

Efeito Antimicrobiano de Sistema Adesivo: Estudo Piloto

Antimicrobial Effect of an Adhesive System: Pilot Study

Letícia Cavalcanti Tambani Guerra[†]
 Géssika Shinkado Garcia[†]
 Luana Kemmer Chimentão[†]
 Karina Marion[†]
 Linda Wang[†]
 Flaviana B. de Andrade Ferreira^{**}

* Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

** Universidade de São Paulo (FOB-USP).
 Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

Resumo

Foi recentemente lançado no mercado um sistema adesivo com própolis de atividade antimicrobiana. Para verificar este efeito utilizou-se a metodologia da difusão em ágar, variando-se inoculo bacteriano de uma cepa de *Streptococcus mutans*, no método da camada dupla e na semeadura por espalhamento. Utilizou-se o adesivo Clearfil Primer e os controles positivo clorexidina e negativo HEMA em discos de papel filtro. Após incubação, o adesivo demonstrou maiores halos inibitórios do crescimento microbiano, em ambos métodos, superando a clorexidina. Constatou-se que o método da camada dupla e a quantidade de 500 uL de inoculo mostraram resultados antimicrobiano mais uniformes

Palavras-chave: Adesivos dentinários. *Streptococcus mutans*. Testes de sensibilidade microbiana.

Abstract

A new dentin bonding system (DBS) was recently launched with the aim of antimicrobial activity. To verify this property, it was used the agar diffusion method, testing the optimal concentration of *Streptococcus mutans* bacterial inoculum, by "pour plate" method and "seeding" method. Paper disks with chlorhexidine (positive control), Clearfil Primer or HEMA (negative control) were placed onto surface of all plates. After incubation, measurements (mm) of inhibition zones were made and Clearfil Primer showed greater halo in both analyzed. In conclusion, the pour plate method with 500 uL of inoculum demonstrated more homogeneous results.

Keywords: Dentin-Bonding agents. *Streptococcus mutans*. Disk diffusion antimicrobial tests.

1 Introdução

Além da restauração de um elemento dentário acometido por cárie, um trabalho paralelo deve ser realizado para se modificar todo o meio bucal. Este cuidado é imprescindível para proporcionar condições adequadas à manutenção das restaurações, visando o aumento da durabilidade das mesmas, bem como a conservação de estruturas não acometidas pela cárie (FORTIN; VARGAS, 2000).

Os procedimentos terapêuticos utilizados no tratamento restaurador não necessariamente eliminam todos os microrganismos dos substratos dentários. Potencializando esta condição, caso o material não sele satisfatoriamente a interface dente-restauração, a microinfiltração será inevitável, levando à necessidade de nova intervenção restauradora (IMAZATO *et al.* 1999, 2003).

Os preparos cavitários modernos envolvem a remoção de tecido dentário infectado e preservação do tecido afetado, ou seja, substrato desmineralizado passível de remineralização, porém acometido por microrganismos cariogênicos em menor quantidade. Estes microrganismos estão presentes após preparo, podendo desencadear desde sensibilidade pulpar até a reincidência de cárie (IMAZATO *et al.* 1999, 2003).

Alguns avanços de diagnóstico foram elaborados para

se minimizar este cenário, destacando-se os evidenciadores de cárie por corante como a fucsina básica e o uso da sondagem, porém os mesmo também apresentam limitações. (KUHNISCH *et al.*, 2007).

Desta forma, os primeiros materiais a entrarem em contato com o tecido amolecido afetado deveriam apresentar propriedades antimicrobianas como o cimento de hidróxido de cálcio (FERREIRA *et al.*, 2002). Esta fundamentação seria aplicada tanto para as cavidades coronárias como nos preparos radiculares, no campo da Endodontia, na qual o fenômeno da adesão também pode ocorrer no tratamento (MAGNI *et al.*, 2007).

Agentes de limpeza como a clorexidina e o hipoclorito de sódio também foram indicados, mas com a Odontologia adesiva, os sistemas adesivos acabam sendo utilizados primeiramente, dispensando o uso de agentes de limpeza devido ao uso do ácido para condicionamento.

