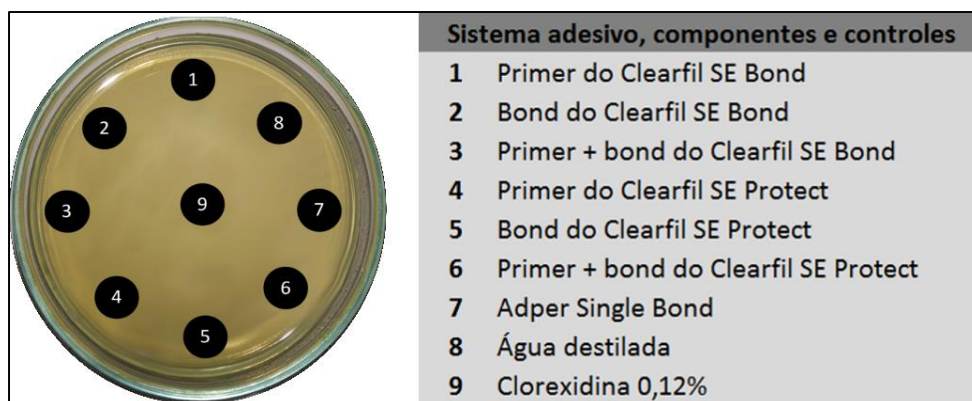


Figura 5 - Disposição dos discos impregnados com os sistemas adesivos, componentes e controles (8 e 9) na placa após a inoculação da cepa bacteriana testada.

Fonte: Do autor

Foram preparadas suspensões bacterianas conforme o item 4.3 e inoculadas em agar BHI com auxílio de “swab” e após secagem do inóculo os discos impregnados com os sistemas adesivos e componentes foram colocados sobre o meio de cultura (APÊNDICE D). Paralelamente foi colocado um disco impregnado com solução de digluconato de clorexidina a 0,12% e outro com água destilada, ambos, respectivamente, usados como controle positivo e negativo (FIGURA 5). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas com CO₂ e após o crescimento bacteriano foi feita a medida dos halos de inibição em volta dos discos utilizando uma régua milimetrada para obtenção dos halos de inibição em volta dos discos contendo adesivos e componentes.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após os testes microbiológicos os dados obtidos foram tabulados no software Excel 2010 por Windows sendo que toda a análise descritiva e não-paramétrica foi realizada no programa BioEstat 5.0 a um nível de significância de 5%. Para avaliação do crescimento bacteriano no subcultivo, dos sistemas adesivos e controles foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis (posições médias das observações de cada grupo – rank médio) seguido do Testes Student-Newman-Keuls. O Teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar a média encontrada para as cepas de *Streptococcus Mutans* com a média obtida para as cepas de *Lactobacillus specie*.

5 RESULTADOS

Com a realização do TCD, obteve-se visualmente para cada cepa a comprovação do crescimento bacteriano (turbacão do meio) e a efetiva esterilidade do meio mostrado pela não turbacão dos poços E1 a 12 (FIGURA 6).

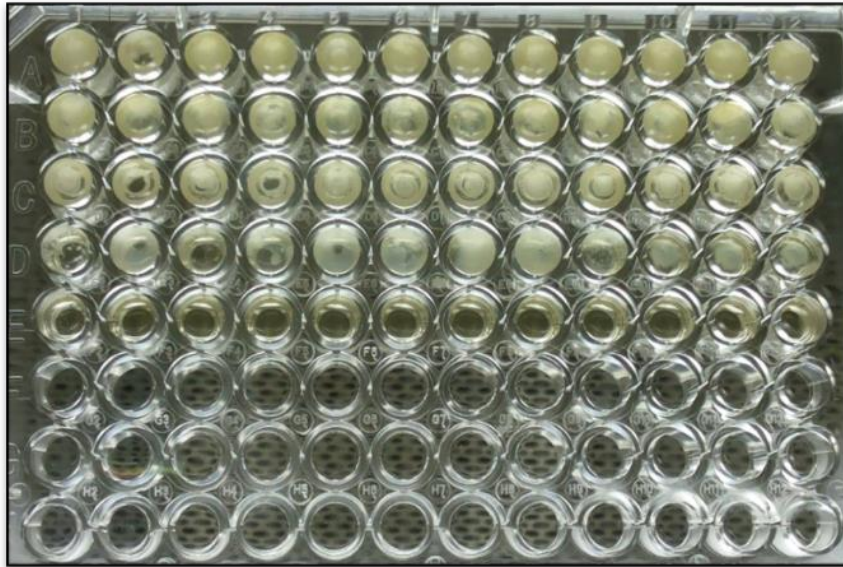


Figura 6 - Aspecto visual de uma microplaca após TCD. Presença de turbacão dos meios nos poços A1 a 12; B1 a 12; C1 a 12; D1 a 12 e ausência de turbacão nos poços E1 a 12.

Fonte: Do autor

Os 57 subcultivos realizados após o TCD evidenciaram que todas as cepas colocadas junto ao Clearfil SE Protect demonstraram ausência de crescimento em meio de cultura agar BHI. No entanto, para o Clearfil SE Bond o crescimento bacteriano esteve presente em 1 cepa de *Lactobacillus* (FIGURA 7) e para o Adper Single Bond 2 houve crescimento bacteriano para 5 cepas de *Lactobacillus* e 2 cepas de *Streptococcus mutans* (FIGURA 7).

A Tabela 2 mostra o rank médio do crescimento bacteriano em subcultivo nos diferentes grupos, sendo observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre o crescimento bacteriano dos subcultivos dos poços que continham os diferentes sistemas adesivos (Clearfil SE Protect versus Adper Single Bond 2: $p= 0,3312$; Clearfil SE Protect versus Clearfil SE Bond: $p= 0,8714$; Clearfil SE Bond versus Adper Single Bond 2: $p=0,4181$) e o controle de esterilidade (Clearfil SE Bond versus Controle de esterilidade: $p=0,8714$;

Clearfil SE Protect versus Controle de esterilidade: $p= 1,00$; Adper Single Bond 2 versus Controle de esterilidade: $p= 0,3312$).

Tabela 2 - Rank médio do crescimento bacteriano em subcultivo de acordo com os grupos testados. Alfenas/MG, 2016.

Grupos	Rank médio	Teste ¹
Controle de crescimento	249,5	a
Adper Single Bond 2	127	b
Clearfil SE Bond	114,5	b
Clearfil SE Protect	112	b
Controle de esterilidade	112	b

¹Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Student-Newman-Keuls a nível de significância de 5%; *Letras diferentes nas colunas são diferentes estatisticamente.

Fonte: Do autor

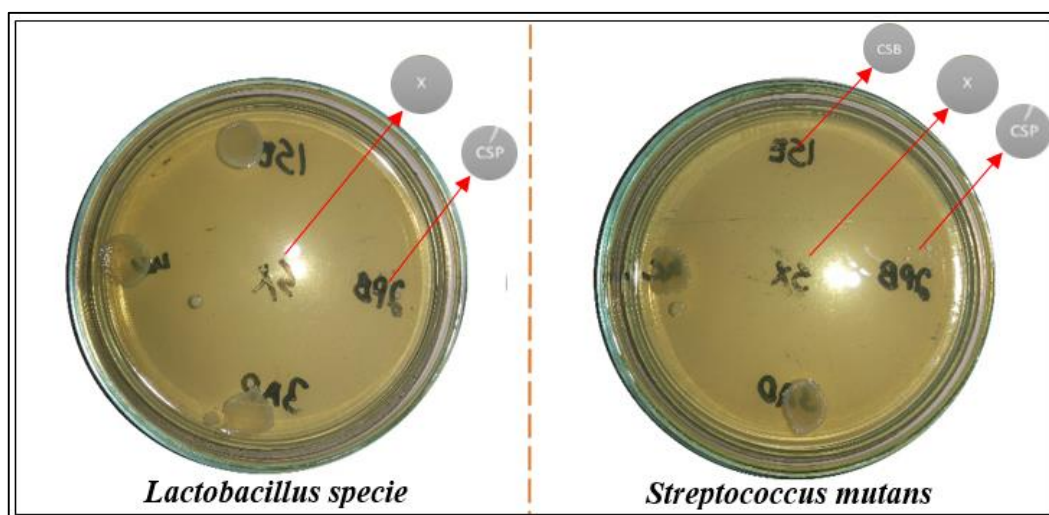


Figura 7 – Representação do subcultivo em agar BHI após TCD. Placa 1 (*Lactobacillus specie*) - ausência de crescimento bacteriano observado no controle de esterilidade (X) e Clearfil SE Protect (CSP); Placa 2 (*Streptococcus mutans*) - ausência de crescimento bacteriano observado no Clearfil SE Bond (CSB), controle de esterilidade (X) e Clearfil SE Protect (CSP).

Fonte: Do autor

Houve a perda de viabilidade de 8 cepas durante a pesquisa e a técnica de difusão em agar foi realizada com 49 cepas, sendo 29 cepas de *Streptococcus mutans* e 20 cepas de *Lactobacillus specie*.

Os resultados da atividade antimicrobiana para a determinação em meio sólido dos halos de inibição dos adesivos e seus componentes sobre diferentes cepas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus specie* estão apresentados na Tabela 3 (Aspecto visual: APÊNDICE E). Neste ensaio, ficou demonstrado que todas as cepas utilizadas foram sensíveis ao Primer do Clearfil SE Protect visto que o valor mínimo do halo de inibição foi de 12 mm, próximo ao encontrado

para a Clorexidina 0,12% (11 mm). Além disso, o mesmo primer diferiu estatisticamente de todos os outros materiais, inclusive a clorexidina, mostrando o maior valor médio do halo que foi de 22 mm. Quanto ao Clearfil SE Protect (primer+bond), este obteve o segundo maior valor médio do halo de inibição (14,59 mm), não diferindo estatisticamente do obtido para a clorexidina 0,12% (16,43 mm), porém, não houve halo de inibição para algumas cepas bacterianas. Ainda na Tabela 3, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,0588$) entre o valor da média dos halos de inibição dos microrganismos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*.

