



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Odontologia**

**Paula Nunes Guimarães Paes**

**Estudo *in vitro* do efeito antibacteriano e resistência à tração  
diametral de cimentos resinosos incorporados com diacetato de  
clorexidina**

**Rio de Janeiro**

**2022**

Paula Nunes Guimarães Paes

**Estudo *in vitro* do efeito antibacteriano e resistência à tração diametral de cimentos resinosos incorporados com diacetato de clorexidina**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Dentística.

Orientadores: Prof. Dr. Mauro Sayão de Miranda  
Prof. Dr. Hélio Rodrigues Sampaio Filho

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

P126 Paes, Paula Nunes Guimarães.  
Estudo *in vitro* do efeito antibacteriano e resistência à tração diametral de cimentos resinosos incorporados com diacetato de clorexidina/ Paula Nunes Guimarães Paes . - 2022.  
67 f.

Orientadores: Mauro Sayão de Miranda.  
Hélio Rodrigues Sampaio Filho.

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Cimentos dentários. 2. Clorexidina. 3. Resistência a Tração. 4. Streptococcus mutans I. Miranda, Mauro Sayão de. II. Sampaio Filho, Hélio Rodrigues. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU  
616.314

Bibliotecária Diana Amado Baptista dos Santos CRB7/6171

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Paula Nunes Guimarães Paes

**Estudo *in vitro* do efeito antibacteriano e resistência à tração diametral de cimentos resinosos incorporados com diacetato de clorexidina**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Dentística.

Aprovada em 15 de setembro de 2022.

Orientadores:

Prof. Dr. Mauro Sayão de Miranda  
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Hélio Rodrigues Sampaio Filho  
Faculdade de Odontologia – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Rogério Luiz de Oliveira Mussel  
Faculdade de Odontologia - UERJ

---

Prof. Dr. Rudá França Moreira  
Faculdade de Odontologia – UERJ

---

Prof. Dr. João Luiz Portella Duarte  
Faculdade de Odontologia – UERJ

---

Prof. Dr. Eduardo Moreira da Silva  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Signorelli Calazans  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

## DEDICATÓRIA

Ao meu amor, Rafael de Luna, e aos meus filhos, Antônio e Gustavo dedico esse trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiro aos meus familiares, meus pais Lucy e Paulo, meu irmão Daniel, a Paula, a minha sogra Martha, minha tia Deise e aos meus sobrinhos pelo apoio incondicional.

Ao professor Mauro Sayão meu querido orientador que sempre me apoiou e me ensinou muito durante todo o curso.

Ao professor e orientador Hélio Rodrigues (Helinho) que esteve presente na minha vida acadêmica toda com muito carinho e contribuições maravilhosas para meu desenvolvimento.

À coordenadora do programa de pós graduação em odontologia da UERJ professora Luciana Sassone, a secretária da pós Denise e a todos os professores que foram tão importantes para mim Tatiane Fidalgo, Emanuel, Eduardo Veras, Rudá Moreira, Thiago Moitrel, João Portella e Rogério Mussel

Ao diretor da faculdade de odontologia da UERJ Ricardo Fisher e a vice diretora Angela.

A todos os amigos e colegas da UERJ que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho como a técnica do laboratório Bárbara, os professores Guilherme e Louisy da microbiologia UERJ, os professores da FO Cláudio Malizia, Gustavo Ribeiro, Georgiana (Gigi), Mayla, Mayra, Daniela Navarro, Carolina, Amanda, Ana Flávia, Sarah, Nancy, César e todos os demais professores dos núcleos de procedimentos clínicos integrados 1 e 2 da UERJ pela parceria.

As meninas super poderosas da especialização de dentística da UFRJ meu profundo amor e agradecimento cheio de saudades Thayla, Thayná e Laisa.

Ao professor Eduardo Moreira e toda sua equipe da UFF em especial ao técnico José Maria pelo apoio e ajuda imprescindível do laboratório LABion-R.

Aos meus queridos colegas e parceiros do CEO de SG por tornarem meus dias de trabalho mais leves e incrivelmente alegres ao coordenador Dro Famarion, Janaína, os colegas Maristela, Delcio, Camilla, Thamiris, Thais, Fernanda, Renata e aos amigos Aluisio e Ulisses, as auxiliares Josy, Raquel e Gisele e aos futuros dentistas Luisa, Daniel e Raissa. Vocês são maravilhosos!!!

## RESUMO

PAES, Paula Nunes Guimarães. *Estudo in vitro do efeito antibacteriano e resistência à tração diametral de cimentos resinosos incorporados com diacetato de clorexidina*. 2022. 67 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da incorporação de diacetato de clorexidina (DCHX) tanto na ação antibacteriana sobre o *Streptococcus mutans* quanto na resistência à tração diametral de cimentos resinosos duais. Foram testados os cimentos RelyX U200 e RelyX Ultimate com e sem a incorporação de 1% de DCHX através de difusão em ágar e pelo ensaio mecânico de compressão diametral. Os grupos experimentais foram quatro, sendo Grupo 1 o cimento RelyX U200, o Grupo 2 o cimento RelyX U200 acrescido de 1% de DCHX, Grupo 3 com o cimento RelyX Ultimate e Grupo 4 com o RelyX Ultimate acrescido de 1% de DCHX. Os resultados paramétricos foram submetidos à análise de variância e ao teste t de student (post-Hoc) nos casos em que a diferença entre grupos foi apontada. Todos os corpos de prova com DCHX apresentaram halo de inibição variando de 0,80 a 1,15 mm para o RelyX U200 e de 0,80 a 1,20 mm para o RelyX Ultimate. Através do teste ANOVA com  $p=0,583$  não houve diferença significativa entre os grupos. O segundo dia (48h) foi o que apresentou maior atividade antibacteriana para ambos os cimentos. A incorporação de DCHX aos cimentos resinosos RelyX U200 e RelyX Ultimate, na concentração testada de 1% e por um período de até 2 dias, apresentaram resultados positivos no controle bacteriano de *S mutans*. Já do ponto de vista da propriedade mecânica dos cimentos não houve diferença entre os valores médios de resistência à tração diametral (RTD) dentre os grupos com e sem DCHX. Dentro das limitações deste estudo pode-se concluir que: houve efeito inibitório ao *S mutans* com a incorporação de 1% em concentração do DCHX; a associação do DCHX com os cimentos resinosos não alterou a capacidade da ação antibacteriana da CHX e que o DCHX incorporado aos cimentos resinosos na concentração de 1% não diminuiu a resistência a tração diametral dos cimentos resinosos, independente do cimento testado.

Palavras-chave: Cimento resinoso. Clorexidina. *Streptococcusmutans*. Resistência à tração diametral.

## ABSTRACT

PAES, Paula Nunes Guimarães. *In vitro study of the antibacterial effect and diametral tensile strength of resin cements incorporated with chlorhexidine diacetate*. 2022. 67 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The aim of this study was to test the antibacterial capacities and diametral tensile strengths of two commercially available resin cements to which chlorhexidine diacetate was added. The cements were then compared to the same unmodified cements. Thirteen cylindrical samples were prepared from either two resin cements or the same cements modified by the addition of chlorhexidine diacetate at 1% w/w, with a total of 52 samples. The cements tested included Rely X U200 and RelyX Ultimate. There were four experimental groups, with Group 1 using RelyX U200 cement, Group 2 using RelyX U200 cement plus 1% DCHX, Group 3 using RelyX Ultimate cement and Group 4 using RelyX Ultimate plus 1% DCHX. Three samples from each group were assessed for antibacterial properties against *Streptococcus mutans* with an agar diffusion test. Ten samples of each cement, with and without chlorhexidine diacetate, were also tested 1 day after the initial setting for their diametral tensile strength applied with an EMIC machine. The results were analyzed using either oneway anova and T student test. The addition of chlorhexidine diacetate resulted in resin cements with antibacterial properties that persisted through for up to 48 hours. The addition of chlorhexidine did not reduce the diametrical strength of the cements  $p=0.583$ . Even within the limitations of this study, it is possible to conclude that the addition of chlorhexidine diacetate to resin cements rendered all cements antibacterial against *S. mutans*. It was also possible to conclude that the DCHX incorporated into resin cements at a concentration of 1% did not compromised their 24 h diametral tensile strength, regardless of the cement tested.

Keywords: Resin cements. Chlorhexidine. *Streptococcus mutans*. Diametral Tensile Strength.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição dos corpos de prova de cada grupo nas 3 placas de petri independentes.....	24
Figura 2 –	Desenho experimental.....	25
Figura 3 –	Pó diacetato de clorexidina.....	26
Figura 4 –	Cimentos resinosos.....	30
Figura 5 –	Pasta base do cimento resinoso.....	31
Figura 6 –	Matriz para confecção dos corpos de prova.....	32
Figura 7 –	Corpos de prova.....	33
Figura 8 –	Placa de BHI ágar.....	34
Figura 9 –	Inoculação da placa.....	35
Figura 10 –	Placa com corpos de prova.....	36
Figura 11 –	Ensaio de compressão diametral.....	37
Figura 12 –	Resultado após 48 horas (placa 2).....	41
Figura 13 –	Halo de Inibição em milímetros.....	42
Figura 14 –	Histograma dos valores de RTD.....	44
Figura 15 –	Resistência à tração .....	46
Figura 16 –	Resistencia à tração máxima de cada corpo de prova.....	47
Figura 17 –	Traços de fratura.....	47
Figura 18 –	Imagens representativas de corpos de prova de cada um dos grupos experimentais.....	48
Figura 19 –	Dispersão dos pontos Weibull para os grupos experimentais, mostrando suas respectivas equações das retas.....	50
Figura 20 –	Curvas de distribuição cumulativa de Weibull para cada grupo experimental.....	51
Figura 21 –	Densidade de probabilidade de falha para os 4 grupos experimentais.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Grupos experimentais.....	24
Tabela 2 –	Apresentação dos materiais utilizados segundo recomendação do fabricante, lote e composição.....	27
Tabela 3 –	Composição da pasta catalisadora do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X U200).....	27
Tabela 4 –	Composição da pasta base do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X U200).....	28
Tabela 5 –	Composição da pasta catalisadora do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X Ultimate).....	28
Tabela 6 –	Composição da pasta base do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X Ultimate).....	29
Tabela 7 –	Halo de inibição (mm) contra S mutans do RelyX U200 e RelyX Ultimate segundo o percentual de 1% DCHX incorporado.....	42
Tabela 8 –	Estatística descritiva e ANOVA.....	43
Tabela 9 –	Descritivas e Levene.....	44
Tabela 10 –	Teste t de amostras independentes.....	45
Tabela 11 –	Tamanho da amostra (N), coeficiente linear e Parâmetros de Weibull de cada grupo.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10-MDP	10-metacrilóiloxidecil di-hidrogênio fosfato
ADA	American dental association
ANOVA	Análise de variância
BHI	Agar infusão cérebro coração
Bis-EMA	Etoxilato bisfenol-A dimetacrilato
Bis-GMA	Bisfenol Glicidil metacrilato
CHX	Clorexidina
CIV	Cimento de ionômero de vidro
DMAHDM	Dimetilaminohexadecil metacrilato
EBPADMA	Etoxilato bisfenol A dimetacrilato
EGDMA	Etilenoglicol-dimetacrilato
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GC	Grau de conversão
GMA	Éster glicidil metacrilato
HDDMA	Hexanediol dimethacrilato
ISO	International Organization for Standardization
KNH	Número de dureza Knoop
MBC	Valores de concentração
MDPB	Metacrilóiloxidodecilmiridinium bromido
Mpa	Mega pascal
N	Newtons
pH	Potencial hidrogeniônico
RTD	Resistência à tração diametral
S. Mutans	Streptococcus mutans
TEGDMA	Trietenoglicol-dimetacrilato
DCHX	Diacetato de clorexidina
RJ	Rio de janeiro
UERJ	Universidade do estado do rio de janeiro
TSA	Trypticase soy agar

UEDMA

Uretano dimetacrilato

UFC

Unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
1.1	<b>Cimentos Resinosos</b> .....	14
1.2	<b><i>Streptococcus Mutans</i></b> .....	18
1.3	<b>Clorexidina</b> .....	19
2	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	23
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	23
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	<b>Desenho do Estudo</b> .....	24
3.2	<b>Materiais</b> .....	26
3.3	<b>Confecção dos corpos de prova</b> .....	29
3.4	<b>Estudo da atividade antibacteriana</b> .....	33
3.5	<b>Ensaio Mecânico</b> .....	36
3.6	<b>Distribuição de Weibull</b> .....	38
4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	<b>Difusão em ágar</b> .....	41
4.2	<b>Resistência à tração diametral</b> .....	43
4.2.1	<u>Análise microscópica das superfícies de fratura</u> .....	46
4.2.2	<u>Distribuição de Weibull</u> .....	48
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	55
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62
	<b>APÊNDICE – Tabela do cálculo do tamanho da amostra</b> .....	67

## INTRODUÇÃO

Os primeiros cimentos resinosos desenvolvidos na década de 70 e utilizados para cimentação principalmente de restaurações metálicas são compósitos odontológicos análogos às resinas compostas restauradoras formados por partículas de carga inorgânica unidas à matriz resinosa polimérica através de agentes de união silano (1) Porém, para melhorar a reologia do material, nos cimentos resinosos a proporção de monômeros diluentes como trietilenoglicol-dimetacrilato (TEGDMA) e etilenoglicol-dimetacrilato (EGDMA) é superior em relação às resinas compostas. (2,3)

Atualmente o desenvolvimento de materiais dentários com funções bioativas e efeitos terapêuticos, é um desafio. A clorexidina (CHX) é um dos principais agentes antimicrobianos usados como solução de irrigação, agente de desinfecção cavitária e até associado a adesivos dentinários, (4) além de ter ótimos resultados *in vitro*. para incorporação aos materiais restauradores e agentes de cimentação. (5–8)

A associação da CHX ao cimento resinoso parece ser potencialmente interessante principalmente em pacientes com alto risco de periodontite, pacientes refratários aos métodos tradicionais ou em indivíduos cujo fluxo salivar esteja alterado como nos casos de pacientes que se submetem à radioterapia de cabeça e pescoço. (9)

Existem alguns estudos que utilizaram Clorexidina e Cetrimidina em cimentos convencionais e ionoméricos além da incorporação de clorexidina em adesivos dentinários com a intenção de aumentar a durabilidade da união sem detrimento das propriedades mecânicas dos materiais. (5)

Para avaliação do potencial de inibição de crescimento bacteriano em materiais dentários é usual ser realizada a técnica de avaliação de halo de inibição de crescimento bacteriano em especial da *S mutans* que é o principal agente das doenças bucais. O teste de dispersão em ágar é uma técnica simples de baixo custo e efetivo para avaliar efeitos antimicrobianos de agentes que sofram dissolução. (5)

Como todo material que passa pela adição de substâncias poderá sofrer prejuízo de suas propriedades mecânicas, após a incorporação do pó de diacetato de clorexidina é necessário investigar se as propriedades mecânicas do cimento resinoso foram alteradas, a resistência à tração diametral (RTD) em especial foi

selecionada para ser analisada pois é uma forma indireta de avaliar a qualidade das ligações intermoleculares da rede de polímero formada. (10)

Dentre as propriedades coesivas dos materiais a RTD em compósitos poliméricos frágeis pode ser diretamente relacionada às características estruturais da matriz polimérica formada, como a densidade de ligações cruzadas (cross-link) do polímero final sendo um ensaio mecânico padrão ISO, de fácil execução, com geometria simples e passível de ser adaptado para corpos de prova menores e assim adequado para testagem de materiais dentários. (11)

Apesar da variedade de cimentos disponíveis atualmente no mercado odontológico, não há um cimento ideal para todas as situações clínicas. A escolha do agente de cimentação para cada condição clínica deve ser baseada nas características físicas, biológicas e de manipulação do mesmo frente aos fatores relacionados ao remanescente dentário e a peça protética a ser cimentada. (1) Diante do exposto, esta tese propõe-se avaliar o efeito tanto na ação antimicrobiana da CHX, incorporada ao cimento resinoso, sobre um dos principais agentes microbianos da área odontológica, *S. mutans*, quanto o efeito dessa incorporação a 1% na propriedade mecânica de resistência a tração diametral de cimentos resinosos, visando contribuir para sua adequada aplicação clínica.