A Odontologia Restauradora adesiva vem sendo amplamente utilizada, baseando-se no estabelecimento de uma adesão micromecânica pela formação de uma camada híbrida formada por componentes resinosos adesivos e a estrutura de colágeno (dentina) ou prismas de esmalte (GARCIA *et al.*, 2003). Os sistemas adesivos propriamente ditos, após a promoção de desmineralização da dentina, são aplicados devendo ser difundidos por entre a trama de colágeno. Mais recentemente,

diversos sistemas simplificados foram lançados no intuito de reduzir os passos operatórios. Esta tendência provocou a modificação das formulações tornando-os mais hidrofílicos.

Uma corrente de estudos (GARCIA *et al.*, 2003; TAY *et al.*, 2002, 2004) tem evidenciado que estas formulações acabam potencializando a permeabilidade da membrana constituída pelo sistema adesivo após sua polimerização, além de facilitar a criação de um meio mais hipertônico, favorecendo o acúmulo de água na base da camada híbrida e atravessando a camada de sistema adesivo. Como consequência, há o favorecimento da degradação da interface ao longo do tempo (FABRE *et al.*, 2007).

Por outro lado, esses sistemas apresentam uma característica mais fluida e por ser hidrofílica podem se difundir mais facilmente por entre rede de fibrilas de colágeno o que os torna potenciais veículos de produtos antimicrobianos. (BOTELHO, 2005; IMAZATO *et al.*, 1999).

Vários trabalhos têm sido apresentados na literatura com o objetivo de testar a ação antimicrobiana dos sistemas adesivos. (HERRERA *et al.* 2000a, 2000b; IMAZATO *et al.*, 1997, 1999; KARAMAN; UYSAL, 2004).

As primeiras investigações se fundamentaram no fato de que os sistemas adesivos em contato com a estrutura dentária após a remoção de cárie seria uma ferramenta interessante se associado à ação antibacteriana dos mesmos. A partir de então, tanto os *primers* quanto os adesivos passaram a ser alvos de estudos para se analisar esta possibilidade.

Os monômeros resinosos puros não têm demonstrado capacidade antimicrobiana (SCHMALZ; ERGÜCÜ; HILLER, 2004), entretanto, a partir do desenvolvimento do MDPB (metacrylatoloxidodecylpyridinium bromide), as pesquisas têm conquistado resultados positivos.

Herrera *et al.* (2000a) compararam a efetividade de diferentes materiais, incluindo os sistemas adesivos quanto à ação antimicrobiana, utilizando o método de difusão em agar com inóculo de microorganismo cariogênico isolado de cavidades de cárie de diferentes indivíduos. Somente foram considerados efetivos os sistemas que produzissem halos de inibição > 10mm. Cada sistema apresentou resultados distintos, reforçando que a ação é dependente da composição de cada produto. Apesar dos fabricantes não destacarem esta propriedade, o mesmo foi detectado para alguns dos materiais testados.

Em outro trabalho (HERRERA *et al.*, 2000b), os autores testaram a efetividade antibacteriana de 4 sistemas adesivos. Neste estudo, porém, os inóculos foram preparados a partir de cepas de referência adquiridas em laboratórios de coleções de cultura. Novamente o efeito antibacteriano apresentou-se dependente do material e com resultados similares aos obtidos no estudo anterior, no qual o *Scotchbond Multipurpose* apresentou os melhores resultados e o Prime & Bond os piores. Apenas o sistema Syntac, provavelmente por apresentar glutaraldeído, foi eficaz na inibição de *Lactobacillus sp.*

Um dos mais recentes avanços na tecnologia dos adesivos recai sobre a adição de nano partículas nos sistemas adesivos com o intuito de contribuir mecanicamente na absorção de impacto. Estas partículas foram recentemente associadas como positivas na ação antimicrobiana de alguns agentes adesivos dentinários (ATAC; CEHRELI; SENER, 2001), porém maiores elucidações se fazem necessárias.