Tabela 3 - Halos de inibição em milímetros em volta dos discos contendo adesivos e componentes sobre diferentes cepas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus specie*. Alfenas/MG, 2016.

Adesivos, componentes isolados e controles	Halos de inibição					
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Teste ¹
Primer Clearfil SE Protect	22,00	22	4,026	12	30	a*
Clorexidina 0,12%	16,43	15	2,993	11	23	b
Clearfil SE Protect	14,59	0	5,168	0	24	b
Adper Single Bond 2	5,73	0	6,522	0	18	c
Clearfil SE bond	3,00	0	6,265	0	24	cd
Primer Clearfil SE bond	2,89	0	5,448	0	21	cd
Bond do Clearfil SE Protect	1,06	0	4,205	0	18	d
Bond do Clearfil SE Bond	0	0	0	0	0	**
Cepas						
<i>Streptococcus Mutans</i>	9,871921	11	9,251885	0	30	$p=0,0588^2$
<i>Lactobacillus specie</i>	8,685714	9	8,874088	0	30	

* $p < 0,0001$. ** Teste não aplicado. Nota: Letras diferentes nas colunas são diferentes estatisticamente e letras iguais não são estatisticamente diferentes. ¹Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Student-Newman-Keuls para o grupo dos adesivos, componentes isolados e controle. ² O Teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar as médias das 29 Cepas de *Streptococcus mutans* com as médias das 20 cepas de *Lactobacillus specie*.

Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

Embora haja uma grande diversidade de bactérias na boca, os *S. mutans* e os *Lactobacillus* são as principais bactérias associadas, respectivamente, com o desenvolvimento e progressão da cárie dentária, tanto primária quanto secundária (KURAMITSU; WANG, 2006; NISHIKAWARA et al., 2007; SVANBERG; MJOR; ORSTAVIK, 1990).

Outras bactérias estão ligadas a doença cárie, no entanto, os *S. mutans* e *Lactobacillus* são considerados os microrganismos com maior poder cariogênico, em virtude da elevada capacidade acidogênica (BEIGHTON et al., 2004; KLEINBERG, 2002; LEITES et al., 2006; ROETERS et al., 1995; THIBODEAU; O'SULLIVAN, 1996) e, principalmente, os *S. mutans*, devido a capacidade de expressar genes de virulência, os quais influenciam em seu crescimento e na aderência a superfície dos dentes (BANAS; VICKERMAN, 2003; HOSHINO; FUJIWARA; KAWABATA, 2012; LYNCH et al., 2007; MATSUMOTO-NAKANO; FUJITA; OOSHIMA, 2006). Pesquisas salientam que os *Lactobacillus* exibem certos traços cariogênicos, tais como o alto potencial acidogênico, libertando grandes quantidades de ácido láctico, diminuindo o pH do meio e inibindo o crescimento de organismos menos ácido tolerantes (COTTER; HILL, 2003; BYUN et al., 2004; YANG et al., 2010).

Apesar de todo o conhecimento sobre as bactérias cariogênicas é importante entender que a distribuição dessas espécies se mostra relativamente constante nas diferentes sociedades ao redor do mundo, sendo necessário estar atento, durante o tratamento, as particularidades encontradas em diferentes etnias, grupos socioeconômicos, dietas, experiências passadas de cárie e hábitos (HAFFAJEE et al., 2004; HERRERA et al., 2008; LAFAURIE et al., 2007; VADIAKAS, 2008). De acordo com Byun et al. (2004) é possível visualizar também uma variabilidade de espécies, por exemplo, no caso de *Lactobacillus* presentes nas lesões de cárie, cada amostra (dentina cariada de um dente) houve a identificação de até 9 espécies ou filotipos diferentes (*L. gasseris*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. crispatus* e outros).

Alguns estudos relacionadas ao tratamento da cárie tem destacado a capacidade terapêutica dos materiais restauradores na eliminação das bactérias cariogênicas (DIEDRICH, 2015; DA SILVA et al., 2010; ESTEVES; REIS; RODRIGUES, 2010; GIAMMANCO et al., 2009; GRANDE, 2008; KAWAI; TSUCHITANI, 2000; MEHDAWI et al., 2009; MENEZES; SANTOS; PEIXOTO, 2012; RODRIGUES et al., 2005; SACRAMENTO et al., 2008; THOMÉ, 2009; SAMPATH; HEGDE; HEGDE, 2011; SHAFIEI; MEMARPOUR, 2012; STANISLAWCZUK, 2008; WALTER et al., 2007; XIAO et al., 2009). Nesse sentido, a

avaliação da capacidade antimicrobiana de sistemas adesivos diretamente sobre microrganismos de lesões de cárie de dentina de diferentes dentes decíduos *in vivo* é muito relevante, pois o interessante é que o material que tenha capacidade antimicrobiana não seja seletivo apenas para algumas populações de *S. mutans* e *Lactobacillus*, mas que tenha ação sobre todas as populações dessas espécies, independente do dente e do indivíduo.

Inicialmente, realizou-se o TCD, o qual simula o efeito do contato direto e estreito entre o microrganismo e materiais a serem testados, independentemente da sua solubilidade e da difusibilidade de componentes para a área circundante (SAMPATH; HEGDE; HEGDE, 2011). O teste foi importante, pois mensurou a cinética de crescimento bacteriano por meio da qual pôde ser verificado o efeito dos materiais pelos meios visuais (MAZUREK et al., 2012). No entanto, a fim de evitar uma possível contaminação das placas de titulação contendo as cepas, devido ao descolamento dos sistemas adesivos da parede lateral da microplaca e, em virtude da turvação inicial provocada pela reação do meio de cultura (Caldo BHI) com o sistema adesivo CSB e CPB, a leitura em espectrofotômetro não foi realizada no TCD. Optou-se pelo Método de subcultivo (passagem de colônias para meios estéreis), o qual confirmou e demonstrou visualmente o que houve no contato estreito e direto entre sistemas adesivos e bactérias (TCD). Tal metodologia é a mais simples para se obter a viabilidade em curto prazo de organismos e é a mais frequentemente utilizada em bactérias (INFORMATIVO CEFAR DE MICROBIOLOGIA, 2006).

Considerando o TCD-Subcultivo, não houve diferença na redução da concentração bacteriana após o contato com os diferentes sistemas adesivos testados, tanto para *S. mutans* quanto para *Lactobacillus sp.* O tempo de contato do sistema adesivo com o meio contendo bactérias pode ter influenciado o resultado. Se o TCD fosse prolongado por mais de 48 horas, como no estudo de Feuerstein et al. (2007) em que o CSP manteve sua propriedade antibacteriana até 7 dias, talvez diferenças na redução dos microrganismos seriam visíveis. O mesmo poderia acontecer se o subcultivo fosse realizado aos 60 minutos do TCD como mostra o estudo de Banzi et al. (2014) em que a diferença na redução bacteriana entre os sistemas adesivos foi registrada até 60 minutos e ao longo das 48 horas não permaneceu.

Esse comportamento variado da capacidade antimicrobiana dos diferentes sistemas adesivos com relação ao tempo de aplicação tanto nas primeiras horas quanto após uma semana pode ser justificado considerando a composição e acidez desses sistemas (KARANIKAKOUMA et al., 2001). Os monômeros que promovem aderência são considerados como um dos elementos relevantes do efeito antibacteriano dos iniciadores ou soluções dos adesivos, uma vez que eles conferem propriedades ácidas devido à fosfórico, carboxílico ou porções

acrílicas nas moléculas (PENMETSA et al., 2014), o que pode comprovar a capacidade antimicrobiana dos sistemas adesivos CSB e ASB. Com relação ao CSP, a ação do antimicrobiano MDPB no TCD pode ser demonstrada quando o tempo de avaliação da capacidade antimicrobiana for estendido, ou seja, quando os componentes e a acidez dos outros sistemas adesivos forem decompostos ao longo do tempo (baixa atividade antimicrobiana). Infelizmente neste estudo o tempo não foi suficiente para verificar o potencial do CSP contendo MDPB.

Diante do resultado obtido do TCD, realizou-se a técnica de difusão em agar para verificar a ação de cada componente na atividade antibacteriana, sendo considerada padrão, de fácil execução, simples, prática e possível de comparação com outros estudos (ESTEVES; REIS; RODRIGUES, 2010). Porém a técnica apresenta algumas limitações, pois mede apenas os componentes que são solúveis em água, isto é, as propriedades inibidoras do material sólido colocado na superfícies de agar depende da hidrofília deste, do seu coeficiente de difusão em gel de agar, bem como da sua capacidade em molhar a superfície do ágar (PINTO et al., 2003; PRATI et al., 1993). Consequentemente, materiais que difundem mais facilmente, para além do seu efeito inibitório direto, proporcionam zonas de inibição maiores (PINTO et al., 2003; PRATI et al., 1993).

A partir desta técnica pode-se evidenciar que o primer do CSP exibiu atividade antibacteriana superior aos outros componentes (isolados e/ou juntos), inclusive a clorexidina (controle positivo). Acredita-se que este efeito se deva ao monômero MDPB presente no primer do CSP, o qual agiu contra as diferentes cepas bacterianas ácido-tolerantes avaliadas neste estudo.

A fim de explicar a real contribuição do MDPB, Imazato et al. (2006) comparou o potencial antibacteriano do CSP com este monômero e do mesmo após a remoção do MDPB. Observaram que na sua ausência, o primer não exerceu efeito antibacteriano contra *S. mutans* e *Lactobacillus*, demonstrando assim que o efeito antibacteriano do CSP não dependia somente da acidez do material, mas, principalmente, da presença do monômero antibacteriano MDPB.

Guerra et al. (2014) realizou ensaios microbiológicos sobre o CSP, encontrando que o componente primer deste adesivo supera a clorexidina em relação aos halos inibitórios. No entanto, neste estudo quando se avaliou os sistema adesivo CSP (primer e bond juntos), este apresentou efeito inibitório inferior a clorexidina, o mesmo foi encontrado por Poggio et al. (2012). Esse resultado pode ser explicado pela fato da clorexidina possuir taxas de difusão maiores que o primer (Guerra et al. (2014), entretanto, Turkun et al. (2006) ao comparar o CSP com a clorexidina, cloreto e peróxido de hidrogênio, encontrou por meio da mesma técnica uma

maior eficiência do CSP (ESTEVEES; REIS; RODRIGUES, 2010). Apesar destes resultados encontrados na literatura, no presente estudo a clorexidina e CSP são estatisticamente semelhantes.