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Cimentos Resinosos

A partir da década de 60, os compósitos resinosos começaram a ser usados na Odontologia, com o desenvolvimento do monômero Bis-GMA. (12) Esse monômero é uma molécula longa, rígida (3) e com viscosidade elevada (2) que é usado na matriz polimérica da maioria das resinas compostas restauradoras. Com o tempo, novos co-monômeros foram adicionados para mudar as características e aumentar as formas de apresentação e indicações de uso dos compósitos dentários como resinas de baixa viscosidade, cimentos resinosos e materiais restauradores indiretos além das resinas compostas restauradoras. (3)

A parte inorgânica dos cimentos resinosos é composta por partículas de vidros, cerâmicas e/ou de sílica, que são unidas à matriz polimérica por agentes de união organo-silanos. (12) Esses agentes permitem que haja uma transferência de tensões entre as fases inorgânica e orgânica, aumentando a resistência à degradação do compósito. As partículas de carga também reduzem a contração de polimerização, a decomposição da matriz orgânica e melhoram as propriedades mecânicas dos compósitos resinosos. (13,14)

O uso de sistemas adesivos hidrófilos permitiu a utilização dos cimentos resinosos como agentes de fixação de próteses estéticas em dentina. Isso se deu graças à boa união desses cimentos aos substratos dentários e aos materiais restauradores, baixa solubilidade em água, facilidade de manipulação e estética compatível com sistemas cerâmicos e poliméricos livres de metal. (15,16) A melhora nas propriedades mecânicas dos materiais restauradores indiretos (17,18) juntamente com o aprimoramento dos agentes cimentação resinosos contribuiu para melhorar a união das restaurações estéticas indiretas à estrutura dental, promovendo maior segurança aos profissionais da odontologia no momento da cimentação. (18,19) Os cimentos resinosos têm sido amplamente utilizados na cimentação de restaurações indiretas de compósito, cerâmica e retentores intrarradiculares nos últimos anos. (16,18,20)

De acordo com a norma 4049 da International Organization for Standardization (ISO), os cimentos resinosos podem ser classificados em três tipos de ativação: Classe 1 - cimentos autopolimerizáveis, cuja polimerização é ativada pela mistura de um iniciador (peróxido de benzoíla) e um ativador (amina terciária); Classe 2 - cimentos fotoativados, que utilizam a energia de fótons de luz para formação de radicais livres; e Classe 3 - cimentos de dupla ativação, que possuem tanto aminas terciárias quanto fotoiniciador para iniciar a reação de polimerização através da ativação por luz (21,22), além de iniciadores e ativadores químicos para a polimerização. (15,16,20)

Os cimentos resinosos duais são indicados clinicamente por sua capacidade de compensar a atenuação da luz provocada pelo material restaurador interposto entre a ponta do aparelho fotoativador e o cimento, garantindo assim uma polimerização satisfatória. (15,16,20) Esse efeito dual pode variar de acordo com a composição das cerâmicas (23) e a presença de cristais de reforço (24) podendo levar a uma polimerização inadequada e alteração das propriedades físicas e mecânicas do cimento, bem como dissolução da linha de cimentação e crescimento de bactérias patogênicas. (20)

A tensão de contração dos cimentos resinosos de ativação dual ou somente química pode variar para os diferentes modos de ativação, sendo que o modo dual pode levar a uma maior tensão de contração. Isso se deve possivelmente a um menor grau de conversão no modo autopolimerizável em comparação com o modo dual dos cimentos. (25) Mesmo assim, a menor tensão de contração do cimento de ativação química é capaz de romper a adesão com a dentina.

Cardash et al. (1993) (26) avaliaram a dureza Knoop de cimentos resinosos duais foto ativados através de cerâmicas de diferentes espessuras e cores. Eles observaram que a dureza superficial foi menor ao fotoativar através de cerâmicas mais espessas e escuras devido ao provável menor grau de conversão. Uma espessura de 2 mm afetou significativamente a microdureza do cimento subjacente. O cimento resinoso fotopolimerizável não atingiu a mesma microdureza do cimento resinoso dual, portanto, este último é preferido para restaurações de porcelana de 2 mm de espessura ou mais, em termos de microdureza.

A patente de Bowen (27) descreve o desenvolvimento de um novo material restaurador estético à base do monômero Bis-GMA, que apresenta maior estabilidade dimensional e menor solubilidade do que os materiais existentes na

época, como os cimentos de silicato e as resinas acrílicas. O compósito desenvolvido por Bowen continha 70% em peso de partículas de sílica como carga inorgânica, e o monômero tetraetileno glicol dimetacrilato foi usado como diluente. O sistema de ativação desse novo material restaurador inclui a amina dimetil-p-toluidina e o peróxido de benzoíla. O material foi testado quanto a diversas propriedades, como tempo de presa, resistência à compressão, solubilidade, coeficiente de expansão térmica, contração de polimerização, estabilidade de cor e opacidade.

O estudo de Bowen (12) avaliou a influência da incorporação de sílica tratada com agente de união silano nas propriedades mecânicas de compósitos dentários. A sílica utilizada como carga nesse estudo teve grande tamanho médio em relação à matriz orgânica e representou 55% do volume final do compósito cuja matriz orgânica era composta por Bis-GMA. A incorporação de partículas silanizadas reduziu a contração de polimerização e o coeficiente de expansão térmica do compósito, além de aumentar o módulo de elasticidade e a resistência à compressão. Os compósitos com partículas silanizadas também apresentaram baixa solubilidade e desintegração em água quando comparados à resina com sílica não tratada.

Ao avaliar a polimerização das resinas dentárias por modelo numérico de análise da cinética da reação de polimerização (28) os autores utilizaram resina que consistia em 75% de Bis-GMA e 25% de TEGDMA. O modelo sugerido incluiu dados de diferentes reatividades dos monômeros e seus grupos pendentes. A maior concentração de ciclizações primárias nos polímeros formados não refletiu em aumento nas propriedades mecânicas dos polímeros finais como ocorre quando há a formação das ligações cruzadas. Os resultados mostraram que o TEGDMA tem mais capacidade de sofrer ciclização primária do que o Bis-GMA, em virtude de sua maior flexibilidade molecular além do que as ciclizações primárias ocorrem com maior facilidade em cadeias mais curtas.

Um estudo avaliou a dureza Knoop e o grau de conversão por espectroscopia infravermelha de resinas sem carga, observando um aumento dos valores com o tempo e forte correlação entre esses fatores. No entanto, não foi encontrada correlação entre as propriedades mecânicas de dureza e grau de conversão das resinas, indicando que a dureza não pode prever o grau de conversão. (10)

Em estudo de espectroscopia por FTIR o efeito dos monômeros Bis-EMA, Bis-GMA, UDMA e TEGDMA no grau de conversão de nove resinas compostas experimentais, bem como na temperatura de transição vítrea dos compósitos foram avaliados. (2) Os resultados mostraram que o TEGDMA por ter mais ligações duplas forma polímeros mais coesos com mais ligações cruzadas, enquanto o UDMA é mais viscoso e tem pontes de hidrogênio entre os grupamentos uretano e maior quantidade de ligações insaturadas do tipo carbono oxigênio que o TEGDMA e o Bis-EMA. A viscosidade dos monômeros está relacionada às reações intermoleculares e pode levar a menor mobilidade e menor flexibilidade da rede polimérica formada. A mistura Bis-GMA/UDMA e Bis-GMA/TEGDMA apresentaram aumento na temperatura de transição vítrea em relação aos monômeros separadamente, possivelmente devido à rigidez e alta polaridade do Bis-GMA.

A influência dos monômeros Bis-GMA e UDMA, juntamente com o diluente TEGDMA, na contração de polimerização, no grau de conversão e na resistência à flexão de resinas compostas experimentais foi analisado. (29) As resinas formadas pelo monômero UDMA apresentaram menores quantidades de monômeros residuais do que as resinas com Bis-GMA. A adição de TEGDMA reduziu a liberação de monômeros não reagidos, mas levou a baixa resistência à flexão, possivelmente devido ao fenômeno de ciclização primária do co-monômero. A contração de polimerização foi maior para o monômero UDMA e também aumentou com o aumento da quantidade de TEGDMA. Não houve diferença estatística na resistência à flexão das resinas formadas pelos monômeros UDMA e Bis-GMA.

A utilização de monômeros com grupos funcionais, como o 10-MDP, simplificou o número de passos clínicos na união química com as estruturas dentárias e possibilitou maior controle da desmineralização da dentina em relação ao passo de condicionamento ácido com ácido fosfórico. Isso levou ao desenvolvimento de cimentos resinosos autocondicionantes, seguindo o sucesso dos agentes adesivos com primers autocondicionantes. (1)

O MDPB é um monômero análogo do cloreto de cetilpiridina, com forte atividade bactericida contra bactérias aeróbias e anaeróbias, além de atividade antifúngica. Ele não afeta negativamente as células humanas nem a capacidade de união adesiva do material restaurador, mesmo em baixas concentrações, e uma vez que quando não polimerizado, monômero antibacteriano que é lixiviado atua como um bactericida livre semelhante aos antimicrobianos convencionais. (5,30)

A incorporação de diacetato de CHX a 1% é ideal para uso clínico em cimentos de ionômero de vidro, pois apresenta atividade antibacteriana, perfil de liberação do agente, propriedades e capacidade de adesão aos substratos dentários satisfatórios, sem afetar significativamente a resistência à compressão e a força de união à dentina. Cimentos resinosos autocondicionantes apresentaram efeitos antibacterianos em intervalos de 1 hora e 24 horas, e alguns como o Bis-Cem apresentaram efeito duradouro em até uma semana em teste de contato direto. O cimento resinoso dual autocondicionante U200 promove a desmineralização e descontaminação dos substratos, mas não tem um efeito antibacteriano a longo prazo após sua presa. (30–34)

Recentemente, o monômero DMAHDM foi testado em compósitos resinosos experimentais e apresentou atividade antibacteriana satisfatória, mas piorou as propriedades mecânicas das resinas. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar citotoxicidade, resistência bacteriana, favorecimento de espécies cariogênicas e propriedades mecânicas. (35)

Na literatura é possível atestar que houve tentativas de incorporação de agentes antimicrobianos a cimentos resinosos, mas não há evidência científica suficiente de estudos *in vitro* sem viés ou estudos clínicos randomizados *in vivo* atestando sua eficácia. Principalmente em relação a formação de biofilmes ou crescimento de colônias de *S. Mutans*. (5)

## 1.2 ***Streptococcus mutans***

O *Streptococcus mutans* possui a capacidade de formar biofilmes sobre superfícies sólidas no organismo hospedeiro, aumentando sua patogenicidade e facilitando a colonização de outras espécies bacterianas. A formação do biofilme é dependente da película adquirida a partir de proteínas do hospedeiro, e o papel do *Streptococcus mutans* na dinâmica do biofilme dentário é bem estabelecido devido à sua capacidade de aderência tanto à superfície dentária quanto entre microrganismos. Mais de 700 espécies bacterianas já foram associadas ao biofilme dentário. (30,36)

Biofilmes formados por bactérias apresentam padrões de crescimento, fenótipo e expressão genética distintos em comparação com as mesmas espécies quando encontradas no estado planctônico. A presença de *Streptococcus mutans* no biofilme dentário é bem estabelecida, e sua capacidade de adesão é importante na dinâmica de formação do biofilme. Níveis de fluoreto em materiais restauradores não parecem influenciar os níveis de bactérias cariogênicas no biofilme associado após um ano em boca. A clorexidina é um agente antibacteriano que tem se destacado no estudo de agentes capazes de impedir a formação ou maturação do biofilme. (30,34,37)

### 1.3 Clorexidina

A clorexidina (CHX) é um agente antisséptico criado nos anos 40 e utilizado na odontologia por sua eficácia antimicrobiana e baixa toxicidade. (38) A molécula de CHX é simétrica e possui duas bisbiguanidinas catiônicas ligadas a uma cadeia central de hexametileno. A CHX é disponibilizada em diferentes formas de sal, como o dihidrobromato, dinitrato, sulfato, carbonato, hidrocloreto, digluconato e o diacetato, que possuem variações quanto à solubilidade e ponto de fusão. (9) Na odontologia, a CHX é usada para combater doenças biofilme dependentes e é compatível com moléculas iônicas, como a hidroxiapatita e proteínas salivares. Contra doenças biofilme dependentes o uso de soluções e géis de CHX é sempre associado a procedimentos mecânicos de remoção e desorganização do biofilme. (9)

A clorexidina é um excelente antisséptico que pode agir como bactericida em altas concentrações ou bacteriostático em baixas concentrações. Ela causa dano celular fixando-se à célula bacteriana e induzindo o extravasamento de componentes intracelulares. (39) O uso de CHX por mais de 50 anos não tem sido associado ao surgimento de cepas resistentes, ao contrário de outros antimicrobianos como o fluconazol. (40)

A American Dental Association ADA e a Food and Drug Administration FDA autorizaram o uso da clorexidina na odontologia para controle de placa e combate à gengivite. Nos últimos anos, novas formas de clorexidina têm sido desenvolvidas,

como a associação com o zinco (41) e sua incorporação em cimentos ósseos, para melhorar a liberação de agentes terapêuticos e reduzir as taxas de infecção após cirurgias ósseas. (42)

Além disso, na dentística, devido a potente ação de inibição às matriz metaloproteinases (MMP-2, MMP-8 e MMP-9) e consequente proteção das fibrilas de colágeno da dentina, o uso da clorexidina tem sido proposto na aplicação integrada a procedimentos adesivos, com o objetivo de melhorar a longevidade da adesão dentinária. (4,43,44)

A atividade antibacteriana de *S. mutans* e *L. casei* em ágar, a rugosidade superficial, a resistência à flexão, e solubilidade de cimentos dentários a base de fosfato de zinco, policarboxilato de zinco e ionômero de vidro após adição de 2,5% de diacetato de clorexidina e 2,5% de cetrimidina foi avaliada. (6) Os autores observaram formação halo de inibição de todos os grupos tanto de fosfato de zinco quanto de CIV com os agentes antimicrobianos em comparação com os mesmos grupos de cimento controle após 24h. As propriedades mecânicas de resistência à flexão apenas para o CIV houve redução quando adicionado clorexidina e cetrimidina. Já a solubilidade não aumentou para o CIV e para o cimento de fosfato de zinco. Os achados também indicam que a adição dos agentes antibacterianos diminuiu os valores de rugosidade superficial médios ( $R_a$ ) do cimento de fosfato de zinco e do policarboxilato, enquanto o valor de  $R_a$  aumentou para CIV. Segundo os autores a redução do  $R_a$  poderia ser explicada pela alta união e forte afinidade química do aditivo quaternário de amônio à matriz salina derivada do ácido poliacrílico. Uma das aplicações clínicas apontadas no artigo relaciona que a menor solubilidade e propriedades antibacterianas aumentadas do cimento de fosfato de zinco mesmo com resistência à flexão diminuída podem ser úteis clinicamente para coroas provisórias quando a cimentação prolongada é necessária.