Diferentemente do estudo de Herrera *et al.* (2000b) e Atac, Cehreli e Sener (2001) encontraram desempenho favorável do sistema Prime & Bond. Entretanto, há de se ressaltar que neste último, o sistema utilizado foi modificado, havendo a presença de carga incorporada. No trabalho de Schmalz, Ergücü e Hiller (2004) também foi encontrada eficácia do sistema Prime & Bond NT.

Alguns sistemas adesivos também incorporaram flúor como agente antimicrobiano (SCHMALZ; ERGÜCÜ; HILLER, 2004; WANG; BUZALAF; ATTA, 2004). Esta condição, entretanto, não deveria influenciar negativamente nos resultados. Karaman e Uysal (2004) analisaram o efeito de um *primer* associado a diferentes agentes antimicrobianos quanto à resistência adesiva. Encontraram um efeito deletério sob estes aspectos para duas das três associações avaliadas. Porém, o teste utilizado foi o de cisalhamento e o substrato utilizado foi o esmalte.

Estudos mais recentes têm avaliado o uso do MDPB, um monômero resinoso, que ao contrário do HEMA ou TEGDMA, apresentaria ação bactericida própria (IMAZATO *et al.*, 1997). Os resultados revelaram que a aplicação deste produto tem sido efetiva, mesmo após a sua fotoativação, bem como misturado a outros *primers* já comercializados. Outra preocupação deste estudo foi o de testar a resistência adesiva quando do uso destes produtos e encontraram desempenho satisfatório. Este estudo tem sido utilizado como uma referência de que os produtos adesivos podem de fato agir como veículos de agentes antibacterianos (BOTELHO, 2005).

Estes estudos muitas vezes ainda se apresentam com resultados contraditórios e uma das principais razões está no estabelecimento diferenciado do delineamento experimental, mesmo para aqueles que utilizam teste de difusão em ágar, pois alguns usam discos de papel (IMAZATO, *et al.*, 1997; SCHMIDLIN; ZEHNDER; SCHMIDLIN, 2003) e outros preparam uma cavidade no meio de cultura, inserindo o material a ser testado. (FRAGA; SIQUEIRA; UZEDA, 1996; SCHMIDLIN; ZEHNDER; SCHMIDLIN, 2003).

Levando a diferentes resultados, o que é potencializado pela complexidade de cada sistema adesivo (SCHMIDLIN; ZEHNDER; SCHMIDLIN, 2003). Desta forma, os autores recomendam que cada estudo deva ser cuidadosamente comparado com outros trabalhos e que seja ainda proposto um teste mais confiável. (MERYON; JOHNSON, 1989).

A quantidade de inóculo utilizada nos estudos também é outra variável que pode influenciar nos resultados. Esta quantidade tem variado de 20 uL (BOTELHO, 2005); 100 UI (ATAC; CEHRELI; SENER, 2001); 150 uL (HERRERA *et al.*, 2000a, 2000b; SCHMALZ; ERGÜCÜ; HILLER, 2004); 350 uL (IMAZATO *et al.*, 1997). Há trabalhos que não se utilizam de quantidade específica, mas semeiam uma quantidade de suspensão de inóculo com algodão estéril – “swab”. (FRAGA; SIQUEIRA; UZEDA, 1996).

O desenho experimental de cada estudo também deve ser considerado, pois alguns autores consideram potentes apenas quando há a formação de zonas de

inibição >10mm (HERRERA et al. 2000a, 2000b) e outros quando diferentes de zero (IMAZATO et al., 1997), podendo causar interpretação equivocadas.

Apesar da grande variabilidade existente o método de difusão em ágar é bastante aplicado, considerando-se as limitações para alcançar a confiabilidade do trabalho. Também há outros modelos laboratoriais (MERYON; JOHNSON, 1989) e *in vivo*, aplicados para este tipo de análise. (FELTON; BERGENHOLTZ; COX, 1989).

Os sistemas mais recentes, simplificados e com adição de carga ainda requerem avaliações confir-matórias quanto à sua eficácia tanto no aspecto mecânico quanto biológico.