Martins (2014) traz uma explicação plausível para a semelhança no efeito antimicrobiano de CSP e Clorexidina. De acordo com o autor ambos possuem princípio antibacteriano semelhante, isto é, o MDPB presente no CSP é bactericida antes de polimerizar e, após polimerização, têm um efeito bacteriostático por contato; a clorexidina tem atividade antibacteriana de largo espectro em elevadas concentrações e bacteriostática em baixas concentrações. Além da sua capacidade antimicrobiana, a clorexidina é um forte inibidor das MMPs e tal como esta molécula, o MDPB demonstra capacidade de inibir as MMPs, responsáveis pela degradação da matriz de colágeno.

Dos três sistemas adesivos avaliados nesta pesquisa o CSP (primer e bond juntos) apresentou os maiores halos inibitórios, sendo este efeito antimicrobiano encontrado por outros autores (FEUERSTEIN et al., 2007; IMAZATO, S. et al., 1997; IMAZATO, S. et al., 1998; IMAZATO, 2003; LOBO et al., 2005; SAMPATH; HEGDE; HEGDE, 2011; SCHMALZ; ERGUCU; HILLER, 2004; TÜRKÜN et al. 2004).

No entanto, o Adper Single Bond 2 pela difusão em agar apresentou uma atividade antibacteriana inferior ao CSP, mas superior ao CSB. Este adesivo possui sílica coloidal e HEMA como compostos em comum ao CSB e CSP, é comercializado em frasco único (5º geração de sistemas adesivos fabricados ou agentes de união dentinária convencionais), no qual está presente o primer e bond; não possui agente antimicrobiano em sua composição como ocorre no CSP (CARVALHO et al. 2004; MAZUREK et al., 2012). No entanto, é disponível no mercado nacional em maior escala, com custo reduzido, têm mostrado melhor desempenho e maior credibilidade a longo prazo em relação aos sistemas adesivos autocondicionantes (6º geração: CSP e CSB), por isso, sendo amplamente utilizado no setor público do país (CARVALHO et al. 2004; MAZUREK et al., 2012).

Esteves, Reis e Rodrigues (2010) compararam o controle positivo clorexidina com o ácido fosfórico a 37%, que de acordo com os autores representava os sistemas adesivos convencionais, e verificou que não houve diferenças significativas na inibição do crescimento bacteriano. Os resultados destes autores também reforçam a ideia de que o baixo pH pode inibir a atividade bacteriana, sendo assim, é necessário estar atento ao uso do Adper Single Bond 2 e análogos quanto ao tratamento restaurador, pois como já mencionado, este adesivo apresentou eficiência frente as diferentes cepas, embora possua um pH de 3,5. Logo, *Streptococcus* e *Lactobacillus* podem produzir ácido e sobreviverem nos ambientes de pH

proporcionado por estes adesivos (ABRANCHES et al., 2006; BANAS, 2004; BOWEN; KOO, 2011; GONDIM et al., 2006; HARPER; LOESCHE, 1984; KLEIN et al., 2009; LEMOS et al., 2010; SVENSÄTER et al., 1997).

A utilização do Adper Single Bond 2 deve ser muito bem avaliada, pois ao invés de exibirem efeito antibacteriano, podem estimular o desenvolvimento de cepas bacterianas mais resistentes, dificultando sua eliminação (SAMPATH; HEGDE; HEGDE, 2011). Bactérias acidúricas quando submetidas a choques ácidos desenvolvem mecanismos de adaptação por meio de síntese protéica, aumentando assim sua resistência e tempo de sobrevivência (ABRANCHES et al., 2006; BANAS, 2004; BOWEN; KOO, 2011; GONDIM et al., 2006; HARPER; LOESCHE, 1984; KLEIN et al., 2009; LEMOS et al., 2010; SVENSÄTER et al., 1997).

Quando o CSB foi avaliado, este apresentou estatisticamente o mesmo efeito antimicrobiano que o Adper Single Bond 2, porém um efeito inibitório baixo quando comparado ao CSP. Başeren et al. (2005), Kidd, Joyston-Bechal, Beighton (1993) e Mjor (2005) salientam que o componente primer do CSB não apresenta efeito antibacteriano contra cepas bacterianas. Rolland et al. (2011) afirmam que o primer do CSB exibe propriedades antimicrobianas inferiores ao primer do CSP, particularmente contra estreptococos. A explicação para esta diferença antibacteriana parece estar relacionada a presença do MDPB no primer do CSP.

Em relação ao componente bond do CSP, este apresentou efeito inibitório somente para três cepas e o bond do CSB não apresentou nenhum efeito inibitório. De acordo com Gondim et al. (2008) e Cehreli et al. (2003) o bond destes agentes de união não apresentam efeito inibitório sobre *S. mutans* e *L. acidophilus*.

Estatisticamente o comportamento ou a sensibilidade de uma espécie foi considerado igual ao da outra. Imazato et al. (2006) testaram o efeito antibacteriano do CSP contendo 5% de MDPB contra *S. mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii* e encontraram que apenas o primer com MDPB foi capaz de eliminar quase todas as bactérias inoculadas nos blocos de dentina e que as zonas de inibição produzidas pelo primer com MDPB foram significativamente maiores para as três bactérias testadas, quando comparadas ao produto sem o agente antibacteriano. Em pesquisa anterior Imazato et al. (2001) havia afirmado ao descrever seu estudo que o adesivo CSP possui ação antibacteriana contra uma variedade de lactobacilos, estreptococos e bactérias a partir de cáries, mas que era menor a sensibilidade dos lactobacilos aos efeitos bactericidas do CSP quando comparada aos estreptococos.

Ozer et al. (2003), Schmalz et al. (2004) demonstraram que a presença do MDPB é efetiva contra uma gama de bactérias intra-bucais, no entanto, não especificaram se houve uma menor sensibilidade de uma espécie com relação a outra. Yoshikawa et al. (2007) avaliaram a habilidade do MDPB em inibir o crescimento de microrganismos associados a lesões ativas de cárie e demonstraram que todos os isolados de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus specie*, entre outras bactérias cariogênicas, foram sensíveis à inibição pelo MDPB.

Com relação aos sistemas adesivos que não possuem antimicrobiano, Herrera et al. (2000a) compararam a efetividade destes em isolados de cavidades de cárie de diferentes indivíduos e salientam que a ação é dependente da composição de cada produto. Herrera et al. (2000b) em outro estudo também testaram a efetividade antibacteriana de sistemas adesivos, porém, os inóculos foram preparados a partir de cepas de referência adquiridas em laboratórios de coleções de cultura. Novamente encontraram que o efeito antibacteriano apresentou-se dependente do material e com resultados similares aos obtidos em estudos anteriores. No entanto, apesar dos sistemas adesivos terem sido diferentes aos do presente trabalho, os pesquisadores trazem a ideia do efeito antimicrobiano sobre diferentes cepas. Os autores encontraram que o mesmo sistema adesivo que agiu em *S mutans* também agiu em *Lactobacillus species*, e aquele que não agia em uma espécie também não agia na outra, sendo que este efeito ocorria até mesmo dentro da própria cepa.

Não há dúvidas de que a propriedade antibacteriana de adesivos dentinários depende dos componentes que foram originalmente incorporadas para promover a adesão (SCHMALZ et al.; 2004). De acordo com Fecury et. al. (2007) existe uma grande variedade de sistemas adesivos disponíveis comercialmente, o que dificulta a seleção do material mais adequado a ser utilizado na clínica. Os autores salientam que é impossível destacar aquele que apresente maior eficácia em todas as situações, pois são materiais totalmente diferentes um do outro.

O que tem sido estabelecido é que os sistemas adesivos podem contribuir para a eliminação imediata das bactérias residuais nas paredes cavitárias, porém os sistemas adesivos perdem as propriedades antibacterianas no prazo de 14 dias, ou seja, eles não fornecem uma solução para a invasão bacteriana ao longo da microinfiltração marginal das restaurações adesivas (FEUERSTEIN et al., 2007) e nenhum deles é totalmente eficiente na eliminação de bactérias residuais presentes no interior dos túbulos (ESPEJO, 2008; WALTER et al., 2007).

Ressalta-se ainda que, na situação clínica, os sistemas adesivos dentinários são aplicados sobre a superfície da dentina com o objetivo de promover a adesão entre esse substrato e o material restaurador, e para que eles atuem inibindo os microrganismos que permanecem no interior dos túbulos dentinários precisam apresentar capacidade de difundir em alguma extensão

através da dentina (SCHMALZ; ERGUCU; HILLER, 2004). Além disso outra limitação encontrada neste tipo de estudo é que o efeito in vitro pode não ser o mesmo apresentado in vivo, pois as bactérias são mais susceptíveis a agentes antibacterianos quando estão em meios de cultura do que quando estão crescendo na forma de biofilme sobre a superfície dental (ESTEVES; REIS; RODRIGUES, 2010; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2000). Outras limitações fizeram parte deste estudo, dentre elas a variabilidade das bactérias, dificuldade de proporcionar um ambiente próximo ao encontrado in vivo, quantidade de adesivo colocada no poço.

Ademais, a utilização de sistemas adesivos com antimicrobiano em sua composição demonstra um avanço científico que, contudo necessita de maiores comprovações in vivo, principalmente em decorrência das necessidades clínicas individuais de cada indivíduo.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados neste estudo pode-se concluir que:

- a) Com relação ao Teste de Contato Direto-Subcultivo:
 - ✓ Todos os sistemas adesivos testados apresentaram capacidade antimicrobiana sobre as diferentes cepas, independente das características específicas de cada dente e indivíduo.

