

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *PRIMERSE* ADESIVOS SOBRE DIFERENTES MICROORGANISMOS

ANTIMICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF PRIMERS AND ADHESIVE ON DIFFERENT MICROORGANISMS

Priscila Paiva PORTERO¹
Patricia GRAU-GRULLÓN²
Rafael Gomes DITTERICH³
Carolina de Andrade Lima CHAVES⁴
Elizabeth Brasil dos SANTOS⁵
Osana Maria Mongruel GOMES⁶

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro, por meio do teste da difusão em ágar, a atividade antimicrobiana de oito sistemas adesivos: G1-Clearfil Protect Bond (Kuraray); G2-Clearfil SE Bond (Kuraray); G3-One Coat SE Bond (Coltène/Whaledent); G4-One Coat Bond (Coltène/Whaledent); G5-Single Bond (3M/ESPE); G6-Tyrian SPE, G7-Prime&Bond 2.1 (Dentsply); G8-One Step Plus e G9-Solução salina fisiológica (grupo controle). Os microorganismos (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) foram semeados em ágar mitis salivarius, em triplicata e incubadas à 37° C/10 min. Em seguida, discos de papel filtro esterilizados foram embebidos com os primers ou adesivos dos sistemas adesivos, que foram manipulados seguindo as recomendações dos fabricantes e depositados na superfície do ágar. As placas foram incubadas à 37° C/48 hs. Após este período mediu-se os diâmetros dos halos de inibição bacteriano. A análise estatística foi realizada e verificaram-se diferentes comportamentos tanto dos *primers* quanto dos adesivos testados sobre os diferentes microorganismos

Palavras-chave: Adesivos dentinários. Microbiologia. microinfiltração.

Abstract: The propose of this study was to evaluate in vitro by the diffusion agar method, the antimicrobiologic activity of eight adhesive systems: G1-Clearfil Protect Bond (Kuraray); G2-Clearfil SE Bond (Kuraray); G3-One Coat SE Bond (Coltène/Whaledent); G4-One Coat Bond (Coltène/Whaledent); G5-Single Bond (3M/ESPE); G6-Tyrian SPE; G7-Prime&Bond 2.1 (Dentsply); G8-One Step Plus and G9-solution saline physiological (control group), The microorganisms (*Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) were sown in mitis salivarius agar, triplicated and incubated at 37° C/10 min. After that, sterilizers paper disk were wet with the primers or the adhesive, used by the fabricant instruction and deposited in the agar surface. The plates were incubating at 37° C/48hs. After this period, the bacteria inhibition halos were measure. The statistics analyze was realize and was verify the different behavior of the primers and adhesive when tested on the different microorganisms.

Keywords: Dentin adhesives. Microbiology. dental leakage.

¹ Mestre em Odontologia (Clínica Integrada) pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Doutoranda em Dentística Restauradora pela UNESP - Araraquara. Docente da Faculdade de Odontologia de Nova Friburgo da Universidade Federal Fluminense (FO-NF/UFF). e-mail: priscis.portero@qg.com.br

² Mestre em Odontologia (Clínica Integrada) pela UEPG.

³ Mestre em Odontologia (Clínica Integrada) pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Docente da Faculdade de Odontologia de Nova Friburgo da Universidade Federal Fluminense (FO-NF/UFF). e-mail: rafael.ditterich@yahoo.com.br

⁴ Mestre em Reabilitação Oral pela UNESP - Araraquara.

⁵ Doutora em Biologia e Patologia Buco-dental pela FOP-UNICAMP. Professora de Microbiologia e Imunologia da UEPG.

⁶ Doutora em Dentística Restauradora pela UNESP-Araraquara. Professora de Dentística Restauradora da UEPG.