Apesar das perspectivas desta ação antimicrobiana, a falta de uma efetiva padronização das metodologias de avaliação pode mascarar o real potencial destes produtos. Desta forma, este estudo se propõe a avaliar um sistema adesivo atual, com proposta de efeito antimicrobiano utilizando diferentes concentrações de inóculos e duas formas diferentes de semeadura na difusão em ágar.

2 Material e Método

Os meios de cultura Agar Mueller Hinton e BHI (Brain Heart Infusion) agar (Difco, EUA) foram utilizados para a difusão em ágar. Estes meios forma preparados e esterilizados em autoclaves a 121°C por 15 minutos e mantidos em estufa (FANEM, Brasil) a 37°C durante 24 horas para teste de esterilidade.

Foi obtida a cepa bacteriana de referência, *Streptococcus mutans*, liofilizada e catalogada com um número de registro da American Type Culture Collection (ATCC), 25175, proveniente da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil).

Seu estoque armazenado foi reconstituído com cultura líquida de meio BHI. Aliquotas de 0,1 mL foram introduzidas em tubos (Pyrex, de 12 X 150mm) contendo 5 mL de caldo (BHI) esterilizados, os quais foram incubados em jarra de anaerobiose de carbono dentro da jarra. Estes permaneceram em estufa a 37°C até se verificar o desenvolvimento bacteriano por meio de turvação do meio de cultura. Das amostras com crescimento bacteriano (turvas) retirou-se 0,1 mL, para serem semeados em novos tubos com 5 mL da cultura líquida esterilizada; e assim sucessivamente, até que se obtivesse o crescimento microbiano no período de 24 horas.

A morfologia colonial em placas de Petri foi verificada, seguida pela confirmação da morfologia celular pelo método da coloração de Gram. Ambos os procedimentos foram realizados para confirmar a pureza das cepas. Os procedimentos teste forma realizados em sala asséptica.

A semeadura sucessiva permitiu o crescimento bacteriano exponencial e para o teste de suscetibilidade antimicrobiana a concentração desta suspensão foi ajustada em $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL (unidades formadoras de colônias por mililitro), uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escada de Mc Farland, por meio de leitura em espectrofotômetro 20 Genesys (Spectronic Instruments, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. Este ajuste foi realizado em meio BHI, utilizando o próprio meio como padrão branco.

No método da camada dupla de Petri de 130 mm de diâmetro foram preenchidas com uma camada de agar Mueller Hinton como base. 200, 500 ou 600 uL (microlitos) da suspensão bacteriana foram inoculados em frascos contendo 50 mL de agar BHI a 46°C, portanto, ainda na forma líquida, homogeneizados e então dispensados nas placas previamente preparadas com o agar Mueller Hinton. Com o resfriamento da camada superior formou-se a camada dupla com o objetivo de uniformizar o crescimento do microorganismo.

Para o método de espalhamento foram utilizadas placas de Petri, do mesmo tamanho, com meio de BHI agar. O método de espalhamento constitui em semear 100 ou 150 uL do inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/ mL sobre a superfície do agar BHI por meio de "swab".

Em cada placa, para ambas as técnicas, camada dupla ou espalhamento, foram colocados três discos de papel filtro, cada embebido com produto diferente: *clorexidina* a 0,12% (controle positivo), Clearfil Protect Bond Primer (Kuraray, Osaka, Japão) e HEMA (controle negativo-Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A composição do Clearfil Primer, segundo o fabricante é de 10-metacrioloyloxydodecil dihidrogenio fosfato (MDP), 12-metacrioloyloxydodecil piridinium brometo (MDPB), 2-hidroxietil metacrilato (HEMA), dimetacrilato hidrofílico, água.

O antimicrobiano a ser testado foi gotejado, com pipeta automática regulada para 4 microlitros de volume, sobre discos de papel filtro (Whatman n.1, Maidstone, Reino Unido), obtidos a partir de perfuradores de papel, com diâmetro de 5,0mm.