- b) Com relação a Técnica de difusão em agar-Halos inibitórios:
 - ✓ O Clearfil SE Protect promoveu a maior atividade inibitória sobre as diferentes cepas avaliadas, sendo esta atividade atribuída ao primer, componente que contém o agente antibacteriano MDPB;
 - ✓ Após a fotopolimerização o Clearfil SE Protect apresentou resultados estatisticamente semelhantes a clorexidina 0,12% e superiores ao Clearfil SE Bond e Adper Single Bond 2.
 - ✓ Com relação ao Clearfil SE Bond e Adper Single Bond 2, pode-se considerar que houve uma atividade antimicrobiana baixa, pois durante o registro dos halos inibitórios estes adesivos apresentaram as menores médias. Talvez isso se deva a baixa difusibilidade destes componentes em agar BHI.
 - ✓ *Streptococcus Mutans* e *Lactobacillus specie* apresentaram estatisticamente semelhante sensibilidade frente aos adesivos testados, o que independeu do dente, do indivíduo e do tipo de sistema adesivo.

REFERÊNCIAS

AAS, Jørn A. et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1407-17, 2008.

ABIDO, R. **Efeito da clorexidina na camada híbrida dentinária**. Tese (Monografia apresentada à unidade de Pós-graduação da Faculdade Ingá – UNINGÁ – Passo Fundo-RS como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Dentística). Passo Fundo. 2011.

ABRANCHES, J.; CANDELLA, M. M.; WEN, Z. T.; BAKER, H. V.; BURNE, R. A. Different roles of EIIABMan and EIIGlc in regulation of energy metabolism, biofilm development, and competence in *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 3748-56, 2006.

ALALUUSUA, S. et al. Slide-scoring method for estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **European Journal of Oral Sciences**, v. 92, n. 2, p. 127-33, 1984.

ALALUUSUA, S. et al. Prevalence of caries and salivary levels of mutans streptococcus in 5-year-old children in relation to duration of breast feeding. **European Journal of Oral Sciences**, v. 98, n.3, p. 193-6, 1990.

ALMAS, K.; AL-SANAWI, E.; AL-SHAHRANI, B. The effect of tongue scraper on mutans streptococci and lactobacilli in patients with caries and periodontal disease. **Odonto-Stomatologie Tropicale= Tropical Dental Journal**, v. 28, n. 109, p. 5-10, 2005.

AMBIKATHANAYA, U. K. et al. Effect of self-etch and total-etch adhesive systems on *Streptococcus mutans*-an in vitro study. **Indian Journal of Dental Sciences**, v. 5, n. 4, p.64-8, 2013.

BADET, C.; THEBAUD, N. B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. **The Open Microbiology Journal**, v. 2, p. 38, 2008.

BADET, M. C.; RICHARD, B.; DORIGNAC, G. An in vitro study of the pH-lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1015-1018, 2001.

BALAKRISHNAN, M. et al. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 941-48, 2002.

BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 2, p. 89-99, 2003.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Biosciences.**, v. 9, p. 1267-77, 2004.

BANZI, É.C.F et al. Inhibitory effects of a cured antibacterial bonding system on viability and metabolic activity of oral bacteria. **Dental Materials**, v. 30, n. 9, p. 238-44, 2014.

BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia Restauradora. Fundamentos e Possibilidades**, 1. ed., São Paulo: Santos, 2002, 739p.

BAŞEREN, M. et al. Antibacterial activity of different generation dentin-bonding systems. **Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)**, v. 36, n. 5, p. 339-44, 2005.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BEIGHTON, D. et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. **Community Dental Health**, v. 21, n. 1, p. 96-101, 2004.

BERGENHOLTZ, G. et al. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 11, n. 6, p. 439-50, 1982.

BORGSTRÖM, M.K. et al. On the pH-lowering potential of lactobacilli and mutans streptococci from dental plaque related to the prevalence of caries. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 25, n. 2, p. 165-69, 1997.

BOCANGEL, J. S. et al. Influence of disinfectant solutions on the tensile bond strength of a fourth generation dentin bonding agent. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 107-11, 2000.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, v.45, n. 1, p. 69-86, 2011.

BRACKETT, W. W. et al. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. **Operative dentistry**, v. 32, n. 2, p. 107-11, 2007.

BRAGA, M. M.; GIMENEZ, T. ; MENDES, F. M. ; EKSTRAND, K.R. . O uso do ICDAS para diagnóstico e planejamento do tratamento da doença cárie. **Pro-Odonto. (Org.). Pro-Odonto Prevenção**. 4 ed. Porto Alegre: Pro, 2012, v. 5, p. 9-56.

BRAMBILLA, E. et al. Caries prevention during pregnancy: results of a 30-months study. **The Journal of the American Dental Association**, v. 129, n.7, p. 871-7, 1998.

BRESCHI, L. et al. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. **Dental Materials**, v. 24, n. 1, p. 90-101, 2008.

BRETZ, W. A. et al. Early detection of mutans streptococci in infants. In: **GENERAL SESSION OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH**, 81, 2003, Goteborg, Suécia. Disponível em: https://iadr.confex.com/iadr/2003Goteborg/techprogram/abstract_37565.htm Acesso em 26 Ago. 2015

BYUN, R. et al. Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3128-36, 2004.

CARVALHO, C. A. T. et al. Estudo comparativo da ação antibacteriana in vitro de materiais restauradores e forradores: cimentos de ionômero de vidro, resinas e compômeros. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 27, n. 1, p. 241-9, 1998.

CARVALHO, R. M. et al. A review of polymerization contraction: The influence of stress development versus stress relief. **Operative Dentistry**, v. 21, n. 1, p. 17-24, 1995.

CARVALHO, R. M. et al. Sistemas adesivos: fundamentos para aplicação clínica. **Revista Biodonto**, v. 2, n. 1, p. 6-86, 2004.

CAUFIELD, P. W., CUTTER, G. R, DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **Journal of Dental Research**, v. 72, n. 1, p. 37-45, 1993.

ÇEHRELI, Z. C. et al. A morphological and micro-tensile bond strength evaluation of a single-bottle adhesive to caries-affected human dentine after four different caries removal techniques. **Journal of Dentistry**, v. 31, n. 6, p. 429-35, 2003.

CEPHAS, K. D. et al. Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. **PloS one**, v. 6, n. 8, p. e23503, 2011. Disponível em <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023503>> Acesso em 01 Set. 2015

CLARKSON, J. J.; HARDWICK, K.; BARMES, D. International collaborative research on fluoride. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 4, p. 893-904, 2000.

CLAVIJO, V. G. R. et al. Restaurações anteriores-bisel: até que ponto sua utilização é viável? **Revistas Dental Press Estética**, v.4, n.3, p. 24-33, 2007.

CORRALO, D. J. **Efeito de materiais forradores sobre o comportamento biológico de dentina cariada e presença bacteriana. Análise clínica e ultraestrutural**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia.

COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 429-53, 2003.

DELFINO, C.S.; ANDRADE, L.E.H.; SOUZA, F.B.; OLIVEIRA, O.B. Inibições de lesões de cárie secundária ao redor dos materiais restauradores - Avaliação in vitro. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 54, n. 1, p. 17-20, 2006.

DA SILVA, B. M. et al. In situ anticariogenic effect of adhesive systems containing fluoride and MDPB. **American Journal of Dentistry**, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2010.

DE QUEIROZ MOTA, L.; DE SOUSA LEITE, J. M.; TARGINO, A. G. R. Dentística Minimamente Invasiva Através da Remoção Parcial de Dentina Cariada em Cavidades Profundas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 145-52, 2014.

DIEDRICH, S. M. **Estudo comparativo da microinfiltração marginal e resistência adesiva na utilização de adesivo convencional e adesivo com monômero antibacteriano MDPB (in vitro)**. 2015. 51f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária). Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Porto, 2015.

DURAND, L. B.; MONTEIRO JUNIOR, S.; MAIA, H. P. Recontorno Cosmético e Reataurações Adesivas Diretas para Correção de Desarmonias Estéticas. **Clínica International Journal of Brazilian Dentistry**, v. 4, n. 2, p. 154-62, 2008.

EDWARDSSON, S. Bacteriological studys on deep areas of carious dentine. **Odontologisk Revy - Supplement**, v. 25, p.32, 1974.

EMILSON, C. G.; BERGENHOLTZ, G. Antibacterial activity of dentinal bonding agents. **Quintessence international (Berlin, Germany: 1985)**, v. 24, n. 7, p. 511-15, 1993.

ESPEJO, L.C. **Influência de diferentes sistemas adesivos dentários resinosos aplicados em dentina humana frente a um desafio cariogênico bacteriano, in vitro**. 2008. 114f. Dissertação (Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Dentística). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo,2008.

EMPRESA 3M ESPE. 3M News. [Catálogo de Adper Easy One]. 2010. Disponível em: <<http://multimedia.3m.com/mws/media/633411O/catalogo-adper-easy-one.pdf> >. Acesso em: 26 nov. 2015.

ESTEVES, C. M.; REIS, A. F.; RODRIGUES, J. A. Atividade antibacteriana de sistemas adesivos autocondicionantes. **Revista Saúde-UnG**, v. 4, n. 1, p. 10-7, 2010.

FELTON, D.; BERGENHOLTZ, G.; COX, C. F. Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 3, p. 491-95, 1989.

FECURY, M. C. V. et al. Sistemas adesivos atuais: características físico-químicas e aplicabilidade em Odontopediatria. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**, p. 144-154, 2007.

FERREIRA-NÓBILO, N. P.; SOUSA, M. L. R.; CURY, J. A. Conceptualization of dental caries by undergraduate dental students from the first to the last year. **Brazilian dental journal**, v. 25, n. 1, p. 59-52, 2014.

FEUERSTEIN, O. et al. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, n. 3, p. 349-54, 2007.

FITZGERALD, R. J. et al. Cariogenicity of human plaque lactobacilli in gnotobiotic Rats. **Journal of Dental Research**, v. 60, n.5 p. 919-26, 1981.

FRENCKEN, J. E.; HOLMGREN, C. J. **Tratamento restaurador atraumático (ART) para a cárie dentária**. Santos, 2001.

FONSECA, A.S. **Odontologia Estética – a arte da perfeição**. In: FRANCCI, C.E., et al. Adesão. 1 ed. São Paulo: Editora Artes Médicas – divisão odontológica, 2008.

FUJIWARA, T. et al. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2 year-old children of Japan. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 19, n. 3, p. 151-4, 1991.