O efeito *in vitro* da ação antibacteriana de CIVs convencionais incorporados de DCHX sobre o *S. mutans* nos percentuais 0,5%, 1% e 2% foram avaliados através da difusão em ágar. Todos os grupos com DCHX formaram halo de inibição e não houve diferença entre os tamanhos dos halos de 0,5% e 1% e ação antibacteriana durou por 15 dias. (7)

O estudo de Tuzuner et al. (2011) (8) avaliou a atividade antibacteriana da incorporação de clorexidina e cetrimidina em CIV contra *S. mutans* e *L. casei*, e observou a formação de halo inibitório apenas nos grupos com os antimicrobianos. A

redução da microdureza superficial foi de 16% a 26%, mas os autores afirmaram que essa medida não é suficiente para avaliar a longevidade dos CIVs, e sugeriram o uso de outros ensaios mecânicos para obter resultados mais abrangentes.

A liberação de fluoretos por materiais dentários ionoméricos é reconhecida como um importante aliado para prevenção de cáries secundárias ao redor das restaurações, porém devido às propriedades mecânicas inferiores dos ionômeros, o uso dos cimentos resinosos é preferível por proporcionar resistência superior à fratura de coroas cerâmicas em relação aos cimentos de ionômero de vidro e fosfato de zinco. (17,31) Porém a propriedade mecânica dos cimentos resinosos é dependente do grau de conversão final das duplas ligações (GC) dos cimentos. (16,23) É esperado que um menor GC do cimento resinoso promovesse diminuição na dureza, na resistência à flexão, no módulo de elasticidade e na resistência à tração diametral dos cimentos resinosos. (28) Porém tais propriedades mecânicas são muito mais dependentes da estrutura tridimensional e da densidade da rede polimérica formada. E tais características não são equivalentes ao grau de conversão das duplas ligações entre monômeros. (10)

A afirmação anterior é corroborada pelos resultados de trabalho onde foi apontado que materiais com a mesma composição, dependendo da forma de ativação e formação das cadeias, podem possuir superiores propriedades mecânicas, como a RTD, independente do GC obtido. (45)

Dentro das limitações de uma revisão sistemática com meta análise de estudos laboratoriais e avaliações clínicas randomizadas, a evidência in vitro atual sugere que a união dentinária e desempenho de adesivos universais pode ser melhorado pela incorporação de agentes antimicrobianos como a clorexidina. (46)

Compósitos restauradores experimentais a base de BisGMA, hexanediol dimethacrilato (HDDMA), ethoxilato bisfenol A dimetacrilato (EBPADMA) e uretano dimetacrilato (UEDMA) na proporção em peso de 40:30:20:10 com partícula de carga de sílica foram adicionados de diacetato de clorexidina na proporção de 3%, 5% ou 6,3% incorporados diretamente ou como nano partículas de sílica mesoporosas revestidas de clorexidina e os resultados mostraram liberação controlada de CHX por um longo tempo além de forte inibição para *S. mutans* e *L. casei* para todos os grupos. Já com relação as propriedades, os compósitos com CHX diretamente misturados mostraram propriedades mecânicas reduzidas e superfícies ásperas o que segundo os autores corrobora para a utilização de sílica

mesoporosa como veículo para incorporação de diacetato de clorexidina nas proporções em peso utilizadas nesse estudo. (47)

Como os cimentos autocondicionantes contêm monômeros funcionais ácidos e podem ser utilizados tanto no modo autocondicionante (U200) quanto no modo dito universal (total-etch/autocondicionante), como no caso do cimento RelyX Ultimate, é necessário investigar o comportamento desses cimentos acrescidos de DCHX assim como os adesivos e primers universais foram avaliados e obtiveram ótimos resultados. (5)

## 2 PROPOSIÇÃO

As finalidades desta pesquisa fundamentam-se nos seguintes objetivos:

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito da incorporação de 1% de diacetato de clorexidina cristalina (DCHX) em cimentos resinosos duais.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar se há efeito antimicrobiano dos cimentos resinosos incorporados com DCHX na concentração de 1%;
- b) Testar a hipótese nula ( $H_0$ ) que o efeito antimicrobiano dos cimentos resinosos incorporados com DCHX não varia segundo o tipo de cimento resinoso dual;
- c) Testar a hipótese nula ( $H_0'$ ) de que o efeito da incorporação dos cimentos resinosos com 1% de DCHX não altera a resistência a tração diametral dos cimentos resinosos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do Estudo

Os cimentos resinosos RelyX U200 e RelyX Ultimate e o pó de diacetato de clorexidina foram utilizados para formar os grupos experimentais de acordo com a tabela 1 abaixo.

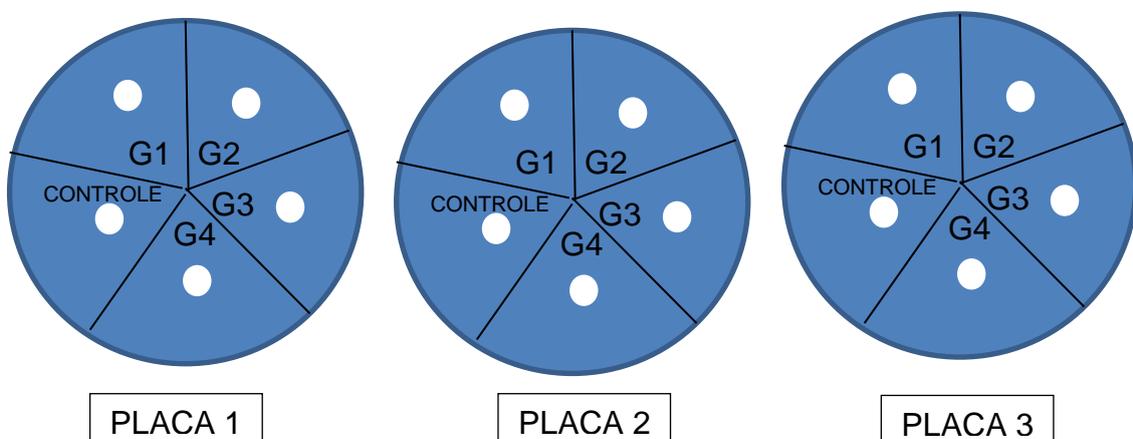
Tabela 1 – Grupos experimentais

Grupos	Descrição
<b>G1</b>	RelyX U200 puro
<b>G2</b>	RelyX U200 + 1% DCHX
<b>G3</b>	RelyX Ultimate puro
<b>G4</b>	RelyX Ultimate + 1% DCHX

Fonte: A autora, 2022.

Para avaliar a atividade antibacteriana dos cimentos resinosos sem e com DCHX foram confeccionados 3 corpos de prova de prova cilíndricos de cada um dos grupos experimentais (n=3) que foram distribuídos aleatoriamente em 3 placas de petri (experimento em triplicata) como mostra o diagrama da Figura 1.

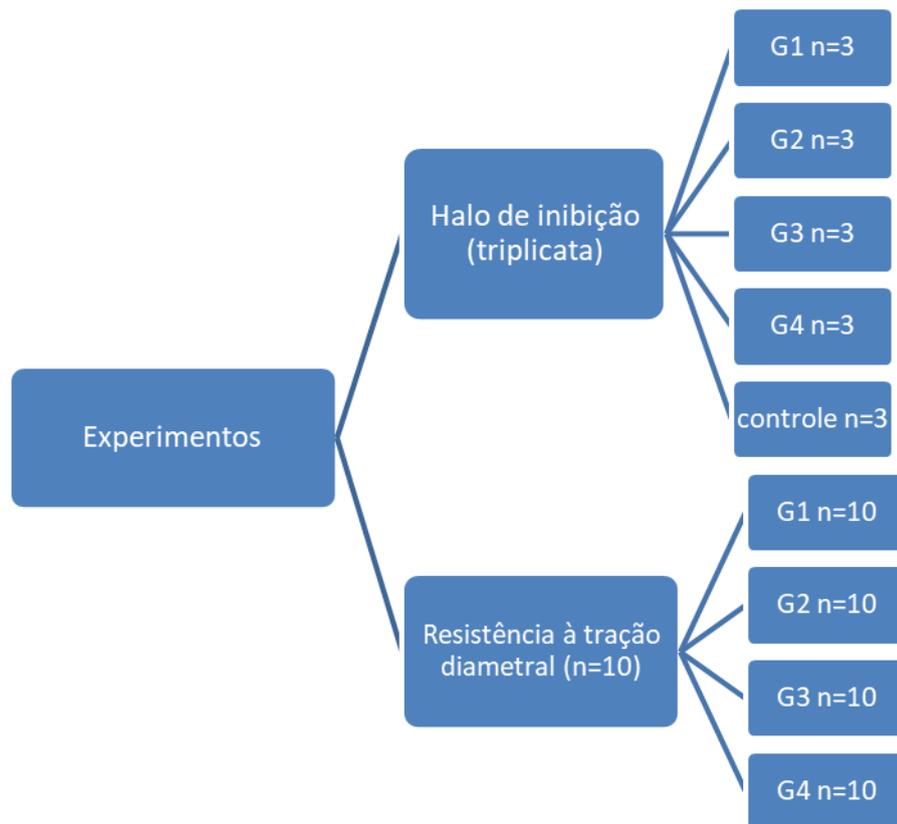
Figura 1 – Distribuição dos corpos de prova de cada grupo nas 3 placas de petri independentes



Fonte: A autora, 2022.

Para a avaliação da resistência à tração diametral média foram confeccionados 10 corpos de prova de cada grupo (n=10) submetidos ao ensaio mecânico. A distribuição dos corpos de prova para cada um dos experimentos realizados é demonstrada na Figura 2.

Figura 2 – Desenho experimental



Fonte: A autora, 2022.

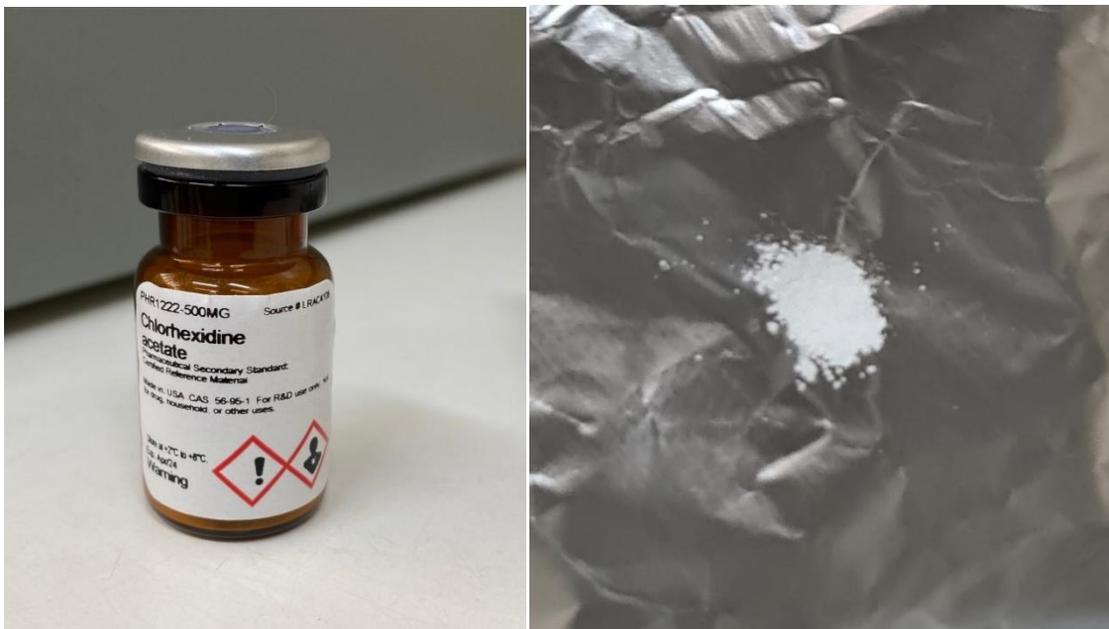
Durante a fase de planejamento dos experimentos mecânicos foi realizado o cálculo para determinar o tamanho da amostra. Para obtenção dos dados de entrada para tal, o valor da variância amostral de 7 foi determinado a partir de estudo piloto com 5 réplicas de cimento resinoso RelyX U200 e 5 réplicas do cimento resinoso RelyX Ultimate. Atribuiu-se valores de alfa de 5% e beta de 80% como demonstrado na tabela do Apêndice. Dessa forma o valor de número de réplicas foi aproximado para 10 (n=10).

### 3.2 Materiais

A atividade antibacteriana dos cimentos resinosos com DCHX foi avaliada pela inibição do crescimento de *S mutans* baseada na metodologia da difusão em ágar, cujo halo de inibição formado corresponde à atividade antibacteriana em torno do corpo de prova. (7) Para verificar se existe correlação negativa entre a resistência à tração diametral e a incorporação de DCHX a 1% no cimento resinoso, foram confeccionados corpos-de-prova para ensaio de resistência à tração diametral com 6 mm de diâmetro por 3 mm de altura. Todos os ensaios mecânicos foram realizados 24 horas após a ativação dos cimentos resinosos.

O pó de diacetato de clorexidina cristalina (DCHX) (SIGMA-ALDRICH, Alemanha), Figura 3, foi incorporado no percentual 1% a pasta base de dois cimentos resinosos (RelyX U200®, e RelyX Ultimate ®, da cor A1 e A2 respectivamente (Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6).

Figura 3 – Pó diacetato de clorexidina



Fonte: A autora, 2022.