Os discos de papel com a substancia testada forma colocados na superfície dos meios de cultura em posição equidistante e as placas ficaram em temperatura ambiente por 2 horas para difusão das substâncias antimicrobianas pelo agar antes do crescimento microbiano. As placas foram incubadas a 37°C nas condições gasosas adequadas por 48 horas. Todos os testes forma feitos em triplicata.

Após o período de incubação, as zonas ou halos de inibição do crescimento microbiano foram medidas por meio de paquímetro por único examinador. A zona de inibição foi considerada como a menor distância entre a superfície externa das amostras de adesivo até o ponto inicial do crescimento microbiano.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e Teste de Bonferroni, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) visando detectar as diferenças na suscetibilidade do microorganismo frente aos materiais testados.

3 Resultados

Os resultados obtidos por meio a leitura dos halos inibitórios estão expressos nas figuras 1 e 2. O produto Clearfil Primer demonstrou os maiores halos inibitórios variando de 30 a 32 mm no método da camada dupla de 29 a 34mm no método do espalhamento, superando o resultado do controle positivo clorexidina, que variou de 16 a 19 mm no primeiro e 20 a 32 mm no espalhamento. O HEMA não foi capaz de promover nenhuma ação an-

timicrobiana no método de camada dupla em nenhuma das concentrações de inóculo utilizados. No método de espalhamento, houve uma leve ação, registrada por valores diferentes de zero

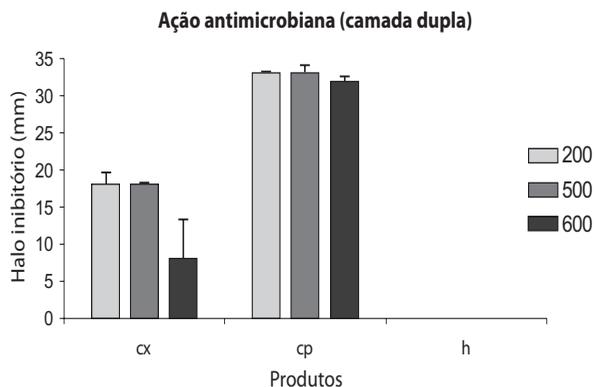


Figura 1. Esquema representativo dos halos de inibição produzidos pelas substâncias antimicrobianas sobre placa de Petri com crescimento do microrganismo *Streptococcus mutans*. A cor verde representa o adesivo (em disco de papel); a cor branca é a região correspondente ao halo de inibição (onde foi feita a leitura do halo de inibição) e; em amarelo o meio de cultura (placa de Petri), onde havia a evidência do crescimento bacteriano.

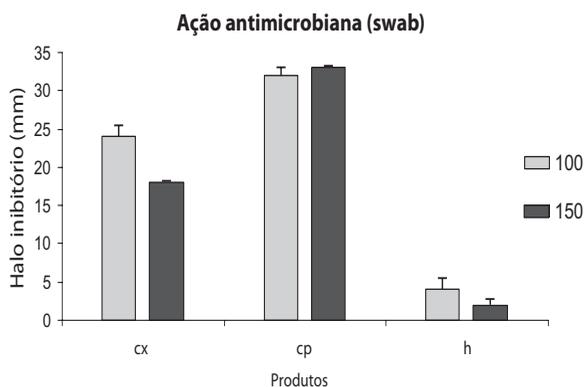


Figura 2. Gráfico dos resultados dos halos inibitórios em milímetros dos antimicrobianos clorexidina (CX), Clearfill Primer (CP) e HEMA (H), sobre 100 ou 150 μ L de suspensão bacteriana de *Streptococcus mutans* (Mac Farland 0,5) semeados com "swab" sobre a superfície de ágar BHI, no método do espalhamento.

Em ambos os métodos, houve uma tendência de redução do potencial antimicrobiano (aferido pelo halo de inibição) conforme o aumento do inóculo. No primeiro método o crescimento microbiano demonstrou maior uniformidade por toda a placa e das três quantidades dispensadas, as de 200 e 500 uL produziram halos semelhantes, enquanto que o inóculo de 600 uL promoveu um halo bem menor.