FURE, S.; EMILSON, C. G. Effect of chlorhexidine gel treatment supplemented with chlorhexidine varnish and resin on mutans streptococci and Actinomyces on root surfaces. **Caries Research**, v. 24, n. 4, p. 242-7, 1990.

GALLER, K. et al. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 5, p. 396-9, 2005.

GARBEROGLIO, R.; BRÄNNSTRÖM, M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. **Archives of Oral Biology**, v. 21, n. 6, p. 355-62, 1976.

GIAMMANCO, G. M. et al. In vitro evaluation of the antibacterial activity of cured dentin/enamel adhesive incorporating the antimicrobial agent MDPB. **The New Microbiologica**, v. 32, n. 4, p. 385, 2009.

GRANDE, R. S. **Avaliação da aplicação da clorexidina na restistência de união de sistemas adesivos convencionais**. 2008. 59f. Dissertação. (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Ponta Grossa– Área de Concentração em Dentística Restauradora, Ponta Grossa, 2008.

GROSS, E. L. et al. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. **PLoS One**, v. 7 p:e47722, 2012. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047722> Acesso em 01 Set. 2015.

GONDIM, J. O. et al. Influence of human dentine on the antibacterial activity of self-etching adhesive systems against cariogenic bacteria. **Journal of Dentistry**, v. 36, n. 4, p. 241-48, 2008.

GONDIM, J. O. **Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes sobre bactérias cariogênicas**. 2006. 93 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2006. Disponível em: http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/95492/gondim_jo_me_araf.pdf?sequence=1&isAllowed=y Acesso em 26 Ago. 2015

GORDAN, V. V. et al Evaluation of Acidic Primers in Microleakage of Class 5 Composite Resin Restorations. **Operative Dentistry**, v. 23, n. 23, p. 244-9. 1997.

GUEDES-PINTO, A. C. Odontopediatria. 2.ed. São Paulo: Santos, 2003.

GUERRA, Leticia Cavalcanti Tambani et al. Efeito Antimicrobiano de Sistema Adesivo: Estudo Piloto. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, n. 1, 2014.

GWINNETT, A. J.; YU, S. Effect of long-term water storage on dentin bonding. **American Journal of Dentistry**, v. 8, n. 2, p. 109-11, 1995.

HABIBIAN, M. et al. Relationships between dietary behaviours, oral hygiene and mutans streptococci in dental plaque of a group of infants in southern England. **Archives of Oral Biology**, v. 47, n. 6, p. 491-98, 2002.

HALLER, B.; TROJANSKI, A. Effect of multi-step dentin bonding systems and resin-modified glass ionomer cement liner on marginal quality of dentin-bonded resin composite Class II restorations. **Clinical Oral Investigations**, v. 2, n. 3, p. 130-6, 1998.

HAMADA, S.; OOSHIMA, T. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of Streptococcus mutans. **Journal of Dental research**, v. 54, n. 1, p. 140-45, 1975.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 2, p. 331, 1980.

HARA, A.T. et al. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. **European journal of oral sciences**, v. 113, n. 3, p. 245-50, 2005.

HARPER, D. S.; LOESCHE, Walter J. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 29, n. 10, p. 843-48, 1984.

HAFFAJEE, A. D. et al. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 11, p. 996-1002, 2004.

HERRERA, M. et al. Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer and resin-modified glass ionomer cements and a compomer in contact with dentin caries samples. **Operative Dentistry**, v. 25, n. 4, p. 265-69, 2000a.

HERRERA, M. et al. Antibacterial activity of four dentin bonding systems. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, n. 4, p. 305-9, 2000b.

HERRERA, D. et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 2, p. 106-13, 2008.

HIRAIISHI, N. et al. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. **Dental Materials**, v. 24, n. 10, p. 1391-99, 2008.

HOSHINO, T.; FUJIWARA, T.; KAWABATA, S. Evolution of cariogenic character in *Streptococcus mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. **Scientific reports**, v. 2, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep00518>> Acesso em 01 Set. 2015

HUGHES, C. V. et al. Aciduric microbiota and mutans streptococci in severe and recurrent severe early childhood caries. **Pediatric Dentistry**, v. 34, n. 2, p. 16, 2012.

IMAZATO, S. et al. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 8, p. 1437-43, 1994.

IMAZATO, S. et al. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. **Journal of Dental Research**, v. 76, n. 3, p. 768-72, 1997.

IMAZATO, S. et al. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. **Journal of Dentistry**, v. 26, n. 3, p. 267-71, 1998.

IMAZATO, S.; IMAI, T.; EBISU, S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. **American Journal of Dentistry**, v. 11, n. 3, p. 106-8, 1998.

IMAZATO, S. et al. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. **Biomaterials**, v. 20, n. 9, p. 899-903, 1999.

IMAZATO, S. et al. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 28, n. 4, p. 314-19, 2001.

IMAZATO, S. et al. Comparison of antibacterial activity of simplified adhesive systems. **American journal of dentistry**, v. 15, n. 6, p. 356-60, 2002.

IMAZATO, S. et al. Penetration of an antibacterial dentine-bonding system into demineralized human root dentine in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 110, n. 2, p. 168-74, 2002.

IMAZATO, S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. **Dental Materials**, v. 19, n. 6, p. 449-57, 2003.

IMAZATO, S. et al. In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. **Operative Dentistry**, v. 29, n. 4, p. 369-75, 2004.

IMAZATO, S. et al. In vitro antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil SE Protect. **Dental Materials**, v. 22, n. 6, p. 527-32, 2006.

IMAZATO, S. et al. Determination of bactericidal activity of antibacterial monomer MDPB by a viability staining method. **Dental Materials Journal**, v. 27, n. 1, p. 145-48, 2008.

IMAZATO, S.; IMAI, T.; EBISU, S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. **American journal of dentistry**, v. 11, n. 3, p. 106-8, 1998.

IMAZATO, S.; MCCABE, J. F. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 10, p. 1641-45, 1994.

IMPARATO, J. C. P. **Especialistas defendem conceito de Odontologia Minimamente invasiva no tratamento por lesão de cárie**. APCD Jornal, São Paulo, 01 jul. 2010.

Disponível em:

<http://www.fo.usp.br/wp-content/uploads/Especialistas-defendem-o-conceito-de-Odontologia-mimimamente-invasiva.pdf> Acesso em 18 Ago. 2015

INFORMATIVO CEFAR DE MICROBIOLOGIA. Identificação de microrganismos. Ano III Ed.18, nov./dez. 2006. Disponível em http://www.cefarc.com.br/dyn_images/jornal58edfinal.pdf Acesso em 05 nov. 2015.

IOST, H. I. et al. Dureza e contaminação bacteriana da dentina após remoção da lesão de cárie. **Revista ABO Nacional**, v. 3, n. 1, p. 25-9, 1995.

ITOTA, T. et al. Inhibition of artificial secondary caries by fluoride-releasing adhesives on root dentin. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, n. 6, p. 523-27, 2002.

ITOTA, T. et al. Effect of fluoride-releasing adhesive system on decalcified dentin. **Journal of oral rehabilitation**, v. 30, n. 2, p. 178-83, 2003.

ITTHAGARUN, A. et al. The effect of fluoridated and non-fluoridated rewetting agents on in vitro recurrent caries. **Journal of Dentistry**, v. 29, n. 4, p. 255-73, 2001.

JEDRYCHOWSKI, J. R.; CAPUTO, A. A.; KERPER, S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. **Journal of oral rehabilitation**, v. 10, n. 5, p. 373-81, 1983.

JENSEN, Ø. E.; HANDELMAN, S. L. Effect of an autopolymerizing sealant on viability of microflora in occlusal dental caries. **European Journal of Oral Sciences**, v. 88, n. 5, p. 382-8, 1980.

JIANG, W.; ZHANG, J.; CHEN, H. Pyrosequencing analysis of oral microbiota in children with severe early childhood dental caries. **Current Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 537-42, 2013.

JÚNIOR, H. P. L. et al. Flúor: cáries, densidademineral óssea e fraturas. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 14, n. 2, 2009.

KAMIYA, R. U.; TAIETE, T.; GONÇALVES, R. B. Mutacins of *Streptococcus mutans*. **Brazilian Journal of Microbiolog**, v. 42, p. 1248-58, 2011.

KANASI, E. et al. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. **Caries Research**, v. 44, n. 5, p. 485-97, 2010.

KARANIKAKOUMA, A. et al. Antibacterial properties of dentin bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resins. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 28, n. 2, p. 157-60, 2001.

KAWAI, K.; TSUCHITANI, Y. Effects of resin composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 1, p. 123-27, 2000.

KERBER, L. J.; DONLY, K. J. Caries inhibition by fluoride-releasing primers. **American Journal of Dentistry**, v. 6, n. 5, p. 216-18, 1993.

KEYES, P. H. Recent advances in dental research. bacteriology. **International Dental Journal**, v. 12, n. 4, p. 443-64, 1962.

KIDD, E. A. M.; JOYSTON-BECHAL, S.; BEIGHTON, D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. **Caries Research**, v. 27, n. 5, p. 402-8, 1993.

KIDD, E. A.; JOYSTON-BECHAL, S.; BEIGHTON, D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. **British Dental Journal**, v. 174, n. 7, p. 245-48, 1993.

KLEIN, M. I.; DUARTE, S.; XIAO, J.; MITRA, S.; FOSTER, T. H.; KOO, H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 837-41, 2009.

KLEINBERG, I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 108-25, 2002.

KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 3, n. 1, p. 14-17, 1988.

KRAMER, P. F.; ZELANTE, F.; SIMIONATO, M. R. The immediate and long-term effects of invasive and noninvasive pit and fissure sealing techniques on the microflora in occlusal fissures of human teeth. **Pediatric dentistry**, v. 15, p. 108, 1993.

KRETH, J. et al. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7193-203, 2005.

KURAMITSU, B. Y.; WANG, H. K. Virulence properties of cariogenic bacteria. **BMC Oral Health**, v. 6, n. Suppl 1, p. S11, 2006.

LAFURIE, G. I. et al. Demographic, clinical and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 4, p. 629-639, 2007.