Tabela 2 – Apresentação dos materiais utilizados segundo fabricante, lote e composição

Material	lote	composição
Diacetato de Clorexidina Cristalina (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil)		diacetato de clorexidina
RelyX U200 (3M-ESPE Dental, St. Paul, MN, USA)	8160140	Cimento Autoadesivo
RelyX Ultimate (3M-ESPE Dental, St. Paul, MN, USA)	8117155	Cimento resinoso adesivo Universal

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 3 – Composição da pasta catalisadora do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X U200)

Ingrediente (catalisador)	% por massa
Pó de vidro com superfície modificada com 2-propenóico, 2 metil-3-(trimetoxissilil) propílico.	50-70
Dimetacrilato substituída.	20-30
P-Toluenosulfonato de sódio.	< 5
Ácido 2-propanóico, 2-metil[(3-metoxipropil)imino]di-2,1-etanodiil éster.	< 2
Amina metacrilada.	< 0,5
Hidróxido de cálcio.	< 2
1,12-Dodecano dimetacrilato.	< 5
Sílica tratada de silano.	< 5
2,4,6(1H,3H,5H) Pirimidinetriona, 5-fenil-1-(fenilmetil) sal de cálcio (2:1)	< 5
Dióxido de titânio	< 0,5

Nota: Dados segundo informação do fabricante.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 4 – Composição da pasta base do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X U200)

Ingrediente (pasta base)	% por massa
Pó de vidro com superfície modificada com 2-propenóico, 2 metil-3-(trimetoxissilil) propílico e feniltrimetoxi silano	45-55
2-Ácido propenóico, 2-metil-,1,1'-[1-(hidroximetil)-1,2-etanodiil] éster.	20-30
Dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA).	10-20
Sílica tratada por silano.	1-10
Persulfato de sódio.	< 3
Óxidos de vidro químico (não fibrosos).	< 3
Terc-butil 3,5,5-trimetil peroxihexanoato.	< 0,5
2,4,6(1H,3H,5H) Pirimidinetriona, 5-fenil-1- (fenilmetil) sal de cálcio (2:1).	< 5
Dióxido de titânio.	< 0,5

Nota: Dados segundo informação do fabricante.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 5 – Composição da pasta catalisadora do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X Ultimate)

Ingrediente (pasta catalisadora)	% por peso
Pó de vidro N <sup>o</sup> . CAS (65997-17-3), superfície modificada com 2-propenóico, 2metil-.3- (trimetoxissilil) propílico (2530-85-0), material a granel	55 - 65
Dimetacrilato substituída 27689-12-9	20 - 30
2,4,6(1H,3H,5H) Pirimidinetriona, 5-fenil-1- (fenilmetil) sal de cálcio (2:1)	1 - 10
1,12-Dodecano dimetacrilato	< 5
Ácido 2-Propenóico, 2-Metil-, 2-[(2- Hidroxietil)(3-Metoxipropil)Amino]Etil Éster	< 0,5
Sílica tratada de silano	< 5
P-Toluenosulfonato de sódio	< 5
Dióxido de titânio	< 0,5
Ácido 2-propanóico, 2-metil[(3-metoxipropil)imino]di-2,1-etanodiil éster	< 2
Hidróxido de cálcio	< 2

Nota: Dados segundo informação do fabricante.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 6 – Composição da pasta base do cimento resinoso autoadesivo (Rely-X Ultimate)

Ingrediente	% por peso
Pó de vidro (65997-17-3), superfície modificada com 2-propenóico, 2 metil-3- (trimetoxissilil) propílico (2530-85-0) e feniltrimetoxi silano (2996-92-1), material a granel	50 - 60
2-Propanóico, 2-Metil-, 1,1 '- [1- (Hidroximetil) -1,2-Etanodiilo] Ester, Produtos Da Reação com 2-Hidroxi-1,3-Propanodiilodimetacrilato e Óxido de Fósforo	20 - 30
Dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA)	10 - 20
Sílica tratada de silano	5 - 10
Óxidos de vidro químico (não fibrosos)	< 3
Persulfato de sódio	< 1.0
Terc-butil 3,5,5-trimetil peroxihexanoato	< 0,5
4 Ácido acético, sla de cobre (2+) monohidratado	< 0,1

Nota: Dados segundo informação do fabricante.

Fonte: A autora, 2022.

A quantidade dos cimentos resinosos para cada corpo de prova foi padronizada a partir da unidade de medida do corpo de prova, cujo valor de referência para ambos os materiais foi de 0,07 gramas para os corpos de prova do ensaio de crescimento de *S. Mutans* em ágar e de 1,7 gramas para o teste de resistência à tração diametral (RTD), pesados em balança analítica de precisão de 0,1 mg. As quantidades de DCHX foram calculadas a partir do valor padronizado do cimento resinoso, correspondente ao percentual de 1% deste valor.

### 3.3 Confeção dos corpos de prova

Os cimentos Rely-X U200 e RelyX Ultimate são apresentados em forma pasta-pasta com sistema clicker que possibilita a proporção exata de quantidades das pastas base e ativadora (Figura 4).

Figura 4 – Cimentos resinosos



Fonte: A autora, 2022.

O DCHX, já pesado, foi inicialmente dissolvido na base do cimento resinoso, por um único operador, em ambiente laboratorial onde a temperatura foi mantida a  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  utilizando bloco de manipulação fornecido pelo fabricante do cimento resinoso e espátula 24 de aço inox (Figura 5).

Figura 5 – Pasta base do cimento resinoso



Fonte: A autora, 2022.

Os corpos de prova foram confeccionados em matriz, em formato cilíndrico, nas dimensões de 6mm de diâmetro por 3mm de altura. Após a manipulação, o material (cimento resinoso ou cimento resinoso + DCHX) foi inserido em matriz (Figura 6).

Figura 6 – Matriz para confecção dos corpos de prova



Fonte: A autora, 2022.

A superfície do cimento foi recoberta com tira matriz de poliéster sob pressão digital inicial e mantida por placa de vidro, em seguida, foi aplicada pressão de 0,5 kg por 1 minuto, para permitir o escoamento do cimento e eliminar todos os excessos, proporcionando planificação da superfície do material. Os corpos de prova foram fotoativados de acordo com o fabricante por 60s com irradiância de 1200 mW/cm<sup>2</sup> congferidos antes do procedimento por um radiômetro, e comprimento de onda médio de 460 nm por aparelho led de fotoativação Raddi Cal (SDI). Os corpos de prova para estudo da atividade antibacteriana foram mantidos por 10 minutos imersos em água destilada para aguardar presa inicial química antes do início do teste de difusão em ágar. Já os corpos de prova que seriam utilizados para avaliação da RTD foram mantidos em estufa a 37°C por 24h. Posteriormente os excessos foram removidos com lâmina número 12 de bisturi e aplainados manualmente com lixa de carvão de silício de granulação 200 com água.

Figura 7 – Corpos de prova



Fonte: A autora, 2022.

### 3.4 Estudo da atividade antibacteriana

Foram preparadas placas de Petri com Trypticase Soy Agar (TSA), segundo as orientações do fabricante. Em capela de fluxo laminar, 20 mL de ágar foram transferidos para placas de Petri estéreis de poliestireno de 90x15 mm, para que fossem obtidas a espessura de 4,5 mm de meio. As tampas das placas ficaram temporariamente entreabertas para evitar a umidade em sua superfície interna. Após

a solidificação do meio, as placas foram tampadas e colocadas em estufa a 37°C, para testar sua esterilidade e depois acondicionadas em geladeira até o uso.

Para o preparo do inóculo, uma alçada de 1:100 do liofilizado da cepa ATCC 25175 de *S. mutans* foi transferida para um frasco com 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e incubado a 37°C, por uma noite (overnight). No segundo dia, com uma alça descartável, uma placa de BHI ágar foi inoculada por esgotamento e incubada 18h a 37°C (Figura 8)

Figura 8 – Placa de BHI ágar



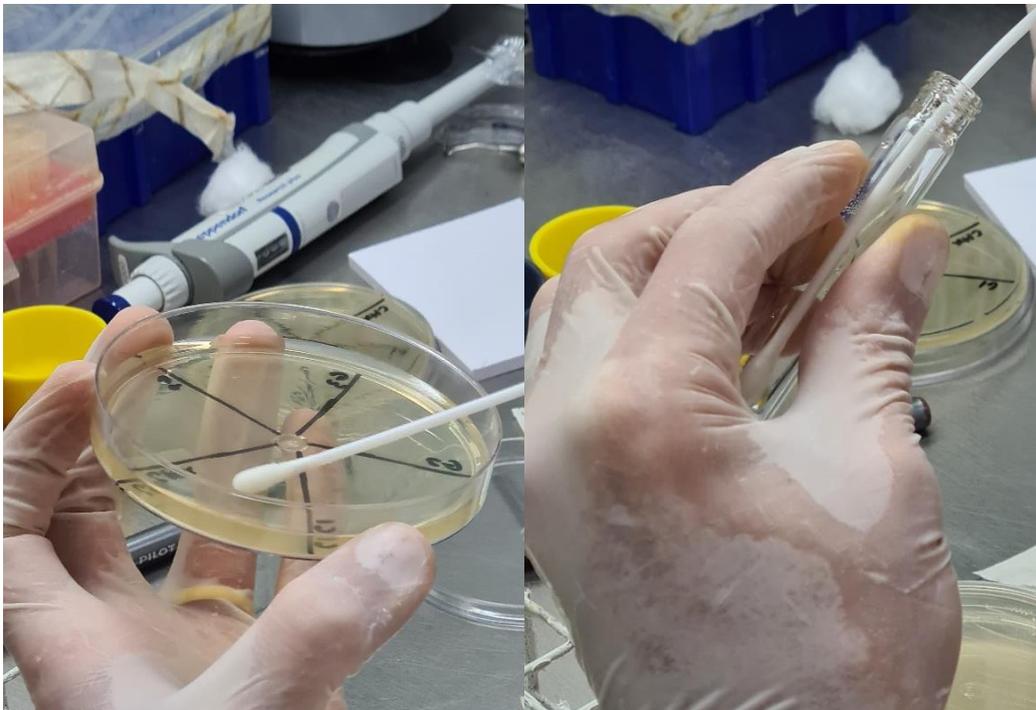
Fonte: A autora, 2022.

Após o crescimento em placa foram selecionadas cinco colônias isoladas com uma alça descartável, que em seguida foram transferidas para 5 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C, por quatro horas até alcançar a turbidez 0,5 da suspensão padrão da escala nefelométrica de Mc Farland. A turbidez foi ajustada através da determinação da absorbância ( $0,10 \pm 0,02$ ), usando um espectrofotômetro, sendo o comprimento de onda ajustado para 580 nm, de modo a obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

Para a inoculação das placas-teste, um swab de algodão estéril foi mergulhado na suspensão bacteriana por um minuto, sendo girado por pelo menos

duas vezes, calcado na superfície interna do tubo de ensaio para a remoção do excesso da suspensão bacteriana. A superfície do ágar BHI foi inoculada com o swab em toda a sua superfície estéril. Este procedimento foi repetido outras duas vezes, girando a cada vez a placa em 60°, a fim de assegurar uma distribuição uniforme do inóculo. Por fim, o swab foi passado ao longo de toda a margem da placa (Figura 9). A tampa foi deixada entreaberta por 15 min, para permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de serem colocados os corpos de prova.

Figura 9 – Inoculação da placa



Fonte: A autora, 2022.

Os corpos de prova foram aplicados à superfície inoculada das placas de ágar, através de uma pinça estéril, pressionando-os suavemente contra a placa, para que se mantivessem em íntimo contato com o ágar. Foram distribuídos três corpos de prova de cada grupo segundo a concentração de DCHX incorporado (1%), além do controle (solução salina com 1% de concentração de DCHX). Os corpos de prova foram distribuídos uniformemente na superfície de cada uma das 3 placas, sempre mantendo um afastamento de pelo menos 15 mm da margem e 30 mm de centro a centro (Figura 10).

Figura 10 – Placa com corpos de prova



Fonte: A autora, 2022.

Após 48h de incubação a 37°C, em capnofilia (5% CO<sub>2</sub>), as placas foram examinadas para avaliar o efeito antimicrobiano do material. Também foi analisada a uniformidade do crescimento bacteriano e a presença de contaminantes. As medições foram feitas diametralmente em dois pontos com um paquímetro digital calibrado (SC-6 paquímetro digital, Mitutoyo, Tóquio, Japão) e calculado o valor médio do halo para cada corpo de prova.

Cimentos resinosos com ou sem DCHX, foram testados nos tempos de 48h, todos feitos em triplicata. Os dados obtidos foram analisados no Software PSPPP (Linux) As diferenças entre os halos de inibição de S mutans formados, foram determinadas usando análise de variância de um fator (One way ANOVA). A análise estatística foi testada com nível de significância de 0,05.

### 3.5 Ensaio Mecânico

Antes da realização do ensaio, as dimensões dos corpos-de-prova foram verificadas com paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. Quatro medidas do diâmetro e da altura foram efetuadas respectivamente e os valores médios foram

considerados no cálculo dos valores de resistência à tração diametral em Mega Pascal (MPa) da Equação 1.

O ensaio de compressão para obter a resistência à tração diametral foi realizado em todos os grupos 24 horas após a confecção das amostras. As amostras foram levadas à máquina universal de ensaios EMIC num dispositivo de base reta para o ensaio de resistência à tração diametral (Figura 11). A tensão de compressão foi aplicada paralelamente ao diâmetro da amostra com velocidade constante de 1 mm/min produzindo tensões de tração perpendiculares ao plano vertical que passa pelo centro do corpo de prova, até ocorrer a fratura da amostra (Figura 11). Para evitar que pequenas irregularidades nas extremidades laterais dos corpos-de-prova pudessem produzir áreas de concentração de tensões, pedaços de papel umedecidos foram colocados entre a amostra e os apoios metálicos. (48)

Figura 11 – Ensaio de compressão diametral



Fonte: A autora, 2022.

Para o ensaio de resistência à tração diametral foram confeccionados 10 corpos de prova cilíndricos de cada material ( $6,0 \pm 0,1$  mm de diâmetro x  $3,0 \pm 0,1$

mm de altura) conforme especificação n. 27 da ANSI/ADA, de 1993. As dimensões dos corpos de prova foram verificadas com paquímetro digital. Os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C por 24 horas antes do ensaio.

Após cada ensaio de compressão, a carga máxima de fratura (F) em Newtons (N) foi registrada e a resistência à tração diametral ( $\sigma_t$ ) (em MPa) foi calculada da seguinte forma:

$$\sigma_t = 2F/\pi dh \quad (1)$$

Onde: d: diâmetro médio dos espécimes em mm; h: altura média dos espécimes em mm;  $\pi$ : 3,1416

Os dados de resistência à tração diametral (MPa) foram submetidos à Análise de Variância em esquema fatorial para tipo de cimento e incorporação de clorexidina ( $p=0,05$ ), as interações, bem como as diferenças entre os grupos, foram analisadas pelo teste de t de amostras independentes ( $p=0,05$ ).