INTRODUÇÃO

Com o advento da técnica do condicionamento ácido do esmalte dental introduzido por Buonocore (1955) e das resinas compostas por Bowen (1963), diversos sistemas adesivos têm sido lançados no mercado odontológico e sido intensamente pesquisados. A microinfiltração bacteriana é considerada a principal causa de cárie secundária (MJÖR, 1997), inflamação pulpar, necrose e a eventual necessidade para terapia endodôntica depois da confecção das restaurações (BRANNSTROM; NYBORG, 1971; KHALICHI *et al.*, 2009). O selamento biológico dos preparos cavitários, desta forma, é considerado crítico para o sucesso clínico de uma restauração. A aplicação de sistemas adesivos diretamente na superfície dentinária é uma maneira de produzir uma estrutura resistente contra a invasão de bactérias (SCHERER *et al.*, 1990; ARENDS, RUBEN; DIJKMAN, 1990). A microinfiltração marginal ocorre através de fendas nas restaurações e para campos (2001) a fenda marginal depende diretamente dos sistemas adesivos e da resina utilizada. Anusavice (1998), entretanto, relata que a presença dessas fendas em restaurações de resina composta depende da contração de polimerização e do coeficiente de expansão térmica linear do material restaurador.

Para diminuir a possibilidade de cáries secundárias é ideal que sistemas adesivos apresentem potencial antimicrobiano para serem utilizados na confecção de restaurações dentárias (REIS *et al.*, 2006; IMAZATO *et al.*, 2003; De MUNCK *et al.*, 2005). Desta forma, muitos sistemas adesivos têm acrescentado em suas formulações agentes antibacterianos (JEDR YCHOWSKI *et al.*, 1983; EVRENOL *et al.*, 1999; COHEN *et al.*, 2003; AHN *et al.*, 2009).

Segundo alguns autores esse efeito antibacteriano dos adesivos dentinários depende dos componentes que são originalmente incorporados para promover adesão, incluindo a efetividade de cada componente, a longevidade da efetividade, a espécie bacteriana a que são sensíveis tais agentes, a concentração dos componentes e o mecanismo para inibir ou matar bactérias (IMAZATO *et al.*, 2003). Outros estudos, contudo, associam o efeito antimicrobiano ao baixo pH desses produtos (MEIERS e MILLER, 1996; IMATAZO, IMAI e EBISU, 1998).

Diante disso, torna-se importante avaliar a atividade antimicrobiana dos diferentes primers e adesivos disponíveis comercialmente. Sendo assim, o propósito desse estudo foi avaliar *in vitro* através do método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana, de oito primers e adesivos, comumente utilizados na clínica odontológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Os sistemas adesivos utilizados estão dispostos no Quadro 1. O método empregado foi o da difusão em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). As placas foram semeadas com pool de Saliva Total dos pesquisadores, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (bacterioteca da Universidade Estadual de Ponta Grossa). Depois de semeadas as placas foram levadas à estufa a 37° C durante 10 minutos. Em seguida, papéis de filtro esterilizados foram embebidos nos primers ou nos adesivos para aqueles de dois frascos, para verificar quais destes ou se ambos apresentam ação antimicrobiana e após foram depositados sobre a superfície do ágar, cuja placa estava devidamente demarcada para que não houvesse equívocos na identificação dos respectivos sistemas adesivos. Os adesivos foram polimerizados de acordo com as instruções dos fabricantes por meio do aparelho Optilgh 600/Gnatus. Cada microorganismo foi semeado em três placas, obtendo-se três amostras para cada material. As placas foram incubadas em estufa a 37° C durante 48 horas, sendo que apenas para o *S. mutans* a incubação foi feita em microaerofilia antes de ser mantida em estufa por 48 horas. Após este período observou-se a formação de halos de inibição do crescimento microbiano (mm), os quais foram medidos por meio de uma régua milimetrada.

Quadro 1- Materiais utilizados na presente pesquisa

GRUPOS	SISTEMAS ADESIVOS	FABRICANTES
G1	Clearfil Protect Bond	Kuraray
G2	Clearfil SE Bond	Kuraray
G3	One Coat SE Bond	Coltène/Whaledent
G4	One Coat Bond	Coltène/Whaledent
G5	Single Bond	3M/ESPE

G6	Tyrian SPE	Bisco
G7	Prime&Bond 2.1	Dentsply
G8	One Step Plus	Bisco
G9	Solução Fisiológica	-----

RESULTADOS

O posto médio dos valores dos halos de inibição formados para cada sistema adesivo frente aos microorganismos testados é mostrado nas Tabelas 1 a 5.