LARMAS, M. Simple tests for caries susceptibility. **International Dental Journal**, v. 35, n. 2, p. 109-17, 1985.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. Aspectos microbiológicos da cárie dental. **Salusvita**, v. 25, n. 2, p. 135-48, 2006.

LEMOS J. A.; ABRANCHES J.; KOO H.; MARQUIS R. E.; BURNE R. A. Protocols to study the physiology of oral biofilms, **Methods in Molecular Biology**, v.666, p. 87-102, 2010.

LIF, H. P. et al. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0128534-e0128534, 2014.

LING, Z. et al. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 3, p. 677-90, 2010.

LINS, S. A. et al. Atividade antimicrobiana de materiais restauradores e selantes. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 53, n. 1, p. 23-6, 2005.

LI, Y. et al. Similarity of bacterial populations in saliva from African-American mother-child dyads. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3082-85, 2007.

LI, Y.; TANNER, A. Effect of antimicrobial intervention on oral microbiota associated with early childhood caries. **Pediatric Dentistry**, v. 37, n. 3, p. 226, 2015.

LI, Y.; WANG, W.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Research**, v. 34, n. 2, p. 123-32, 2000.

LI, Y. et al. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 81-7, 2007.

LLENA-PUY, M. C.; MONTANANA-LLORENS, C.; FORNER-NAVARRO, L. Cariogenic oral flora and its relation to dental caries. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v. 67, n. 1, p. 42-6, 1999.

LOBO, M.M. et al. In vitro evaluation of caries inhibition promoted by self-etching adhesive systems containing antibacterial agents. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 75, n. 1, p. 122-27, 2005.

LOPES, G.C. et al. Dental adhesion: present state of the art and future perspectives. **Quintessence Int.**, v. 33, n. 3, p. 213-24, 2002.

LYNCH, D. J. et al. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, n. 2, p. 158-65, 2007.

LUGLIE, P. F. et al. An in-vivo bacteriological study on the effects of acid etching at the bottom of cavities. **Minerva stomatologica**, v. 47, n. 1-2, p. 19-26, 1997.

LUO, A. H. et al. Microbial profiles in saliva from children with and without caries in mixed dentition. **Oral Diseases**, v. 18, n. 6, p. 595-601, 2012.

MALTZ, M. T. Cariologia. In: TOLEDO, O. A. **Odontopediatria: Fundamentos para a prática clínica**, 2 ed, São Paulo: Premier, 1996, p. 105-133.

MANTZOURANI, M. et al. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. **Caries Research**, v. 43, n. 4, p. 308-13, 2009.

MARSH, P.D. The role of microbiology in models of dental caries. **Advances in Dental Research**, v. 9, n. 3, p. 244-54, 1995.

MARSH, P. D. et al. **Oral microbiology**. Elsevier Health Sciences, 2009. In: PORTERO, P. P. et al. Atividade antimicrobiana de primers e adesivos sobre diferentes microrganismos. **Revista Gestão & Saúde**, v.1, n.2, p.26-31. 2009.

MARTINS, D. O. **Antimicrobianos nos sistemas adesivos**. 2014. 43f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária). Universidade do Porto, Porto, 2014.

MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. **Caries Research**, v. 32, n. 5, p. 319-23, 1998.

MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggest horizontal transmission. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2313-6, 2001.

MATSUMOTO, M.; FUJITA, K.; OOSHIMA, T. Binding of glucan-binding protein C to GTFD- synthesized soluble glucan in sucrose-dependent adhesion of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 1, p. 42-6, 2006.

MAZUREK, C. *et al.* Atividade antimicrobiana de materiais reparadores de uso endodôntico pelos testes de difusão em ágar e por contato direto. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 69, n. 1, p. 25-29, 2012.

MEHDAWI, I. *et al.* Development of remineralizing, antibacterial dental materials. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 7, p. 2525-39, 2009.

MENEZES, D. D. P. B., SANTOS, D. H. F.; PEIXOTO, R. F. Potencial Antibacteriano dos Materiais Restauradores Frente às Bactérias Cariogênicas: uma Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 453-8, 2012.

MEIERS, J. C.; MILLER, G. A. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers, and polyacid-modified composite resins. **Operative Dentistry**, v. 21, p. 257-64, 1996.

MENAKER L. *et al.* **Cáries Dentárias: bases biológicas**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. 461p.

MILGROM, P. *et al.* Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6-to 36-month-old children. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 28, n. 4, p. 295-306, 2000.

MJÖR, I. A. Clinical diagnosis of recurrent caries. **The Journal of the American Dental Association**, v. 136, n. 10, p. 1426-33, 2005.

MONTEIRO VIEIRA, R. *et al.* Avaliação clínica retrospectiva de restaurações cervicais de resina composta. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 18, n. 3, p.335-44, 2014.

MOURA, F. R. R. et al. Three-year clinical performance of composite restorations placed by undergraduate dental students. **Brazilian Dental Journal**, v. 22 n. 2, p. 111-16, 2011.

MUNSON, M. A. et al. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3023-29, 2004.

NGUYEN, T. et al. Genes involved in the repression of mutacin I production in *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 155, n. 2, p. 551-56, 2009.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 265-73, 1982.

NAKAJIMA, N. et al. Bond strengths of single-bottle dentin adhesives to caries-affected dentin. **Operative Dentistry**, v. 25, p. 2-10, 2000.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 265-73, 1982.

NAKABAYASHI, N.; NAKAMURA, M.; YASUDA, N. Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 3, n. 4, p. 133-38, 1991.

NAPIMOGA, M. H. et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 697-703, 2004.

NEWBRUN, E. Preventing dental caries: current and prospectiva strategies. **American Journal of Dentistry**, v.123, n. 5, p. 68-73, 1992.

NICOLAS, G. G.; LAVOIE, M. C.; LAPOINTE, G. Molecular genetics, genomics and biochemistry of mutacins. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 1, n. 2, p. 193-208, 2007.

NISHIKAWARA, F. et al. Evaluation of cariogenic bacteria. **European Journal of Dentistry**, v. 1, n. 1, p. 31-9, 2007.

NOBRE DOS SANTOS, M. et al. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Research**, v. 36, n. 5, p. 347-52, 2002.

OHMORI, K.; MAEDA, N.; KOHNO, A. Evaluation of antibacterial activity of three dentin primers using an in vitro tooth model. **Operative Dentistry**, v. 24, n. 5, p. 279-85, 1998.

OKADA, M. et al. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. **Journal of Medical microbiology**, v. 54, n. 7, p. 661-65, 2005.

OMAR, H. et al. Microtensile bond strength of resin composite bonded to caries-affected dentin with three adhesives. **Operative Dentistry**, v. 32, n. 1, p. 24-30, 2007.

OSTROM, C. A. **Cariologia clínica**. In: MENAKER, L.; MORHART, R. E; NAVIA, J. M. Cáries dentárias bases biológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. Cap.10, p.219-230.

ÖZOK, A. R. et al. Effect of perfusion with water on demineralization of human dentin in vitro. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 11, p. 733-37, 2002.

ÖZER, F. et al. Comparison of antibacterial activity of two dentin bonding systems using agar well technique and tooth cavity model. **Journal of Dentistry**, v. 31, n. 2, p. 111-16, 2003.

ÖZOK, A. R.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. Comparison of the in vitro permeability of human dentine according to the dentinal region and the composition of the simulated dentinal fluid. **Journal of Dentistry**, v. 30, n. 2, p. 107-11, 2002.

PAIVA, E.; FERREIRA, L. P.. Avaliação do risco de cárie em Odontopediatria: A sua utilidade como meio de prevenção. **Acta Pediátrica Portuguesa**, v. 40, n. 2, p. 59-64, 2009.

PARISOTTO, T. M. et al. Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. **Oral Health & Preventive Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 59-70, 2009.

PAPAGIANNIOLIS, L.; KAKABOURA, A.; ELIADES, G. In vivo vs in vitro anticariogenic behavior of glass-ionomer and resin composite restorative materials. **Dental Materials**, v. 18, n. 8, p. 561-69, 2002.

PASHLEY, D. H.; CARVALHO, R. M. Dentine permeability and dentine adhesion. **Journal of Dentistry**, v. 25, n. 5, p. 355-72, 1997.

PASHLEY et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 3, p. 216-21, 2004.

PASHLEY et al. From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. **American Journal of Dentistry**, v. 20, n. 1, p. 7, 2007.

PENMETSA, Rama Krishnam Raju et al. An Invitro Evaluation of Antibacterial Properties of Self Etching Dental Adhesive Systems. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 7, p. ZC01, 2014.

PERIS, A. R. et al. Adhesive systems and secondary caries formation: Assessment of dentin bond strength, caries lesions depth and fluoride release. **Dental Materials**, v. 23, n. 3, p. 308-16, 2007.

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary; OHARA, Mitsuko Taba. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos correlatos e cosméticos**. Atheneu, 2003.

PIRES-DE-SOUZA, F. C. et al. Nova metodologia para análise comparativa da liberação de flúor de cimentos de ionômero de vidro restauradores e compômeros. **Brazilian Dental Science**, v. 10, n. 4, p. 55-60, 2010.

PRATI, C. et al. Antibacterial effectiveness of dentin bonding systems. **Dental Materials**, v. 9, n. 6, p. 338-43, 1993.

POGGIO, C. et al. In vitro antibacterial activity of different self-etch adhesives. **International Journal of Artificial Organs**, v.35, n.10, p.847-53, 2012.

PORTERO, P. P. et al. Atividade antimicrobiana de primers e adesivos sobre diferentes microrganismos. **Revista Gestão & Saúde**, v. 1, n. 2, p. 26-31. 2009.

RADFORD, J. R. et al. Caries-associated micro-organisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. **Journal of Dentistry**, v. 28, n. 5, p. 307-12, 2000.

RAMOS-GOMEZ, F. et al. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 26, n. 2, p. 165-73, 2003.

RODRIGUES, J. A. et al. Visual evaluation of in vitro cariostatic effect of restorative materials associated with dentifrices. **Brazilian Dental Journal**, v. 16, n. 2, p. 112-8, 2005.

ROETERS, F. J. M. et al. Lactobacilli, mutans streptococci and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. **Caries Research**, v. 29, n. 4, p. 272-79, 1995.