### 3.6 Distribuição de Weibull

A equação da distribuição de Weibull utilizada foi de dois parâmetros (escala e módulo), uma vez que, para a resistência à tração, o terceiro parâmetro (localização), que por definição é o valor mínimo de Resistência (S) – para o qual a falha não ocorra (probabilidade de falha nula) – não é conhecido. Assim, o terceiro parâmetro de Weibull (localização) foi assumido como sendo zero e a equação de Weibull de dois parâmetros (Equação 2) foi utilizada, na qual S é a resistência à tração diametral em MPa e  $S_0$  e m são os parâmetros de Weibull.

$$F(S) = 1 - \exp \left[ - \left( \frac{S}{S_0} \right)^m \right] \quad (2)$$

Para estimar os parâmetros da distribuição de Weibull foi utilizado o método de regressão linear. Para tal, foi realizado o rearranjo da equação de Weibull de 2

parâmetros (Equação 2) e aplicado logaritmo natural duas vezes, obtendo-se a Equação 3.

$$\ln \left[ \ln \left( \frac{1}{PS} \right) \right] = m \ln S - m \ln S_0 \quad (3)$$

Na Equação 3, PS é a probabilidade de sobrevivência, dada por  $1/(F(S) - 1)$  e  $\ln =$  logaritmo natural neperiano,  $m =$  módulo de Weibull,  $S =$  valor de resistência a tração em Mpa e  $S_0 =$  resistência característica em MPa

Gráficos de distribuição de Weibull foram plotados e os pontos obtidos foram linearizados com objetivo de obter a equação geral da reta de cada grupo.

Para determinar os parâmetros de Weibull ( $m$  e  $S_0$ ), a Equação 3 foi relacionada com a equação geral da reta e assim  $m$  de cada grupo foi determinado a partir do valor do coeficiente angular da reta obtida pela distribuição de Weibull do grupo em questão.

O coeficiente linear da reta é  $-m \ln S_0$ . Assim, o fator de escala  $S_0$  foi determinado a partir do coeficiente linear B da reta através da Equação 4:

$$-m \ln S_0 = B \quad (4)$$

onde,  $\ln =$  logaritmo natural neperiano,  $m =$  módulo de Weibull,  $S_0 =$  resistência característica em MPa e  $B =$  coeficiente linear da reta formada a partir do gráfico de distribuição de Weibull. Isolando-se o termo  $S_0$  (parâmetro de escala de Weibull) na Equação 4, foi obtida a Equação 5 com a qual o valor do parâmetro escala de Weibull foi determinado.

$$S_0 = e^{-(B/m)} \quad (5)$$

Para calcular a probabilidade de sobrevivência das amostras foi aplicada a Equação 6 substituindo os valores de módulo e escala de Weibull, obtidos pela reta formada a partir dos gráficos de distribuição de Weibull de cada grupo.

$$PS = \exp \left[ - \left( \frac{S}{S_0} \right)^m \right] \quad (6)$$

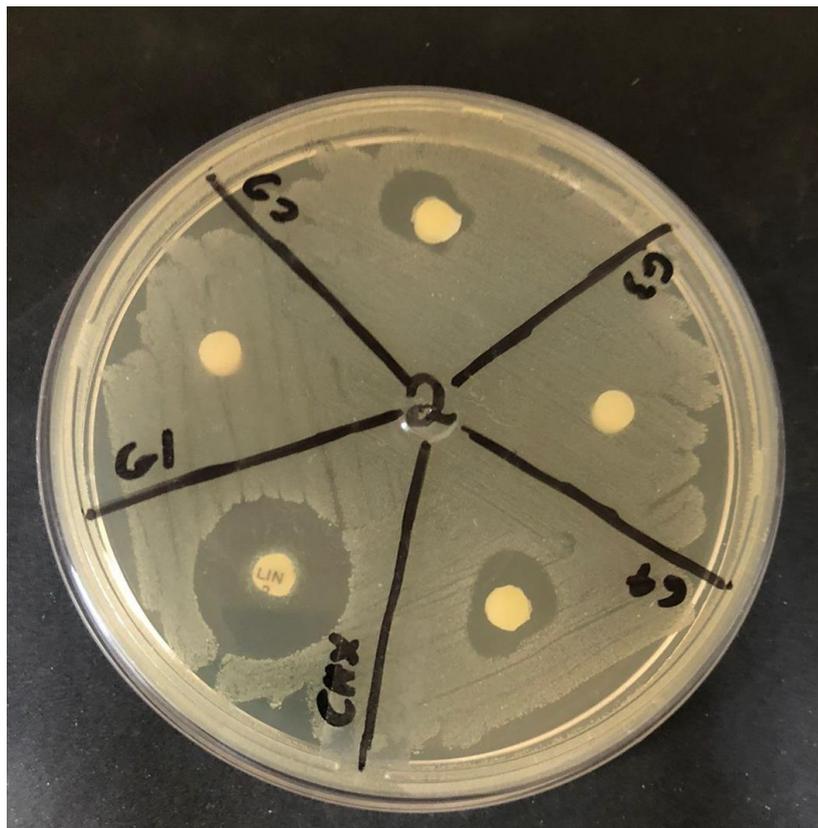
A partir dos valores de módulo e resistência característica e de probabilidade de falha e sobrevivência foram plotados gráficos para avaliação de confiabilidade e qualidade da resistência a tração dos grupos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Difusão em ágar

A formação de halo de inibição, na difusão em ágar, teve por objetivo observar a ausência de crescimento de *S* mutans. Foram observados halos ao redor dos corpos de prova de ambos os cimentos resinosos incorporados com DCHX G2 e G4, assim como no grupo controle de disco de feltro estéril incorporado com 1% de DCHX em solução salina após 48h. Apenas os grupos de cimentos resinosos sem DCHX (G1 e G3) não formaram halo. (Figura 12)

Figura 12 – Resultado após 48 horas (placa 2)



Fonte: A autora, 2022.

Os halos de inibição do cimento RelyX U200 com 1% de DCHX variaram de 0,80 mm a 1,15 mm, nas três placas e os halos de inibição do cimento RelyX Ultimate variaram de 0,80 mm a 1,20 mm quando incorporado com 1% de DCHX (Tabela 7 e Figura 13).

Tabela 7 – Halo de inibição (mm) contra S mutans do RelyX U200 e RelyX Ultimate segundo o percentual de 1% DCHX incorporado

Grupo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
G1	0	0	0	0
G2	0,97	0,18	0,80	1,15
G3	0	0	0	0
G4	1,07	0,23	0,80	1,20
DCHX	1,60	0,25	1,30	1,80

Fonte: A autora, 2022.

Figura 13 – Halo de Inibição em milímetros



Fonte: A autora, 2022.

Tabela 8 – Estatística descritiva e ANOVA

Descritivas									
grupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo	
					Intervalo inferior	Intervalo superior			
halo	3	,97	,18	,10	,53	1,40	,80	1,15	
2,00	3	1,07	,23	,13	,49	1,64	,80	1,20	
4,00	3	1,02	,19	,08	,82	1,22	,80	1,20	
Total	6	1,02	,19	,08	,82	1,22	,80	1,20	

Test of Homogeneity of Variances				
	Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
halo	,65	1	4	,467

ANOVA						
		Soma dos quadrados	df	Mean Square	F	Sig.
halo	Between Groups	,02	1	,02	,36	,583
	Within Groups	,17	4	,04		
	Total	,18	5			

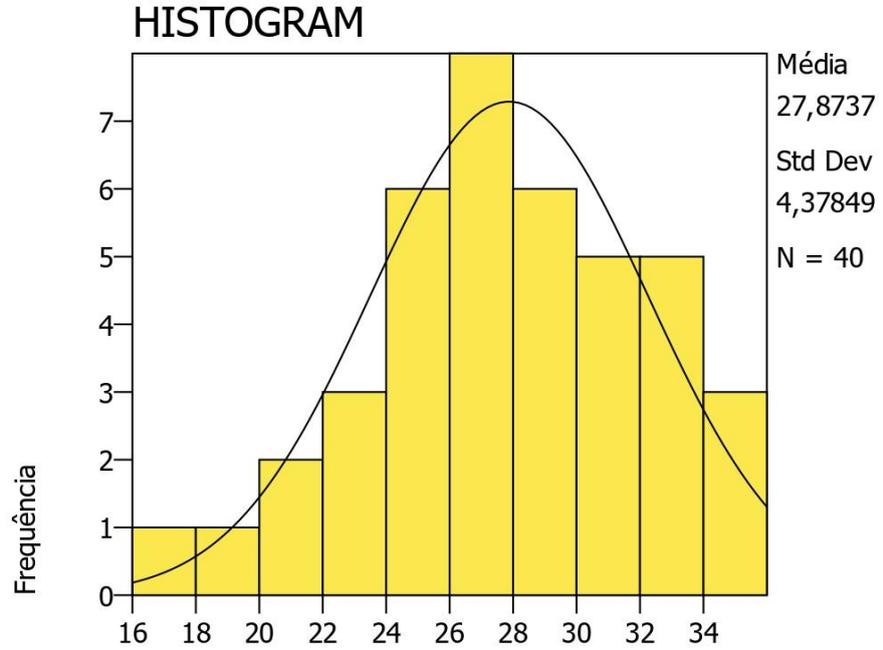
Fonte: A autora, 2022.

A diferença entre os grupos experimentais (cimento resinoso + DCHX) não foi significativa para os grupos 2 e grupo 4  $p=0,583$ . (Tabela 8)

#### 4.2 Resistência à tração diametral

A Figura 14 mostra que os resultados de RTD dos grupos G1, G2, G3 e G4 seguem uma distribuição normal e a homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de Levene da Tabela 9.

Figura 14 – Histograma dos valores de RTD



MPa  
Fonte: A autora, 2022.

Tabela 9 – Descritivas e Levene

```
ONEWAY /VARIABLES= DTS BY Group
/STATISTICS=DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/POSTHOC=TUKEY .
```

**Descritivas**

Group	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
					Intervalo inferior	Intervalo superior		
MPa 1	10	28,55	4,11	1,30	25,61	31,49	22,20	33,49
2	10	30,68	3,61	1,14	28,10	33,26	25,31	35,88
3	10	25,07	5,26	1,66	21,31	28,83	17,52	31,90
4	10	27,19	2,64	,84	25,30	29,08	24,13	33,37
Total	40	27,87	4,38	,69	26,47	29,27	17,52	35,88

**Test of Homogeneity of Variances**

	Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
MPa	3,83	3	36	,018

Fonte: A autora, 2022.

A partir desses resultados foi realizado a teste t de amostras independentes que apontou com 95% de confiança que não havia diferença entre grupos G1 e G2 (p=0,214) e entre os grupos G3 d G4 (p=0,346), como demonstrado na Tabela 10

Tabela 10 – Teste t de amostras independentes

```
T-TEST /VARIABLES= Var0001
/GROUPS=Var0002 (1,2) /MISSING=ANALYSIS
/CRITERIA=CI (0.95) .
```

**Group Statistics**

	Group	N	Média	Desvio padrão	S.E. Mean
Var0001	1,00	10	28,50	3,98	1,26
	2,00	10	30,70	3,65	1,16

**Teste de Amostras Independentes**

		Teste de Levene para Igualdade de Varianças		T-Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Var0001	Equal variances assumed	,06	,805	-1,29	18,00	,214	-2,20	1,71	-5,79	1,39
	Equal variances not assumed			-1,29	17,87	,214	-2,20	1,71	-5,79	1,39

```
T-TEST /VARIABLES= Var0001
/GROUPS=Var0002 (3,4) /MISSING=ANALYSIS
/CRITERIA=CI (0.95) .
```

**Group Statistics**

	Group	N	Média	Desvio padrão	S.E. Mean
Var0001	3,00	10	25,30	5,31	1,68
	4,00	10	27,10	2,51	,80

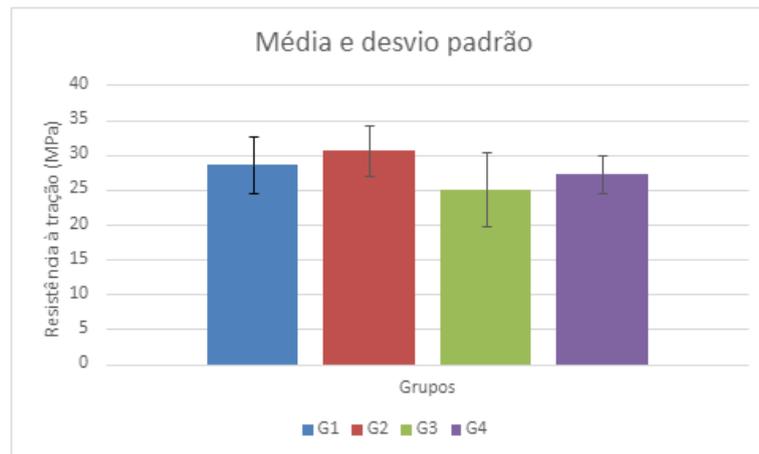
**Teste de Amostras Independentes**

		Teste de Levene para Igualdade de Varianças		T-Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Var0001	Equal variances assumed	13,18	,002	-,97	18,00	,346	-1,80	1,86	-5,71	2,11
	Equal variances not assumed			-,97	12,84	,351	-1,80	1,86	-5,82	2,22

Fonte: A autora, 2022.

O resultado final da análise estatística apontou que dentro das variáveis desse estudo a incorporação de diacetato de clorexidina na proporção de 1% em peso não alterou os valores médios da propriedade mecânica de RTD para os cimentos RelyX U200 e RelyX Ultimate (Figura 15).

Figura 15 – Resistência à tração



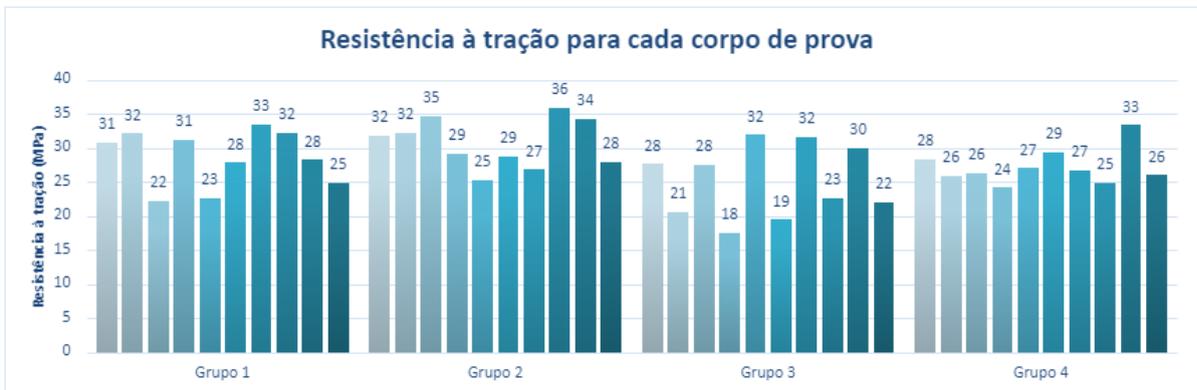
Fonte: A autora, 2022.

#### 4.2.1 Análise microscópica das superfícies de fratura

Após o ensaio mecânico, cada uma das superfícies de fratura foi analisada em lupa de 2,5 x aumento para verificar o modo de fratura e presença de defeitos críticos.