Analisando os fatores no método de camada dupla, ambos os fatores (material e concentração do inóculo)

foram significantes, sendo o material o mais expressivo. Houve interação significativa ente estes fatores. No método de espalhamento o efeito material foi significativo bem como a interação com o inóculo. O material isoladamente não foi estatisticamente significativo.

4 Discussão

A Odontologia restauradora adesiva vem sofrendo grandes aprimoramentos nos últimos anos, sendo um dos recursos responsáveis pela possibilidade de restaurações mais conservativas. Ainda sob este aspecto, a proposta da incorporação de agentes antimicrobianos associados aos sistemas adesivos tornou-se uma possibilidade interessante na prevenção de reincidência de cárie (VAN MEERBEECK, 1998; WANG *et al.*, 2004). O complexo dentino-pulpar, quando estimulado é capaz de reagir biologicamente no sentido de restabelecer o tecido (STANLEY *et al.*, 1983). Recentemente, a incorporação de monômeros específicos foi efetuada para conciliar as propriedades de adesão à estrutura dentária e a ação antimicrobiana (IMAZATO *et al.*, 1997). A capacidade de difusão deste produto no interior dos túbulos dentinários poderia se constituir numa via para a ação deste material. Desta forma, esta proposta seria de grande ação benéfica.

Os resultados de presente trabalho confirmam claramente o efeito antimicrobiano do primer do sistema Clearfil Protect Bond. Esta ação foi confirmada em todas as condições testadas neste estudo, acentuando o seu potencial. Ao ser comparado com o grupo controle positivo, sua ação chega a ser superior em todas as situações, o que acentua a perspectiva de sua utilização.

Este sistema adesivo é composto pelo MDPB, na qual já se esperava uma atuação positiva, entretanto em condições específicas (IMAZATO *et al.*, 1999, 2003). No presente estudo, o fato de se testar condições diferentes reforça seu potencial.

Estudos mais recentes têm avaliado o uso do MDPB, um monômero resinoso, que ao contrário do HEMA ou TEGDMA, apresentaria ação bactericida própria (IMAZATO *et al.*; 1997). Os resultados revelaram que a aplicação deste produto tem sido efetiva, mesmo após a sua fotoativação, bem como misturado a outros primers já comercializados (BOTELHO, 2005). Torna-se indispensável, na continuidade do presente estudo, realizar testes com os produtos fotoativados.

As zonas ou halos de inibição obtidos compararam o adesivo testado com a clorexidina, que é o antimicrobiano tido como controle positivo, uma vez que é o mais efetivo (FERREIRA *et al.*, 2002) sem causar efeitos deletérios quando usado em seres vivos.

O microorganismo teste utilizado é aquele mais associado com a cárie dentária, principalmente pela sua grande capacidade de adesão à superfície do esmalte, mais ainda, por ser uma cepa de referência facilmente obtida e mais extensivamente citada na literatura (LOESCHE, 1986).

Estes estudos muitas vezes ainda se apresentam com resultados contraditórios e uma das principais razões está no estabelecimento diferenciado do delineamento experimental, mesmo para aqueles que utilizam de

teste de difusão em ágar. (FRAGA; SIQUEIRA; UZEDA, 1996; IMAZATO *et al.*; 1997; SCHMIDLIN; ZEHNDER; SCHMIDLIN, 2003).

O teste de difusão em ágar tem sido largamente utilizado para o teste antimicrobiano de materiais dentários. Sua desvantagem é que seu resultado não depende apenas da toxicidade do material sobre o microorganismo, mas também pela difusibilidade do material no meio de cultura. Um material que se difunde mais facilmente provavelmente promoverá maiores halos de inibição bacteriana. Para compensar este problema, utiliza-se o procedimento de manter as placas por 2 horas em temperatura ambiente, para que o material de difunda, antes do crescimento bacteriano a 37°C. (GOMES *et al.*, 2004).

Neste estudo foram utilizados dois “antimicrobianos” com veículos e taxas de difusão semelhantes – o adesivo e HEMA – e um veículo aquoso – clorexidina. Foi observado que apesar de veículo com maior difusão e alto poder antimicrobiano, a clorexidina produziu halos menores que o adesivo. Reforçando a idéia de que este adesivo realmente desempenha eficácia quanto à propriedade estudada, apesar dos possíveis problemas que a metodologia utilizada possa gerar.