ROLLAND, S. L. et al. A randomised trial comparing the antibacterial effects of dentine primers against bacteria in natural root caries. **Caries Research**, v. 45, n. 6, p. 574-580, 2011.

SACRAMENTO, P. A. et al. Propriedades antibacterianas de materiais forradores-revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2008.

SAMPATH, P. B.; HEGDE, M. N.; HEGDE, P. Assessment of antibacterial properties of newer dentin bonding agents: An in vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 2, n. 3, p. 165, 2011.

SHAFIEI, F.; MEMARPOUR, M. Antibacterial activity in adhesive dentistry: A literature review. **General dentistry**, v. 60, n. 6, p. 346-56, 2012.

SANO, H. et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 4, p. 906-11, 1999.

SALONEN, L. et al. Mutans streptococci, oral hygiene, and caries in an adult Swedish population. **Journal of Dental Research**, v. 69, n. 8, p. 1469-75, 1990.

SANT'ANNA, R. G. et al. Cariologia: Diagnóstico, Controle e Tratamento. **Caderno de Odontopediatria**, v. 1, 2001.

SARRETT, D. C. Clinical challenges and the relevance of materials testing for posterior composite restorations. **Dental Materials**, v. 21, n. 1, p. 9-20, 2005.

SAY, E. C. et al. Bonding to sound vs caries-affected dentin using photo-and dual-cure adhesives. **Operative Dentistry**, v. 30, n. 1, p. 90-8, 2005.

SCHMALZ, G.; ERGÜCÜ, Z.; HILLER, K.-A. Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 5, p. 352-58, 2004.

SEPPÄ, L. et al. Invasion of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* in early caries lesions of gnotobiotic rats. **Caries Research**, v. 23, n. 5, p. 371-74, 1989.

SHKLAIR, I. L. et al. *Streptococcus mutans* glucan production and proximal caries activity in rats. **Journal of Dental Research**, v. 58, p. 377, 1979.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology** **2000**, v. 38, n. 1, p. 135-87, 2005.

SODERLING, E. et al. Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of mutans streptococci: 6-year follow-up. **Caries Research**, v. 35, p.173-7, 2001.

STANISLAWCZUK, R. **Avaliação da clorexidina na resistência de união de sistemas adesivos convencionais**. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Dentística Restauradora). Univesidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

SVANBERG, M.; MJÖR, I. A.; ØRSTAVIK, D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. **Journal of Dental Research**, v. 69, n. 3, p. 861-64, 1990.

SVENSÄTER, G. et al. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 12, n. 5, p. 266-73, 1997.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process ecological perspectives. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 3, p. 294-303, 2011.

TANNER, A. C. R. et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. **Journal of dental research**, v. 81, n. 1, p. 53-7, 2002.

TANNER, A. C. R. et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 11, p. 1298-305, 2011.

TANZER, J. M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A. M. The microbiology of primary dental caries in humans. **Journal of Dental Education**, v. 65, n. 10, p. 1028-37, 2001.

TAO, Y. et al. Dynamics of oral microbial community profiling during severe early childhood caries development monitored by PCR-DGGE. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 9, p. 1129-38, 2013.

TAY, F.R. et al. Single-step adhesives are permeable membranes. **Journal of dentistry**, v. 30, n. 7, p. 371-382, 2002.

THIBODEAU, E. A.; O'SULLIVAN, D. M. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 24, n. 3, p. 164-68, 1996.

THIBODEAU, E. A.; O'SULLIVAN, D. M.; TINANOFF, N. Mutans streptococci and caries prevalence in preschool children. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 21, n. 5, p. 288-91, 1993.

THOMÉ, T. **Análise in vitro do efeito inibitório de restaurações contendo o monômero antibacteriano mdpb na progressão de cáries secundárias em raízes dentárias**. 2009. 114f. Tese Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2009.

THOMPSON, V. et al. Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal: a critical review. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, n. 6, p. 705- 12, 2008.

THORILD, I.; LINDAU-JONSON, B.; TWETMAN, S. Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mothers and in their preschool children. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.12, p.2-7, 2002.

TURKUN, M. et al. Is an antibacterial adhesive system more effective than cavity disinfectants?. **American Journal of Dentistry**, v. 19, n. 3, p. 166, 2006.

TÜRKÜN, L. S. et al. Antibacterial activity of two adhesive systems using various microbiological methods. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 7, n. 4, p. 315-20, 2004.
TYAS, M. J. Colocação e substituição de restaurações por profissionais selecionados. **Australian Dental Journal**, v. 50, n. 2, p. 81-9, 2005.

VACHIRAROJPISAN, T. et al. Early childhood caries in children aged 6–19 months. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 32, n. 2, p. 133-142, 2004.

VADIAKAS, G. Case definition, aetiology and risk assessment of early childhood caries (ECC): a revisited review. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 9, n. 3, p. 114-25, 2008.

WALTER, R. et al. In vitro inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. **Operative Dentistry**, v. 32, n. 4, p. 388-93, 2007.

WANG, Y.; SPENCER, P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 2, p. 141-45, 2003

WALTER, R. et al. In vitro inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. **Operative Dentistry**, v. 32, n. 4, p. 388-93, 2007.

WATTS, D. C.; AL HINDI, A. Intrinsic 'soft-start' polymerisation shrinkage-kinetics in an acrylate-based resin-composite. **Dental Materials**, v. 15, n. 1, p. 39-45, 1999.

WEYNE, S. Cariologia. In: BARATIERI, L. N. et al. **Dentística-Procedimentos preventivos e restauradores**. Rio de Janeiro: Quintessence, 1989. 509p.

WILSON, S. J.; WILSON, H. J. The release of chlorhexidine from modified dental acrylic resin. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 20, n. 3, p. 311-19, 1993.

XIAO, Y. H. et al. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 90, n. 2, p. 813-17, 2009.

XU, H. et al. Plaque Bacterial Microbiome Diversity in Children Younger than 30 Months with or without Caries Prior to Eruption of Second Primary Molars. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p.e89269, 2014. Disponível em:
<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0089269>> Acesso em 01 Set. 2015

YANG, R. et al. Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity. **Journal of microbiological methods**, v. 82, n. 2, p. 163-69, 2010.

YAP, A. U.; SAU, C. W.; LYE, K. W. Effects of aging on repair bond strengths of a polyacid-modified composite resin. **Operative Dentistry**, v. 24, n. 6, p. 371-76, 1998.

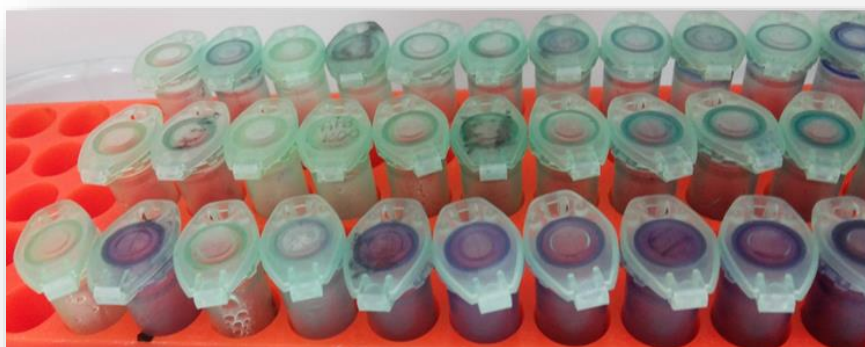
YOSHIKAWA, K. et al. The effect of antibacterial monomer MDPB on the growth of organisms associated with root caries. **Dental Materials Journal**, v. 26, n. 3, p. 388-92, 2007.

YOSHIYAMA, M. et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. **Journal of Dental Research**, v. 81, n. 8, p. 556-60, 2002.

YOSHIYAMA, M. et al. Bonding ability of adhesive resins to caries-affected and caries-infected dentin. **Journal of Applied Oral Science**, v. 12, n. 3, p. 171-76, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A – REISOLAMENTO DAS AMOSTRAS BACTÉRIANAS



As amostras bacterianas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus species* foram selecionadas para o reisolamento.



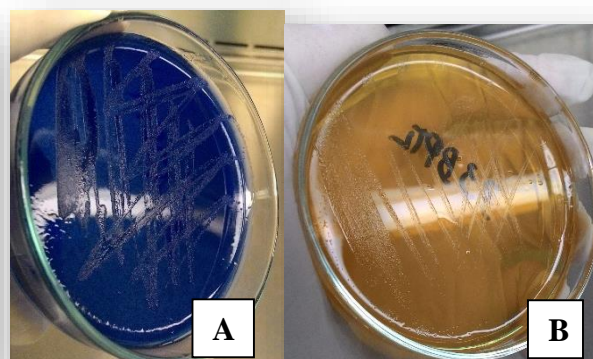
Placas Petri contendo meio de cultura Mitis Salivarius (azul) e Agar Rogosa (amarelo) foram preparadas e identificadas.



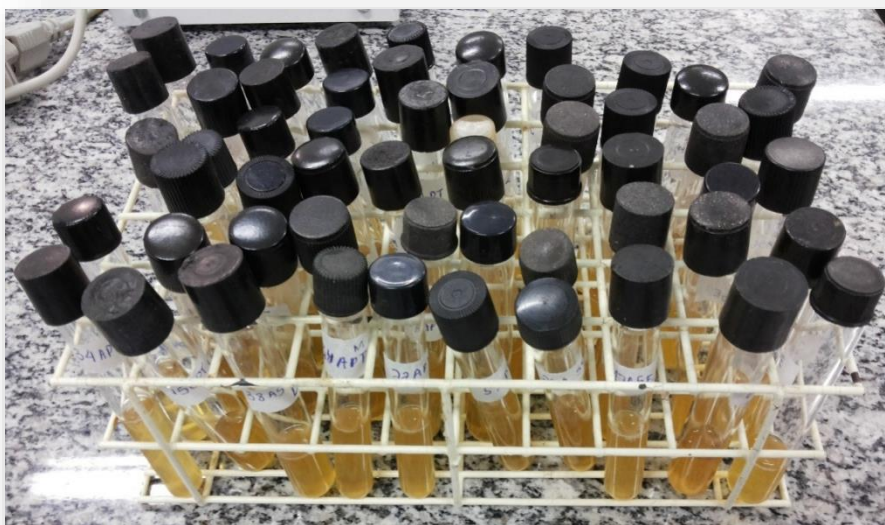
As bactérias foram colocadas em jarras de anaerobiose.