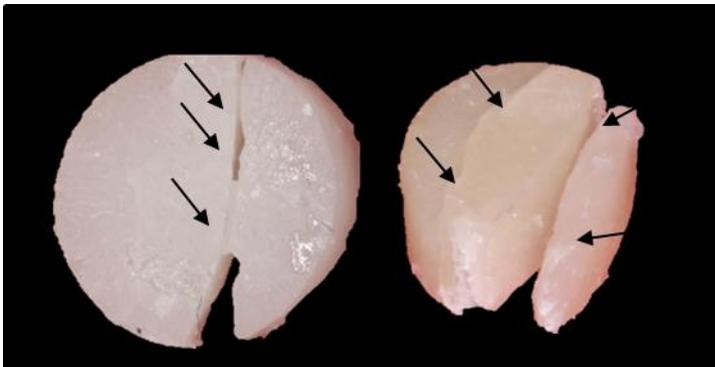
A Figura – 16 é a representação gráfica de valores máximos de resistência à tração alcançados por cada um dos corpos de prova de cada grupo experimental e foi utilizada como referência para correlacionar os achados da fractografia com os valores de resistência à tração dos grupos experimentais.

Figura 16 – Resistência à tração máxima de cada corpo de prova



A fratura foi classificada como catastrófica sempre localizada na região central dos corpos de prova e paralelamente aos locais de apoio, apresentando entre 1 a 3 traços distintos como ilustra a Figura 17.

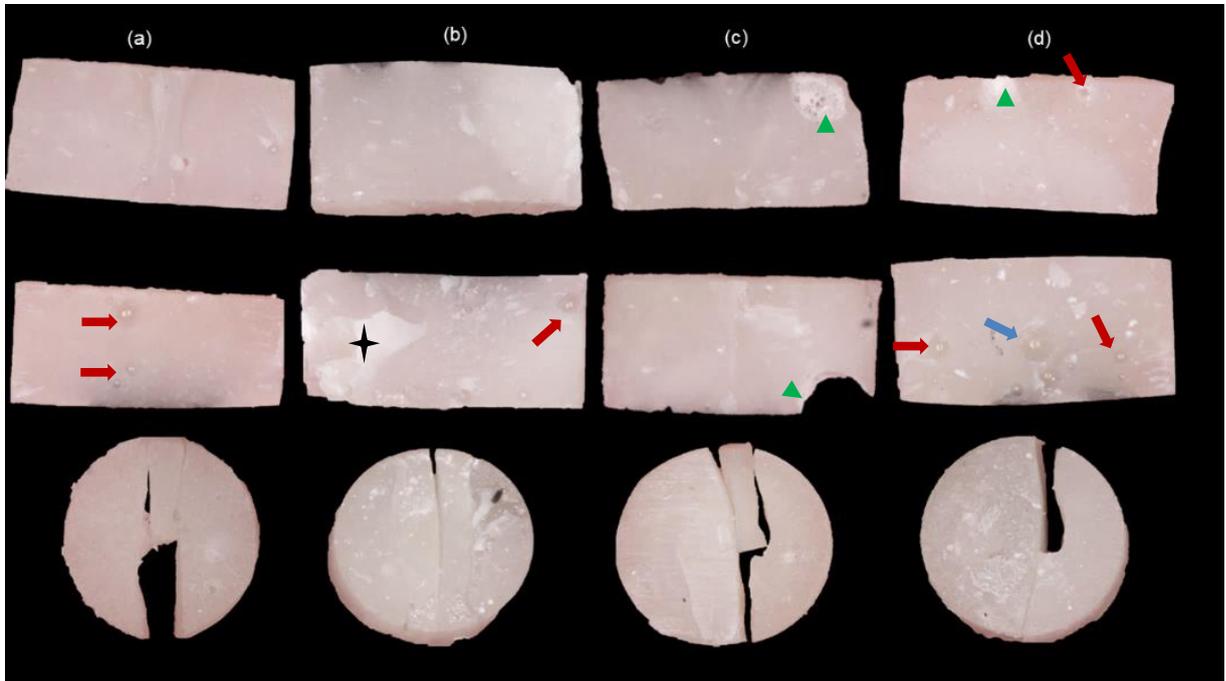
Figura 17 – Traços de fratura



Legenda: (a) corresponde ao cp 3 do grupo 1 que apresentou o menor valor de RTD do grupo (22 Mpa); (b) corresponde ao G2 cp 8 que apresentou o maior valor de RTD do grupo (36 Mpa); as setas indicam os traços de fratura.

A falha do tipo coesiva, foi considerada para todos os grupos de cimento resinoso, indicando clara presença de defeito crítico, grande porosidade ou presença de segunda fase. Como demonstrado na Figura 18.

Figura 18 – Imagens representativas de corpos de prova de cada um dos grupos experimentais.



Legenda: (a) corpo de prova do G1, (b) corpo de prova do G2, (c) corpo de prova do G3 e (d) corpo de prova do G4; Setas vermelhas apontam para porosidades, seta azul para defeito crítico (bolha de tamanho crítico em região de tensão), triângulos verdes sinalizam regiões com presença de segunda fase e estrela preta local de fratura em lasca.

Fonte: A autora, 2022.

#### 4.2.2 Distribuição de Weibull

Para melhor inferência dos valores de resistência à tração com o desempenho e comportamento clínico dos materiais envolvidos, foi feita a análise da distribuição de Weibull de 2 parâmetros.

Para determinar os coeficientes angular ( $m$ ) e linear ( $m \ln S_0$ ) da equação Weibull 2 parâmetros, é necessário calcular os valores do eixo Y calculando  $\ln[-\ln(1-F(S))]$  e do eixo X a partir do valor de  $\ln S$ , onde  $S$  é a resistência à tração obtida,  $\ln$  é o logaritmo neperiano e  $F(S)$  é a probabilidade de falha esperada que é definida a partir de uma função estimadora (apresentadas nas Equações 7 e 8) para cada um dos corpos de prova de cada grupo.

A critério de comparação, inicialmente os cálculos foram realizados com duas funções estimadoras (Estimador 1 e Estimador 2) apresentados nas Equações 7 e 8 abaixo

$$F(S) = \frac{i+0,5}{n} \quad (7)$$

$$F(S) = \frac{i+0,3}{(n+0,4)} \quad (8)$$

onde,  $i$  é o escore em ordem crescente de cada um dos valores de resistência à tração dos corpos de prova de cada grupo,  $(F(S))$  é a probabilidade calculada para cada um desses escores e  $n$  é o número de corpos de prova de cada grupo.

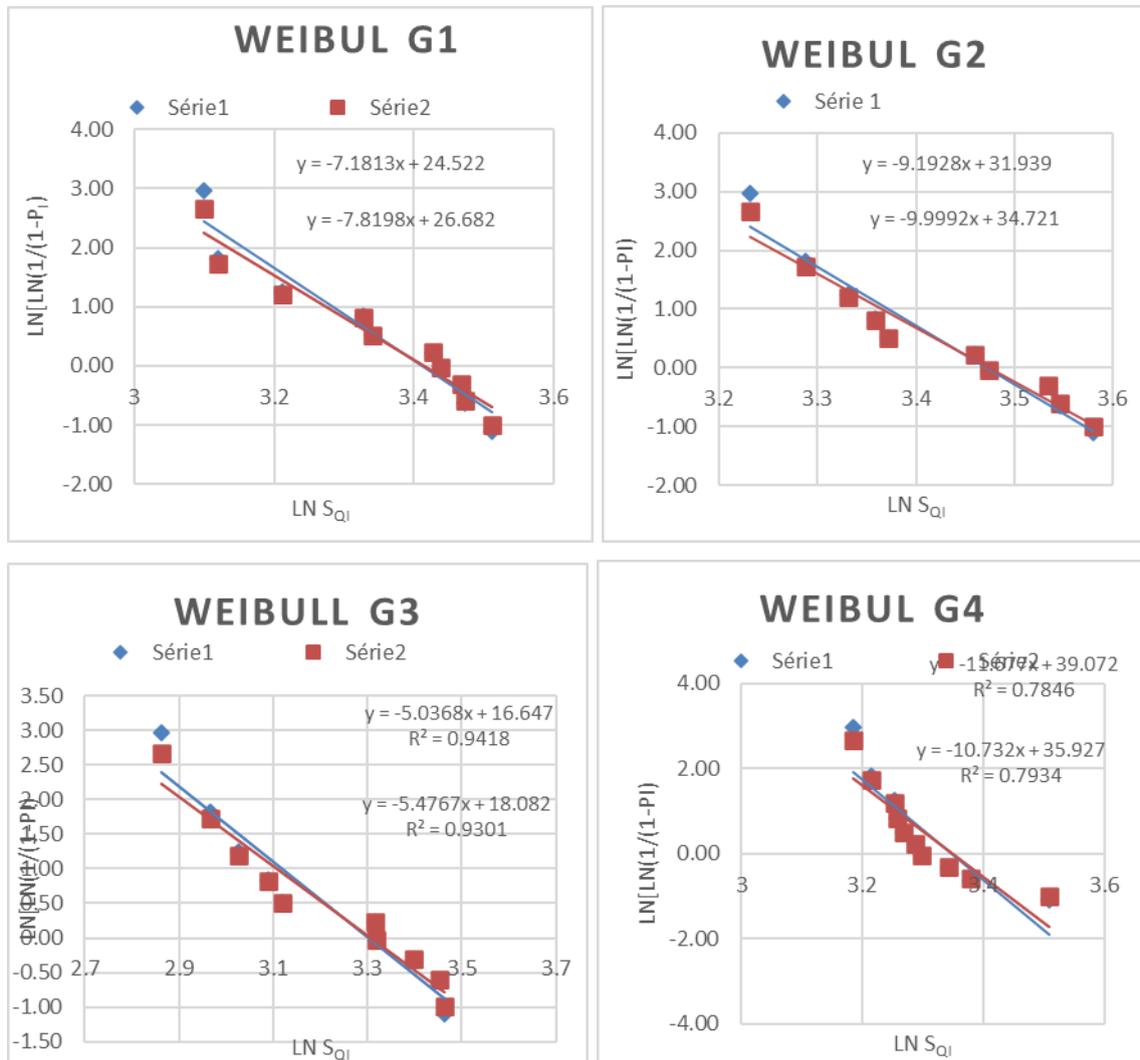
Plotando  $\ln[-\ln(1-F(S))]$  versus  $\ln S$ , resulta numa tendência de linha reta cuja inclinação (coeficiente angular =  $A$ ) é o módulo de Weibull.

O fator de escala  $S_0$  é calculado a partir do coeficiente linear  $B$  através da Equação 9 (geral da reta).

$$Y = AX + B \quad (9)$$

Os gráficos de dispersão dos pontos Weibull dois parâmetros de cada grupo foram plotados. Para cada grupo, foi plotado gráfico com duas séries de pontos, sendo a série 1 pontos calculados utilizando-se o estimador 1 para determinar a probabilidade de falha e a série 2 utilizando-se o estimador 2, como podem ser vistos na Figura 19.

Figura 19 – Dispersão dos pontos Weibull para os grupos experimentais, mostrando suas respectivas equações das retas.



Fonte: A autora, 2022.

A análise dos gráficos de distribuição de pontos de Weibull mostrou que, para todos os grupos, não houve variação considerável, usando o estimador 1 ou o estimador 2 para obtenção da probabilidade de falha. Então, para efeito de cálculos futuros, optou-se em utilizar o estimador 2 por tender a valores mais conservadores.

Com a equação da reta ajustada dos pontos da distribuição de Weibull usando a função estimadora 2, apresentadas na Figura 19, foram determinados os valores do módulo de Weibull (coeficiente angular), coeficiente linear (B), e fator de escala de Weibull ( $S_0$ ) obtidos para cada grupo, que são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Tamanho da amostra (N), coeficiente linear e Parâmetros de Weibull de cada grupo.

Grupo	N	B	Parâmetros de Weibull	
			m (módulo)	S <sub>0</sub> (Escala)
G1	10	24,52	7,18	30,41
G2	10	31,94	9,19	32,28
G3	10	16,65	5,04	27,25
G4	10	35,93	10,73	28,44

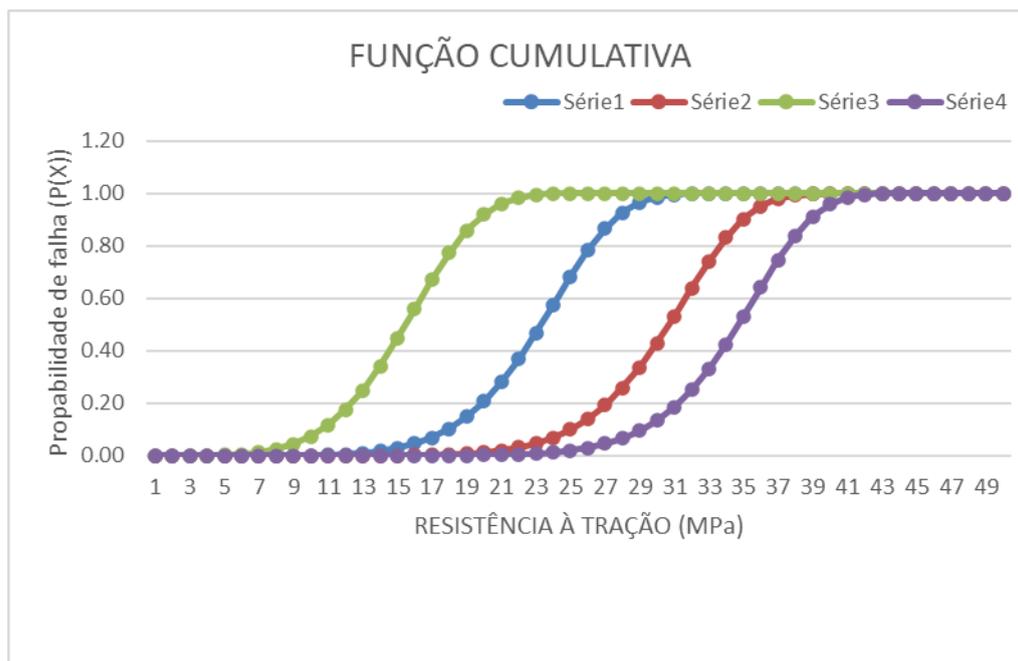
Fonte: A autora, 2022.

A partir dos valores dos parâmetros de Weibull obtidos, foi plotado o gráfico da Figura 20, no qual F(x) é a função de distribuição cumulativa de Weibull definida pela Equação 10.

$$F(x) = 1 - \exp \left[ - \left( \frac{x}{S_0} \right)^m \right] \quad (10)$$

onde, x é a variável resposta resistência à tração (S) e m e S<sub>0</sub> são respectivamente os parâmetros módulo e resistência característica de Weibull.