A camada dupla descrita por Grove e Randall (1955) é usada com realização de poços no agar para inserção do antimicrobiano. Embora no presente estudo tenha-se utilizado os discos de papel embebido com o antimicrobiano e, nestes casos, é normalmente semeado o inóculo bacteriano apenas com “swab”, a comparação das diferentes formas de semeadura produziu resultado diferente frente à difusão dos discos de papel. Pela camada dupla, observaram-se halos maiores e mais uniformes, ou seja, com números mais próximos nas repetições do experimento. A semeadura com o “swab” permite maior variação, realizada pelo espalhamento manual de um operador. Desta forma, o presente estudo em muito colabora na padronização do experimento ao testar diferentes formas de se utilizar esta metodologia.

Esse efeito antimicrobiano pronunciado do Clearfil Primer trás nova dimensão no estudo dos adesivos, pois o selamento é fundamental em qualquer cavidade preparada, mas desde que não mais existam microorganismos viáveis e em condições de se proliferar sob as restaurações. Estes microorganismos viáveis poderiam promover a destruição do tecido dentário e acabar por dissolver aquela adesão tão almejada e cuidadosamente conquistada na interface dente-restauração. Novos estudos devem ser realizados também no que tange às propriedades mecânicas e adesivas, uma vez que a união dos efeitos adesivos e antimicrobianos se aproxima do ideal em termos de materiais restauradores.

7 Conclusão

Sob as condições propostas, constatou-se que o método da camada dupla mostrou mais uniformidade de resultados para todos os materiais testados do que o método do espalhamento e, a quantidade de 500 µL de inóculo bacteriano na camada superior promoveu os valores intermediários mais definidos. Observou-se ainda que o adesivo Clearfil Primer desempenhou efeito

antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans* semelhante à clorexidina, ao passo que o veículo HEMA não possui esta atividade.

Agradecimento

Os autores agradecem o apoio da Funadesp e às técnicas Elaine Luvisotto e Elisângela de Souza na assistência laboratorial.

Referências

- ATAC, A.S.; CEHRELI, C.A.; SENER, B. Antibacterial activity of fifth-generation dentin bonding systems. *J Endod*, Chicago, v. 27, n. 12, p. 730-3, Dec 2001.
- BOTELHO, M.G. The antimicrobial activity of a dentin conditioner combined with antibacterial agents. *Oper Dent*, Seattle, v. 30, n. 1, p. 75-82, Jan/Feb 2005.
- FABRE, H. S. *et al.* Water sorption and solubility of dentin bonding agents light-cured with difference light sources. *J Dent*, Kidlington, v. 35, n. 3, p. 253-8, Mar 2007.
- FELTON, D.; BERGENHOLTZ, G.; COX, C. F. Inhibition of bacterial growth under composite restorations following GLUMA pretreatment. *J Dent Res*, Chicago, v. 68, n. 3, p. 491-5, Mar 1989.
- FERREIRA, C. M. *et al.* Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J*, Ribeirão Preto, v. 13, p. 118-22, 2002.
- FORTIN, D.; VARGAS, M.A. Two spectrum of composites: new techniques and materials. *J Am Dent Assoc*, Chicago, v. 131, Suppl. 1, p. 26-30, Jun 2000.
- FRAGA, R.C.; SIQUEIRA JR., J.R.; UZEDA, M. In vitro evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. *J Prosthet Dent*, St. Louis, v. 76, n. 5, p. 483-6, Nov 1996.
- GARCIA, F. C. P. *et al.* Paradoxo da evolução dos sistemas adesivos. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, São Paulo, v. 57, n. 6, p. 449-53, nov./dez. 2003.
- GOMES, B. P. F. A. *et al.* In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Braz Dent J*, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 30-5, 2004.
- GROVE, D.C.; RANDALL, W.A. *Assay methods of antibiotics: a laboratory manual*. New York: Medical Encyclopedia, 1955. (Antibiotics Monograph 2).
- HERRERA, M. *et al.* Antibacterial activity of four dentin bonding systems. *Int J Antimicrob Agents*, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 305-9, Aug 2000a.
- HERRERA, M. *et al.* Antibacterial activity of resin adhesives, glass ionomer and resin-modified glass ionomer cements, a compomer in contact with dentin caries samples. *Oper Dent*, Seattle, v. 25, n. 4, p. 265-9, Jul/Aug 2000b.
- IMAZATO, S. *et al.* Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer (MDPB). *Dent Mater*, Oxford, v. 19, n. 4, p. 313-9, Jun 2003.