Levadas até a estufa a 37°C por 48 horas

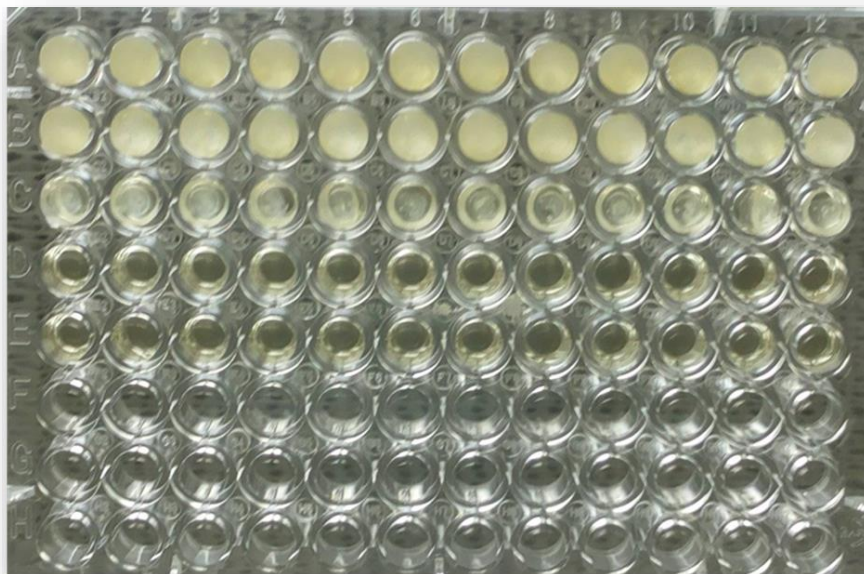


Verificou-se após 48 horas o crescimento bacteriano para *Streptococcus mutans* (A) e *Lactobacillus species*(B).

APÊNDICE B – ARMAZENAMENTO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS REISOLADAS

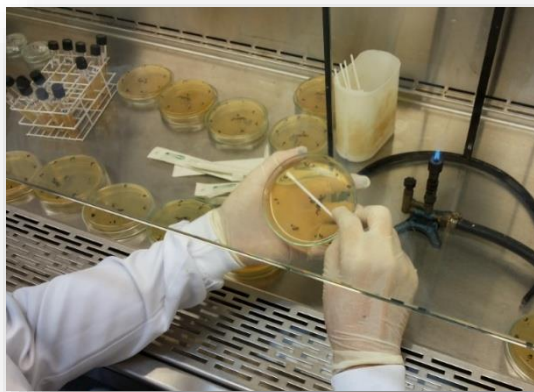
Durante toda a pesquisa as bactérias foram armazenadas em tubos de ensaio contendo caldo BHI e mantidas sob baixa temperatura. Antes da realização de cada teste e/ou técnica as cepas eram recuperadas para cultura de 24hs.

APÊNDICE C – MICROPLACA APÓS O TESTE DE CONTATO DIRETO



Aspecto visual da microplaca após a realização do Teste de Contato Direto e antes da incubação por 48 horas. A região com Clearfil SE Bond e Clearfil SE Protect (A e B) apresentou uma certa turvação inicial, aparentemente uma reação aos componentes dos produtos. Tal comportamento será abordado na discussão.

APÊNDICE D – DETALHAMENTO DA TÉCNICA DE DIFUSÃO EM AGAR



A semeadura das bactérias em toda a superfície do agar foi realizada de 10 em 10 cepas.



Os papéis de filtro foram divididos respectivamente conforme cada sistema adesivo, componente e controle (seta). Em cada grupo testado utilizou-se aplicadores descartáveis extra finos.



Com auxílio de uma pinça os papéis de filtro foram manuseados e a impregnação por cada grupo teste realizada.

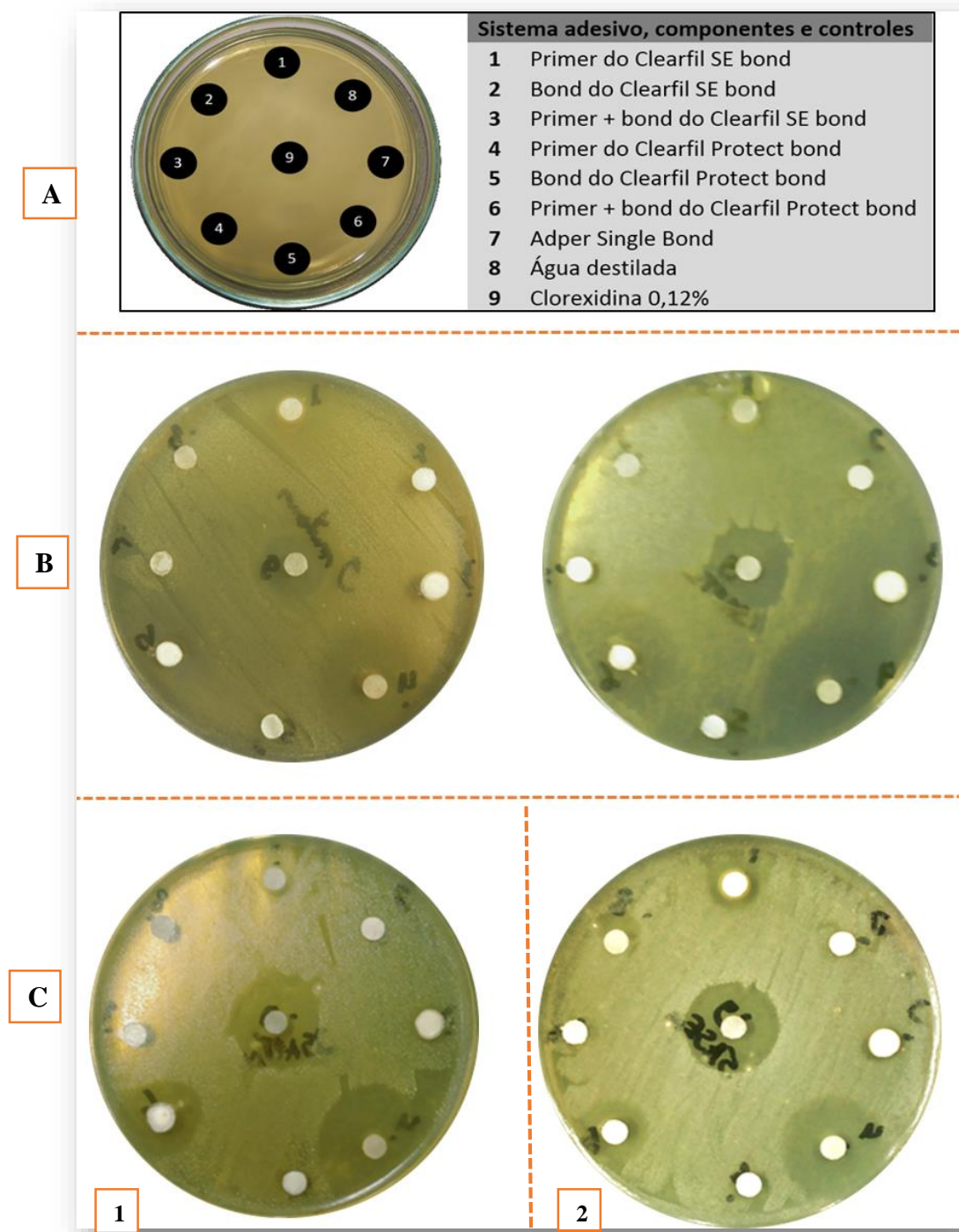


Todos os sistemas adesivos foram fotopolimerizados conforme indicação do fabricante.



Aspecto visual de uma cepa ao final do TCD

APÊNDICE E - HALOS DE INIBIÇÃO PROVOCADOS PELOS SISTEMAS ADESIVOS AVALIADOS



A-Disposição dos papéis de filtro durante a realização da técnica da difusão em agar; B-Aspecto visual de duas cepas de *Streptococcus mutans*; C- Aspecto visual de uma cepa de *Streptococcus mutans* (C1) e uma cepa de *Lactobacillus specie* (C2).

ANEXOS

ANEXO A - CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA UNICAMP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação clínica e microbiológica de sistemas adesivos aplicados sobre dentina, após remoção parcial de cárie e subsequente desempenho clínico das restaurações de resina composta em dentes decíduos**", protocolo nº 014/2008, dos pesquisadores Eliana Rodrigues, Aline Rogéria Freire de Castilho, Andre Sousa de Moraes, Andréia Bolzan de Paula, Cristiane Duque e Regina Maria Puppim Rontani, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 28/10/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Clinical and microbiological evaluation of dental adhesive system after partial caries remove and posterior clinical performance of composite resin in deciduous teeth**", register number 014/2008, of Eliana Rodrigues, Aline Rogéria Freire de Castilho, Andre Sousa de Moraes, Andréia Bolzan de Paula, Cristiane Duque and Regina Maria Puppim Rontani, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 10/28/2009.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO B - CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA UNIFAL/MG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito antimicrobiano de sistema adesivo contendo MDPB sobre diferentes cepas de bactérias de lesões de cárie em dentina de dentes decíduos.

Pesquisador: Geovane Evangelista Moreira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36651514.6.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 878.834

Data da Relatoria: 11/11/2014

Apresentação do Projeto:

Idem versão anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Idem versão anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem versão anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem versão anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Projeto: OK
- Folha de rosto: OK
- Carta de anuência: OK
- Carta de doação de material: OK
- Dispensa do TCLE: OK

Recomendações:

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 878.834

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

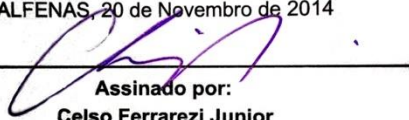
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 20 de Novembro de 2014


Assinado por:
Celso Ferrarezi Junior
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br