Figura 20 – Curvas de distribuição cumulativa de Weibull para cada grupo experimental



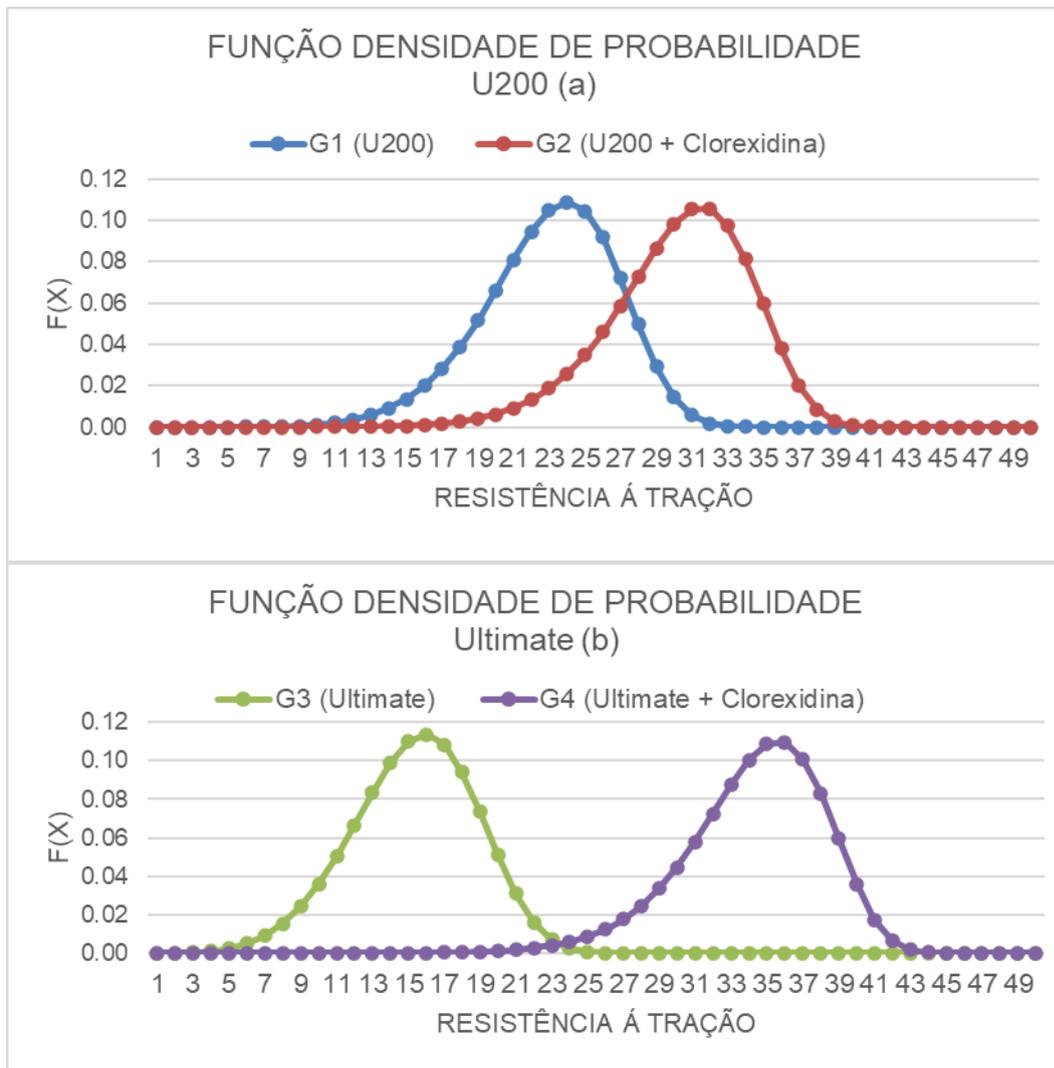
Fonte: A autora, 2022.

Para melhor entendimento da probabilidade de falha, foi plotado gráfico de densidade de probabilidade de falha para cada grupo de cimento resinoso (Figura 21). Para tal, foi utilizada a função densidade de probabilidade de falha com demonstrado na Equação 11.

$$P(x) = \frac{m}{s_0^m} x^{m-1} \exp\left(-\left(\frac{x}{s_0}\right)^m\right) \quad (11)$$

onde,  $x$  é a variável resposta resistência à tração ( $S$ ) e  $m$  e  $S_0$  são respectivamente os parâmetros módulo e resistência característica de Weibull.

Figura 21 – Densidade de probabilidade de falha para os 4 grupos experimentais



Fonte: A autora, 2022.

Com a análise da distribuição de Weibull representada graficamente na Figura 21, verificou-se que o G2 e G4 possuem menor variância dos valores de resistência, que se reflete em curvas de distribuição mais estreitas e amostras com resultados mais homogêneos em relação aos grupos controle sem adição de clorexidina (G1 e G3 respectivamente).

Os grupos G1, G2 e G4 estão relacionados com maiores valores de resistência à tração e com menor variância (maiores módulos) como mostrado na Tabela 11 representados respectivamente pelo deslocamento para maiores valores no eixo x e por suas curvas com praticamente a mesma largura da base (Figura 21).

O significado físico de  $S_0$  é a resistência à tração na qual a probabilidade de sobrevivência é de 36,8% e é chamada de resistência à tração característica. Em outras palavras, 36,8% dos corpos de prova terão uma resistência à tração maior ou igual ao valor de  $S_0$  do seu grupo.

O valor de 90% de taxa de sobrevivência revela qual a resistência mínima esperada quando apenas 10% da amostra falha. Esta taxa reflete um importante comportamento do material em função, uma vez que, valores baixos indicam falhas precoces de extremo interesse para a prática da clínica odontológica. (33) Ao observar a Figura 20 vemos que o valor de resistência mínima esperada (10% de falha) para os grupos do cimento RelyX Ultimate sofre grande variação aumentando de aproximadamente 11MPa no G3 sem clorexidina para 29 MPa no G4 com adição de 1% de clorexidina.

Na Figura 20, os grupos 2 e 4 (curva vermelha e roxa) apresentaram valores próximos e altos de taxa de 90% de sobrevivência (35 Mpa e 39 Mpa respectivamente) indicando melhor comportamento clínico esperado para tais grupos com relação a falhas no início da função clínica na boca.

Na Figura 21, que corresponde a densidade de probabilidade de falha dos grupos experimentais, é observado que o G1 (azul) e G2 (vermelho) – que pela estatística do teste de múltiplas comparações t de Student são apontados com nível de confiança de 95% como sendo médias iguais estatisticamente – possuem curvas um pouco distintas de densidade de probabilidade.

As diferenças entre a distribuição de Weibull para probabilidade de falha dos grupos G1 e G2, são claramente observadas a partir da curva gerada para o G2 na qual há clara tendência a valores de resistência à tração maiores.

Já as curvas de densidade de probabilidade (Figura 21) de falha dos grupos G3 (verde) e G4 (roxo) – que pela estatística do teste de múltiplas comparações de t de student são apontados com nível de confiança de 95% como sendo médias iguais estatisticamente – possuem curvas bastante distintas de densidade de probabilidade.

Na Figura 20 as diferenças entre a distribuição de Weibull para probabilidade de falha dos grupos 3 e 4, podem ser observadas tomando-se arbitrariamente, como valor de referência no eixo x o valor de 30 MPa por exemplo, que é um valor médio clinicamente aceitável de resistência à tração por compressão diametral de um cimento resinoso (11) (PAES et al., 2019). Verifica-se que ao traçar uma reta vertical a partir desse valor no eixo x, essa reta cortará as curvas dos grupos 3 e 4 respectivamente nos valores 1 e 0,13.

Os pontos 1 e 0,13 representam, assim, a porcentagem de 100% e 13% respectivamente para o G3 e G4. Ou seja, é esperado que 100% dos valores de resistência à tração do G3 estarão abaixo de 30 MPa enquanto apenas 13% dos valores do G4 estarão abaixo desse valor. Esses valores probabilidade de falha identificados ao avaliar a Figura 20 é que, G3 terá uma taxa de falha precoce mais alta (10% de probabilidade) do que G4, indicando uma provável maior presença de falhas/defeitos aleatórios nos espécimes do G3.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou a hipótese nula de que os cimentos resinosos RelyX U200 e RelyX Ultimate com diacetato de clorexidina (DCHX) seriam capazes de inibir o crescimento de *S mutans*, sem prejuízo de sua propriedade mecânica de resistência à tração, quando comparados com os mesmos cimentos resinosos sem o agente antimicrobiano.

Os valores dos halos de inibição apresentaram-se dependentes do DCHX incorporado (Tabela 7). Resultados semelhantes foram obtidos por estudos com os sais diacetato quando incorporados a CIVs, sejam convencionais ou resinosos e cimentos dentários convencionais de reação ácido – base. (6,8)

O *S mutans* foi o microrganismo de escolha por seu reconhecido papel como o principal agente etiológico das patologias biofilme dependentes e por ser utilizado frequentemente em testes de atividade antimicrobiana de materiais restauradores, principalmente em estudos que avaliam os sais digluconato, diacetato e dihidroclorato de clorexidina. (9)

Em estudos de difusão em ágar com diacetato de clorexidina, o tamanho do corpo de prova ou poços variaram entre 10 mm a 5 mm de diâmetro e de 1 mm a 2 mm, na maioria deles, chegando até a 4 mm de espessura. Espera-se que corpos de prova de maiores dimensões tenham maior superfície de contato e conseqüentemente, maior área de solubilização do agente antimicrobiano e maiores halos de inibição. No estudo realizado, os corpos de prova foram de 5 mm de diâmetro por 3 mm de espessura. Considerando que as dimensões dos corpos de prova empregados no teste de difusão em ágar dos estudos com DCHX encontrados na literatura têm em média o volume de 157 mm<sup>3</sup> e a área da superfície de sua base de 78,5 mm<sup>2</sup> e que no teste de difusão em ágar os corpos de prova ficam em contato com o meio no qual se difunde o sal de CHX somente na superfície circular ou nesta e na área correspondente a sua espessura imersa no meio, pode ser considerado que o resultado obtido pelos halos de inibição deste estudo equivalem a aproximadamente 3 vezes os resultados obtidos nos demais estudos. Uma vez que tais corpos de prova do estudo aqui proposto tiveram o volume de 58,90 mm<sup>3</sup> e 19,63 mm<sup>2</sup> de área de superfície circular. (6,8) Dentro desta perspectiva, os valores médios dos halos de inibição dos grupos experimentais (Tabela 7) podem ser

explicados pela forma de ligação da CHX ao cimento, à alta viscosidade dos cimentos resinosos decorrente da grande quantidade de carga e pela dureza superficial dos cimentos. (49)

O teste de difusão em ágar para avaliação da atividade antibacteriana de materiais restauradores é empregado como teste de rotina por ser de baixo custo e de fácil realização. No entanto, possui algumas limitações acerca da viabilidade dos microrganismos testados na zona de inibição, não havendo como definir se sua ação é bacteriostática ou bactericida. Uma outra limitação dos testes de contato direto está em avaliar a atividade antibacteriana de materiais de baixa capacidade de difusão, não podendo ser determinada por estes testes. (6–8)

Nos grupos controle de ambos os cimentos resinosos, não foi observada a formação de halo de inibição. Resultado também observado em outros estudos com DCHX e cimentos convencionais que liberam flúor. (6,8) Os níveis de clorexidina liberados pelos cimentos resinosos experimentais do presente estudo demonstrou efetivo efeito antimicrobiano independente da presença de monômeros acídicos nos cimentos autocondicionantes.

Neste trabalho, os 2 tipos de cimentos resinosos duais acrescidos de 1% de DCHX não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os halos de inibição. Espera-se clinicamente que materiais modificados por agentes antimicrobianos ou por antibióticos devam prover tais atividades sem comprometer propriedades físicas. Alguns estudos demonstraram que 1% e 2% de DCHX comprometem propriedades dos CIVs convencionais como, por exemplo, a dureza. A redução do desempenho das propriedades físicas decorrentes da incorporação de sais de CHX tem sido atribuída à ligação entre sais catiônicos, que dificultam a reação de presa dos vidros de ácido poliacrílico, prolongando-a pela interferência gerada pelo ataque de prótons e pela lixiviação dos íons do vidro. (9)

Apesar de ter demonstrado tal variação na propriedade mecânica de CIV, nenhuma combinação de agentes antibacterianos parece ser melhor que o emprego de agentes catiônicos como CHX, cetrimidina, cloreto de benzalcônio ou cloreto de cetilpiridínio, que são capazes de agir contra *S mutans*, *Lactobacillus* e espécies de *Actinomyces*. (50)

Por estas razões foram selecionados tanto o agente antibacteriano DCHX, bem como, a concentração mínima de 1%, que permitiriam obter tanto uma ação específica contra *S mutans*, além de atuar contra outros agentes bacterianos

cariogênicos, como possibilitaria provavelmente a manutenção das propriedades mecânicas dos cimentos resinosos com DCHX incorporado o que foi confirmado pelo estudo confirmando a hipótese nula.

As propriedades mecânicas dos cimentos resinosos são frequentemente associadas ao grau de conversão (GC) das duplas ligações entre carbonos, porém, outros fatores como tipo e quantidade de cargas inorgânicas, estrutura dos monômeros, concentração de diluentes, modo de ativação, tipo e quantidade de inibidores também desempenham papel importante na obtenção de algumas propriedades mecânicas dos compósitos resinosos. (15,16,25,26)

Menor GC pode gerar menor RTD quando o mesmo cimento resinoso é avaliado, porém, como a RTD é uma propriedade mecânica influenciada pela composição da matriz orgânica dos compósitos, a análise dos valores de RTD de diferentes tipos de cimentos resinosos duais acrescidos de sais de DCHX cristalina poderia criar locais de concentração de tensões e induzir a falha mecânica mesmo em cimentos resinosos com o mesmo grau de conversão. Por esta razão, o GC não é um método fidedigno para análise da resistência mecânica de cimentos resinosos, pois um cimento resinoso que possua matriz resinosa com maior capacidade para formar ligações cruzadas, mesmo quando apresentar menor GC, pode formar polímero final com resistência mecânica superior à outra resina com maior GC e com rede polimérica menos reticulada. (10) Dessa forma, valores de RTD podem ser usados para prever a qualidade relativa da rede polimérica formada sob as diferentes condições do ensaio. O resultado esperado como hipótese nula neste estudo para a análise da interação entre os fatores cimento e incorporação de DCHX foi aceita uma vez que todos os grupos experimentais de cada cimento resinoso sem ou com adição de DCHX a 1% apresentaram valores médios de RTD estatisticamente semelhantes.

Porém a análise do traço de falha das superfícies dos corpos de prova após o ensaio de compressão diametral revelou diferenças como observado nas Figuras 17 e 18. Em geral os valores mais altos de RTD foram observados em corpos de prova que sofreram mais de um traço de fratura na região central da amostra (cp 8 G2) e os menores valores foram associados a traços de fratura únicos (cp 3 G1). Acredita-se que isso se deva a presença de defeitos de tamanho acima do tamanho crítico ou regiões de presença de segunda fase que comprometeram a RTD desses corpos de prova na região da trinca única.

Na Figura 18, estão fotografias das faces fraturadas dos corpos de prova mostrando uma distribuição homogênea de porosidades (setas vermelhas) em todas as amostras confirmando que por se tratarem de dois cimentos pasta a pasta de mistura manual a incorporação de pequenas bolhas é um defeito inerente ao material e não teve relação com menores valores de RTD. Já a presença de segunda fase (possivelmente material pouco polimerizado) foi observada nos grupos G3 e G4 em corpos de prova que obtiveram valores baixos de RTD. A presença de fratura em lasca foi mais evidente no cimento RelyX U200 e parece ter relação com a início da trinca ter sido formado sem a presença de defeitos críticos no traço de fratura se relacionando com altos valores de RTD.