Tabela 1 – Análise estatística realizada por meio do Teste de Kruskal-Wallis referente à comparação de sistemas adesivos sobre *S. mutans*

Sistema Adesivo	G2 (<i>primer</i>)	G1 (<i>primer</i>)	G3 (<i>primer</i>)
Posto Médio (mm)	3,67	4,67	6,67

H = 1,9310 ; $p=0,3808$; 2 G.L.

Tabela 2 – Análise estatística realizada por meio do Teste de Kruskal-Wallis referente à comparação de sistemas adesivos sobre *C. albicans*

		G4	G2 (<i>primer</i>)	G1 (<i>primer</i>)	G3 (<i>primer</i>)
Posto Médio (mm)	11,00 (b)	Sistema	G3	9,67 (b)	5,33 (ab)

H = 10,7679 ; $p=0,0293$; 4 G.L.

Postos Médios com letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$)

Tabela 3 – Análise estatística realizada por meio do Teste de Mann-Whitney referente à comparação de sistemas adesivos sobre *E. coli*

Sistema Adesivo	G1 (<i>primer</i>)	G3 (<i>primer</i>)
Posto Médio (mm)	4,00	3,00

U = 3,0000 ; $p=0,5127$

Tabela 4 – Análise estatística realizada por meio do Teste de Kruskal-Wallis referente à comparação de sistemas adesivos sobre *S. aureus*

Sistema Adesivo	G7	G5	G2 (adesivo)	G3 (adesivo)	G4	G2 (<i>primer</i>)	G1 (<i>primer</i>)	G3 (<i>primer</i>)
Posto Médio (mm)	5,50 (a)	5,50 (a)	12,00 (ab)	6,67 (a)	11,83 (ab)	20,67 (b)	22,33 (b)	15,50 (ab)

H = 18,4268 ; $p=0,0102$; 7 G.L.

Postos Médios com letras minúsculas distintas diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$)

Tabela 5 – Análise estatística realizada por meio do Teste de Kruskal-Wallis referente à comparação de sistemas adesivos sobre microorganismos da Saliva Total.

Sistema Adesivo	G2 (<i>primer</i>)	G1 (<i>primer</i>)	G3 (<i>primer</i>)
Posto Médio (mm)	3,50	7,67	3,83

H = 4,4754 ; $p = 0,1067$; 2 G.L.

Apenas os *primers* dos sistemas adesivos Clearfil Protect Bond, Clearfil SE Bond e One Coat SE Bond apresentaram a formação de halos de inibição contra os microorganismos da Saliva Total e *S. mutans*. Os primers dos Clearfil Protect Bond e One Coat SE Bond também apresentaram halos inibitórios para os microorganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

O sistema adesivo One Coat Bond apresentou maiores halos de inibição contra *Candida albicans*, seguido respectivamente pelo One Coat SE Bond (adesivo) e pelo primer do Clearfil Protect Bond, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

A microinfiltração bacteriana é considerada a principal causa da inflamação pulpar, necrose e a eventual necessidade para terapia endodôntica após a confecção de restaurações (BRANNSTRÖM; NYBORG, 1971) e o selamento biológico do preparo em dentina é considerado crítico para o sucesso clínico de uma restauração.

Apesar da considerável melhora nos últimos anos dos materiais odontológicos, a formação de gaps na interface dente/restauração continua a ser um problema associado às restaurações em resina composta (KENSHEMA *et al.*, 2006). A pobre adaptação à substância dentária pode predispor à descoloração e colonização bacteriana (ROULET ENOACK, 1991).

Em estudos da composição das placas bacterianas, diversas espécies de bactérias tem sido encontradas e associadas a cárie dentária, dentre eles o *Streptococcus mutans* (ALEXANDER; CAWSON, 1998; HOSHINO, 1985; BEIGHTON E LYNCH, 1995).

Para minimizar essa microinfiltração alguns sistemas adesivos comercialmente disponíveis (por ex.: Optibond / Kerr, Syntac Single Component / Vivadent, Prime & Bond / Dentsply, Perma Quick / Ultradent, Syntac / Vivadent, Gluma / Bayer, Pro Bond / Dentsply) têm apresentado em sua composição agentes antimicrobianos como o 12-metacrilóiloxidecipyrídiuim bromide (MDPB), flúor ou glutaraldeído. A atividade antimicrobiana, entretanto, não tem sido associada apenas a esses fatores, mas também à acidez dos sistemas adesivos (NCCLS, 2006).