- _____. et al. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer (MDPB). *Biomaterials*, Oxford, v. 20, n. 9, p. 899-903, May 1999.
- _____. et al. Incorporation of antibacterial monomer MDPB into dentin primer. *J Dent Res*, Chicago, v. 76, n. 3, p. 768-72, Mar 1997.
- KARAMAN, A.I.; UYSAL, T. Effectiveness of a hydrophilic primer when different antimicrobial agents are mixed. *Angle Orthod*, Appleton, v. 72, n. 3, p.414-9, Jun 2004.
- KUHNISCH, J. et al. Effects of dental probing on occlusal surfaces-a scanning electron microscopy evaluation. *Caries Res*, Basel, v. 41, n. 1, p. 43-8, Dec 2007.
- LOESCHE, W.J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev*, Washington, v. 50, n. 4, p. 353-80, Dec 1986.
- MAGNI, E. et al. Adhesion between fiber post and resin luting agents: a microtensile bond strength test and an SEM investigation following different treatments of the post surface. *J Adhes Dent*, New Malden, Surrey, v. 9, n. 2, p. 195-202, Apr 2007.
- MERYON, S.D.; JOHNSON, S.G. The modified model cavity method for assessing antibacterial properties of dental restorative materials. *J Dent Res*, Chicago, v. 68, n. 5, p. 835-9, May 1989.
- SCHMALZ, G.; ERGÜCÜ, Z.; HILLER, K-A. Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *J Endod*, Chicago, v. 30, n. 5, p. 352-8, May 2004.
- SCHMIDLIN, O.A.; ZEHNDER, M.; SCHMIDLIN, P.R. Effectiveness of dentine bonding agents against cariogenic bacteria in vitro: a comparison of two methods. *Oral Microbiol Immunol*, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 140-3, Jun 2003.
- STANLEY, H.R. et al. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Oral Pathol*, Copenhagen, v. 12, n. 4, p. 257-89, Aug 1983.
- TAY, F.R. et al. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent*, Oxford, v. 30, n. 7/8, p. 371-82, Sept/Nov 2002.
- _____. et al. Single-step, self-etch adhesives behave as permeable membranes after polymerization. Part I. Bond strength and morphologic evidence. *Am J Dent*, San Antonio, v. 17, n. 4, p. 271-8, Aug. 2004.
- VAN MEERBEECK, B. et al. The clinical performance of adhesives. *J Dent*, Oxford, v. 26, n. 1, p. 1-20, Jan 1998.
- WANG, L.; BUZALAF, M. A. R.; ATTA, M. T. Effect of one-bottle adhesive systems on fluoride release of a resin modified glass ionomer cement. *J App Oral Sci*, Bauru, v. 12, n. 1, p. 12-7, Jan/Mar. 2004.

Letícia Cavalcanti Tambani Guerra

Graduanda em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <leticia.tambani@gmail.com>

Géssika Shinkado Garcia

Graduanda em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <gshinkadog@hotmail.com>

Luana Kemmer Chimentão

Graduanda em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <luanachimentao@yahoo.com.br>

Karina Marion

Graduanda em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <k_marion@hotmail.com>

Linda Wang

Doutora em Dentística pela Universidade de São Paulo (FOB–USP).
Docente do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <wang.linda@uol.com.br>

Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira

Doutora em Dentística pela Universidade de São Paulo (FOB–USP).
Docente do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <flavianaferreira@uol.com.br>