Ao tabular tais valores médios e seus desvios padrões verificou-se uma tendência a maior homogeneidade da amostra com DCHX. Diante disto foi realizada a avaliação da distribuição de Weibull para avaliar o comportamento e a projeção de distribuição de defeitos na amostra.

A menor presença desses defeitos aleatórios teria relação direta com a adição da clorexidina em pó nos grupos G2 e G4, que devido provavelmente comportou-se como uma carga adicionada ao compósito resinoso melhorando sua homogeneidade de distribuição de defeitos. Isso pode ser estatisticamente comprovado pelo valor de módulo de Weibull maior, isto é, menor variabilidade da amostra de G4 em comparação com a amostra de G3. A mesma tendência é observada ao comparar as amostras dos grupos G1 e G2 porém o aumento do módulo de Weibull nesse caso não foi tão significativo passando de 7 para 9 respectivamente.

Os autores indicam que talvez, a incorporação do diacetato de clorexidina por ser uma molécula catiônica atuou de forma complementar na formação da matriz polimérica do cimento resinoso RelyX Ultimate unindo-se firmemente aos grupamentos funcionais do cimento elevando a qualidade da sua matriz o que possivelmente contribuiu para diminuição da taxa de falha precoce de G4. (51) Essa alta afinidade da clorexidina já foi sugerida como causa da diminuição da rugosidade superficial de cimentos de policarboxilato de zinco e de fosfato de zinco em estudo anterior. (6)

Essa boa afinidade química é também justificada pela ação a longo prazo da CHX que parece estar envolvida com sua habilidade de se ligar à cátions principalmente os íons Ca e Al presentes tanto nas partículas de carga dos cimentos resinosos quanto na hidroxiapatita, por exemplo, favorecendo sua liberação de forma

gradual e conseqüentemente determinando uma ação bacteriostática por um longo período de tempo. (9,38,51)

O método de difusão em ágar tem dentre suas limitações o crescimento das colônias bacterianas restrito pela saturação do meio de cultura que não é renovado com o tempo além de não permitir estabelecer a quantidade determinada de material restaurador uma vez que nem todas as faces do corpo de prova ficam totalmente inseridas no poço da placa teste, a menor precisão da quantidade de bactérias em contato com o corpo de prova, além de não permitir a observação quantitativa dos resultados através da visualização e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *S mutans*, e será objeto de estudo futuro que terá como objetivo avaliar o comportamento desses materiais submetidos a estudo *in vitro* de formação de biofilme em cavidade bucal simulada assim como a avaliação do comportamento clínico desses cimentos resinosos experimentais acrescidos de 1% de diacetato de clorexidina. (6,8)

Este estudo não revelou grande diferença no comportamento mecânico final dos cimentos resinosos RelyX U200 e RelyX Ultimate em função das diferenças nas composições desses materiais e em função da incorporação de DCHX a 1% em peso. Entretanto, somente uma propriedade mecânica foi analisada, não havendo assim a possibilidade de analisar por completo o comportamento desses cimentos em outra condição. Por esse motivo, outras propriedades como resistência à flexão, solubilidade, dureza e espessura de película devem ser analisadas em trabalhos futuros.

Estudos *in vivo* com restaurações de cimento de ionômero de vidro com um a três anos de longevidade demonstraram que a concentração de fluoreto liberada não foi suficiente para afetar o metabolismo das bactérias associadas à formação de biofilme, como o *S mutans*, por exemplo, o que ressalta a importância do efeito do DCHX incorporado aos cimentos resinosos, observado neste trabalho, que apresentam ação contra o *S mutans*, um dos principais agentes no desenvolvimento de patologias biofilme dependentes. (34)

O papel destes cimentos resinosos com DCHX incorporados e sua ação no controle e prevenção de cáries secundárias, especialmente em certos grupos de pacientes, tais como imunossuprimidos, com doenças crônicas avançadas com repercussões orais, pacientes submetidos à quimio e radioterapia para tumores em região de cabeça e pescoço. Estes indivíduos, entre outros, compõem um grupo

com alto risco de doenças biofilme dependentes que têm acesso limitado ou baixa adesão a medidas profiláticas.

## CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste estudo, é pode-se concluir que:

- a) o efeito da inibição ao *S mutans* é dependente da incorporação do DCHX;
- b) a associação do DCHX com os cimentos resinosos não alterou a capacidade da ação antibacteriana do DCHX;
- c) a resistência à tração diametral média dos cimentos resinosos RelyXU200 e RelyX Ultimate acrescidos de DCHX incorporada no percentual de 1% se mantém estatisticamente semelhante a propriedade mecânica dos cimentos sem o acréscimo de DCHX, independente do cimento testado.
- d) a incorporação de pó de diacetato de clorexidina a 1% diminuiu a variabilidade de amostra e a taxa de falha para o cimento RelyX Ultimate.

Portanto, mesmo não havendo diferenças estatisticamente significantes, o resultado deste estudo mostrou a viabilidade do uso do DCHX em cimentos resinosos duais, em situações de pacientes vulneráveis.

## REFERÊNCIAS

1. Anusavice KJ. Phillips' Science of Dental Materials (Anusavice Phillip's Science of Dental Materials) [Internet]. Vol. 12, Elsevier Saunders. Elsevier Health Sciences; 2021. 588 p. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/phillips-science-of-dental-materials/shen/978-0-323-69755-2>
2. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials* [Internet]. 15 de abril de 2002;23(8):1819–29. Disponível em <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961201003088>
3. Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of UEDMA, BisGMA and TEGDMA on selected mechanical properties of experimental resin composites. *Dent Mater* [Internet]. janeiro de 1998;14(1):51–6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109564198000098>
4. Coelho A, Amaro I, Rascão B, Marcelino I, Paula A, Saraiva J, et al. Effect of cavity disinfectants on dentin bond strength and clinical success of composite restorations-a systematic review of in vitro, in situ and clinical studies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):1–27.
5. Do Amaral GS, Negrini T, Maltz M, Arthur RA. Restorative materials containing antimicrobial agents: Is there evidence for their antimicrobial and anticaries effects? A systematic review. *Aust Dent J*. 2016;61(1):6–15.
6. Korkmaz FM, Tüzüner T, Baygin O, Buruk CK, Durkan R, Bagis B. Antibacterial activity, surface roughness, flexural strength, and solubility of conventional luting cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Prosthet Dent* [Internet]. agosto de 2013;110(2):107–15. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022391313603492>
7. Mayhé R. Estudo in vitro do efeito antibacteriano de cimentos de ionômero de vidro incorporados com diacetato de clorexidina. Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2014.
8. Tüzüner T, Kuşgöz A, Er K, Taşdemir T, Buruk K, Kemer B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Esthet Restor Dent*. 2011;23(1):46–55.
9. Fardai O, Turnbull RS, Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* [Internet]. junho de 1986;112(6):863–9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002817786260201>
10. Ferracane JL. Correlation between hardness and degree of conversion during the setting reaction of unfilled dental restorative resins. *Dent Mater*. 1985;1(1).

11. PAES PNG, MIRANDA MS de, Sampaio-Filho HR, Correr-Sobrinho L, de Miranda MS, Sampaio-Filho HR, et al. Influence of activation mode, fatigue, and ceramic interposition on resin cements' diametral tensile strength. *Braz Oral Res* [Internet]. 2019;33:1–9. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-83242019000100261&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242019000100261&tIng=en)
12. BOWEN RL. Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc*. 1963;66(1):71–8.
13. Finer Y, Santerre JP. Influence of silanated filler content on the biodegradation of bisGMA/TEGDMA dental composite resins. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2007;81(1).
14. Musanje L, Ferracane JL. Effects of resin formulation and nanofiller surface treatment on the properties of experimental hybrid resin composite. *Biomaterials*. agosto de 2004;25(18):4065–71.
15. El-Badrawy WA, El-Mowafy OM. Chemical versus dual curing of resin inlay cements. *J Prosthet Dent*. junho de 1995;73(6):515–24.
16. Hofmann N, Papsthart G, Hugo B, Klaiber B. Comparison of photo-activation versus chemical or dual-curing of resin-based luting cements regarding flexural strength, modulus and surface hardness. *J Oral Rehabil*. novembro de 2001;28(11):1022–8.
17. Martin Groten LP, Groten M, Pröbster L. The influence of different cementation modes on the fracture resistance of feldspathic ceramic crowns. *Int J Prosthodont* [Internet]. 1997;10(2):169–77. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9206458>
18. Raigrodski AJ. All-ceramic full-coverage restorations: concepts and guidelines for material selection. Vol. 17, *Practical procedures & aesthetic dentistry* : PPAD. 2005.
19. Sjögren G, Molin M, van Dijken J, Bergman M. Ceramic inlays (cerec) cemented with either a dual-cured or a chemically cured composite resin luting agent a 2-year clinical study. *Acta Odontol Scand*. 1995;53(5):325–30.
20. el-Mowafy OM, Rubo MH, el-Badrawy WA. Hardening of new resin cements cured through a ceramic inlay. *Oper Dent*. 1999;24(1):38–44.
21. Peters AD, Meiers JC. Effect of polymerization mode of a dual-cured resin cement on time-dependent shear bond strength to porcelain. *Am J Dent*. dezembro de 1996;9(6):264–8.
22. Watts DC. Reaction kinetics and mechanics in photo-polymerised networks. *Dent Mater*. janeiro de 2005;21(1):27–35.

23. Blackman R, Barghi N, Duke E. Influence of ceramic thickness on the polymerization of light-cured resin cement. *J Prosthet Dent* [Internet]. março de 1990;63(3):295–300. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002239139090199M>
24. Heffernan MJ, Aquilino SA, Diaz-Arnold AM, Haselton DR, Stanford CM, Vargas MA. Relative translucency of six all-ceramic systems. Part II: Core and veneer materials. *J Prosthet Dent*. 2002;88(1):10–5.
25. Braga RR, Ferracane JL, Condon JR. Polymerization contraction stress in dual-cure cements and its effect on interfacial integrity of bonded inlays. *J Dent*. 2002;30(7–8):333–40.
26. Cardash HS, Baharav H, Pilo R, Ben-Amar A. The effect of porcelain color on the hardness of luting composite resin cement. *J Prosthet Dent*. junho de 1993;69(6):620–3.
27. BOWEN RL. Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bis phenol and glycidyl acrylate. *United States Pat Off* 3,066,112. 1962;28(2):131–4.
28. Elliott JE, Lovell LG, Bowman CN. Primary cyclization in the polymerization of bis-GMA and TEGDMA: A modeling approach to understanding the cure of dental resins. *Dent Mater*. 2001;17(3).
29. Floyd CJE, Dickens SH. Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dent Mater*. 2006;22(12):1143–9.
30. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(4).
31. Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: New dimension of innovation in restorative dentistry. *Dent Mater J*. 2009;28(1):11–9.
32. Ajami AA, Rikhtegaran S, Bahari M, Hamadanchi S. Antibacterial activity of self-adhesive resin cements against *Streptococcus mutans* at different time intervals. *Iran J Microbiol*. 2019;11(4):313–9.
33. Paes PNGNG, Bastian FLL, Jardim PMM. The influence of Y-TZP surface treatment on topography and ceramic/resin cement interfacial fracture toughness. *Dent Mater* [Internet]. setembro de 2017;33(9):976–89. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.06.004>
34. van Dijken JWV, Kalfas S, Litra V, Oliveby A. Fluoride and mutans streptococci levels in plaque on aged restorations of resin-modified glass ionomer cement, compomer and resin composite. *Caries Res*. 1997;31(5).

35. Duarte de Oliveira FJ, Ferreira da Silva Filho PS, Fernandes Costa MJ, Rabelo Caldas MRG, Dutra Borges BC, Gadelha de Araújo DF. A comprehensive review of the antibacterial activity of dimethylaminohexadecyl methacrylate (DMAHDM) and its influence on mechanical properties of resin-based dental materials. *Jpn Dent Sci Rev.* 2021;57:60–70.
36. Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun.* 1996;64(3).
37. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis* [Internet]. setembro de 2002;8(9):881–90. Disponível em: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm)
38. Zanatta FB, Rösing CK. Clorexidina: Mecanismo De Ação E Evidências Atuais De Sua Eficácia No Contexto Do Biofilme Supragengival. *Scientific-A.* 2007;1(2).
39. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. In: *Toxicology in Vitro.* 2001.
40. Jumlongras D, White GE. Bond strengths of composite resin and compomers in primary and permanent teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 1997;21(3):223–9.
41. Sun R, Zhang J, Whiley RA, Sukhorukov GB, Cattell MJ. Synthesis, drug release, and antibacterial properties of novel dendritic chx-srcl2 and chx-zncl2 particles. *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1–16.
42. Al Thaher Y, Alotaibi HF, Yang L, Prokopovich P. PMMA bone cement containing long releasing silica-based chlorhexidine nanocarriers. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(9 September):1–23. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0257947>
43. Shafiei F, Memarpour M, Vafamand N, Mohammadi M. Effect of antibacterial/adhesive approaches on bonding durability of fiber posts cemented with self-etch resin cement. *J Clin Exp Dent.* 2017;9(9):e1096–102.
44. Stanislawczuk R, Reis A, Malaquias P, Pereira F, Farago PV, Meier MM, et al. Mechanical properties and modeling of drug release from chlorhexidine-containing etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* [Internet]. 2014;30(4):392–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.01.007>
45. Chung KH. The relationship between composition and properties of posterior resin composites. *J Dent Res.* março de 1990;69(3):852–6.
46. Hardan L, Bourgi R, Cuevas-Suárez CE, Zarow M, Kharouf N, Mancino D, et al. The bond strength and antibacterial activity of the universal dentin bonding system: A systematic review and meta-analysis. *Microorganisms.* 2021;9(6).
47. Zhang Y, Yu Q, Wang Y. Non-thermal atmospheric plasmas in dental restoration: improved resin adhesive penetration. *J Dent.* agosto de 2014;42(8):1033–42.

48. Williams PD, Smith DC. Measurement of the Tensile Strength of Dental Restorative Materials by Use of a Diametral Compression Test. *J Dent Res.* 1971;50(2):436–42.
49. Denton G.W. Chlorhexidine. In: Disinfection, Sterilization and preservation. In: Seymour Stanton Block, organizador. *Disinfection, Sterilization and preservation. Ilustrada.* Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 1991. p. 321–36.
50. Carranza FA, Newman MG, Takei H, Klokkevold P. Periodontología clínica de Carranza. In: *Capítulo 43 - 44.* 2014.
51. Xia W, Razi MRM, Ashley P, Neel EAA, Hofmann MP, Young AM. Quantifying effects of interactions between polyacrylic acid and chlorhexidine in dicalcium phosphate-forming cements. *J Mater Chem B.* 2014;2(12):1673–80.

**APÊNDICE – Tabela do cálculo do tamanho da amostra**

F tests – ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way  
Analysis: A priori: Compute required sample size  
Input: Effect size f = 2.6457513  
 $\alpha$  err prob = 0.05  
Power (1- $\beta$  err prob) = 0.8  
Number of groups = 4  
Output: Noncentrality parameter  $\lambda$  = 55.9999995  
Critical F = 6.5913821  
Numerator df = 3  
Denominator df = 4  
Total sample size = 8  
Actual power = 0.9647157