Neste estudo foi observada uma diferença no efeito antimicrobiano nos vários sistemas adesivos avaliados. Quando primers e adesivos estão dispostos em dois frascos, para verificar a atividade antimicrobiana de cada um, testou-se primers e adesivos separadamente com o propósito de verificar se nestes sistemas havia diferença na atividade inibitória microbiana destes produtos. Foi observado que o efeito antimicrobiano variou tanto em relação aos primers e adesivos, que apresentaram efeitos variados, quanto em relação ao tipo de espécie bacteriana. Como foi o caso dos primers dos sistemas adesivos Clearfil SE Bond, Clearfil Protect Bond e One Coat SE Bond que foram os únicos agentes que apresentaram efeito antimicrobiano sobre os microorganismos da saliva total e *S. mutans*. No primer e adesivo do sistema One Coat SE Bond foi observado efeito antimicrobiano sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. O efeito antimicrobiano dos primers e dos adesivos está relacionado com o baixo pH destes materiais (pH = 2), visto que as bactérias não sobrevivem em pH extremamente baixos (MARSH; MARTIN, 1992), tendo assim, potencial para matar ou inativar as bactérias. Além disso, a presença do fosfato metacrilóiloxidecidihidrogenase no primer do produto Clearfil SE Bond, pode ter contribuído para a diminuição da atividade antimicrobiana deste produto.

O sistema adesivo Clearfil Protect Bond foi lançado como sendo uma nova era dos agentes adesivos autocondicionantes contendo um monômero funcional MDPB no primer e flúor no adesivo. O MDPB é um agente antibacteriano que possui em sua composição amônia quaternária com um grupo

metacriloxil, e mostra atividade antimicrobiana contra streptococcus orais (IMAZATO *et al* 1994, 1995; LI *et al*, 2009). Neste estudo, todavia, o primer apresentou efeito inibitório sobre as bactérias testadas, contudo, não foi estatisticamente diferente do One Coat SE Bond. Provavelmente, o efeito antimicrobiano do Clearfil Protect Bond esteja relacionado com o MDPB. De acordo com LI *et al*, em 2009, este efeito pode também ter sido provocado pela liberação de compostos não reagidos, como o flúor e o monômero de amônia quaternária com um grupo metacriloxil, que são agentes catiônicos, que causam uma mudança negativa na superfície da bactéria, causando danos na membrana celular e danos irreversíveis aos constituintes do citoplasma.

Os adesivos convencionais de frasco único: Prime & Bond 2.1 e Single Bond apresentaram algum efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, mas este foi pequeno, evidenciando que o uso destes produtos devem ser reconsiderados quando o objetivo for de inibir ou diminuir a proliferação de espécies bacterianas.

Os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que os diferentes sistemas adesivos apresentam habilidades distintas para prevenir ou limitar o crescimento bacteriano, sendo necessárias mais pesquisas e estudos para verificar o efeito antimicrobiano de sistemas adesivos para que se possa prever o período de tempo que os componentes permanecerão ativos e se estes dados podem ser extrapolados para o ambiente bucal.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada, concluiu-se que:

- Os sistemas adesivos testados apresentaram diferentes comportamentos in vitro
- Os *primers* dos sistemas adesivos Clearfil Protect Bond e One Coat SE Bond apresentaram ação antimicrobiana sobre todos os microrganismos testados, apresentando os melhores desempenhos in vitro na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, W. M.; CAWSON, R. A. Clinical and oral microbiology. **Washington Hemisphere Publishing** v. 3, p. 474-8, 1998.
- ANUSAVICE, K. J. **Phillips: Materiais dentários**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 312p, 1998.
- AHN, S. J.; LEE, S. J.; KOOK, J. K.; LIM, B. M. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. **Dental Materials**, v. 25, p. 206-13, 2009.
- ARENDS, J.; RUBEN, J.; DIJKMAN, A. G. The effect of fluoride release from a fluoride-containing composite resin on secondary caries: An in vitro study. **Quintessence Int**, v. 21, p. 671-4, 1990.
- BEIGHTON, D.; LYNCH, E. Comparison of selected microflora of plaque and underlying carious dentin associated with primary root carious lesions. **Caries Research**, v. 29, p.154, 1995.
- BOWEN, R. L. Properties of a silica-reinforced polymer for a dental restorations. **The Journal of the Dental Association**, v. 66, p. 71-8, 1963.
- BRANNSTRÖM, M.; NYBORG, H. The presence of bacteria in cavities filled with silicate cement and composite resin materials. **Swedish Dent J**, v. 74, n. 3, p.149-55, 1971.
- BUONOCORE, M. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. **J Dent Res**, v. 34, n. 6, p. 849-53, 1955.
- CAMPOS, L. M. **Avaliação da fenda e microinfiltração marginal em restaurações de classe II de resina composta, usando as técnicas direta e indireta**. Araraquara, 2001. Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (FNCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard, Ninth Ed., M2-A9, 2006.

COHEN, W. J.; WILTSHIRE, W. A.; DAWES, C.; LAVELLE, C. L. Long-term in vitro fluoride release and re-release from orthodontic bonding materials containing fluoride. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.124, p.571-6, 2003.

DEMUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; PEUMANS, M.; POITEVIN, A.; LAMBRECHTS, P.; BRAEN, M.; VAN EVRENOL B. I.; KUCUKKELES, N.; ARUN, T., YARAT, A. Fluoride release capacities of four different orthodontic adhesives. **J Clin Pediatr Dent**, v. 23, p. 315-9, 1999.

LI, F.; CHEN, J.; CHAI, Z.; ZHANG, L.; XIAO, Y.; FANG, M.; MA, S. Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. **Journal of Dentistry**, v. 37, p.289-96, 2009.

HOSHINO, E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. **Journal of Dental Research**, v.64, p.1195, 1985.

IMAZATO, S.; TORII, Y.; ISUCHITANI, Y.; MCCABE, J. F.; RUSSELL, R.R. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. **J Dent Res**, v. 73, p.1437-43, 1994.

IMAZATO, S.; RUSSELL, R. R. B.; MCCABE, J. F. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. **J Dent**, v.23, p.177-81, 1995.

IMAZATO, S.; IMAI, T.; EBISU, S. Antibacterial activity of proprietary self-etching primers. **Am J Dent**, v.11, p.106-8, 1998.

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

JEDRZYCHOWSKI, JR.; CAPUTO, A. A.; KERPER, S. Antibacterial and long-mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. **J Oral Rehabil**, v. 10, p. 373-81, 1983.

KENSHIMA, S.; FRANCCI, C.; REIS, A.; LOGUERCIO, A. D.; RODRIGUES-FILHO, L. E. Conditioning effect on dentin, resin tags and hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer. **Journal of Dentistry**, v. 34, p. 775-83, 2006.

KHALICHI, P.; SINGH, J.; CVITKOVITCH, D.G.; SANTERRE, J.P. The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of *Streptococcus mutans* gene expression. **Biomaterials**, v. 30, p. 452-9, 2009.

MARSH, P.D.; MARTIN, M. V. Oral Microbiology. London: 23. In: ATÇAS, C.EHRELIZ, SENER B. **Antibacterial activity of Chapman Hall**, p.16-7, 1992.

MEIERS, J. C.; MILLER, G. A. Antibacterial activity of dentin bonding systems, resin-modified glass ionomers and polyacid-modified composite resins. **Oper Dent**, v.21, n.6: 257-64, 1996.

MJÖR, I. A. The reason for replacement and the age of failed restorations in general dental practice. **Acta Odontol Scand**, v.55, p.58-63, 1997.

REIS, A.; GRANDI, V.; CARLOTTO, L.; BORTOLI, G.; PATZLAFF, R., RODRIGUES, A. *et al*. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. **Journal of Dentistry**, v.33, p.549-59, 2005.

ROULET, J. F.; NOACK, M. J. Criteria for substituting amalgam with composite resins. **Int Dent J**, v. 41, p.195-205, 1991.

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

SCHERER, W. *et al.* Antimicrobial properties of VLC liners. **J Esthet Dent**, v. 2, p.31-2, 1990.