

THAÍS CACHUTÉ PARADELLA

**ADERÊNCIA DE *Streptococcus mutans*
EM MATERIAIS RESTAURADORES E SEUS EFEITOS
EM CÁRIE SECUNDÁRIA *in vitro* E *in situ* AVALIADOS
POR MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA E ESPECTROSCOPIA
POR DISPERSÃO DE RAIOS-X (EDS)**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

THAÍS CACHUTÉ PARADELLA

**ADERÊNCIA DE *Streptococcus mutans*
EM MATERIAIS RESTAURADORES E SEUS EFEITOS
EM CÁRIE SECUNDÁRIA *in vitro* E *in situ* AVALIADOS POR
MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA E ESPECTROSCOPIA POR
DISPERSÃO DE RAIOS-X (EDS)**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR pelo Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2008

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A.B. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2006.

Paradella, Thaís Cachuté

Aderência de *Streptococcus mutans* em materiais restauradores e seus efeitos em cárie secundária *in vitro* e *in situ* avaliados por microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS) / Thaís Cachuté Paradella; orientador Antonio Olavo Cardoso Jorge.____ São José dos Campos, 2008.

144p; IL

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2008.

1. *Streptococcus mutans* – 2. esmalte dentário – 3. análise espectral por dispersão de raios-X

BLACK

D22

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 28/07/2008

Assinatura:

Email: tparadella@yahoo.com

Paradella TC. Aderência de *Streptococcus mutans* em materiais restauradores e seus efeitos em cárie secundária *in vitro* e *in situ* avaliados por microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS) [tese de doutorado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2008.

FOLHA DE APROVAÇÃO

São José dos Campos, 28 de Julho de 2008

Banca examinadora

1 Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Titulação: Professor Titular da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOSJC-UNESP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2 Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito

Titulação: Professora Adjunta da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOSJC-UNESP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3 Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

Titulação: Professora Doutora da disciplina de Microbiologia e Imunologia da FOSJC-UNESP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4 Profa. Dra. Silvana Cai

Titulação: Professora Doutora da Disciplina de Microbiologia Básica do ICB-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5 Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner

Titulação: Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora Aparecida e à Deus, pela ajuda e companhia nos momentos felizes e difíceis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de doutorado e auxílio à pesquisa.

Ao Laboratório de Integração e Testes do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LIT-INPE), pelo auxílio com os ensaios de Espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS).

Ao Engenheiro Rodrigo Rodrigues (LIT-INPE), não só pelo auxílio com os ensaios de EDS, mas também pela paciência e sobretudo, a amizade durante toda a tese, sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao Engenheiro Isaac Jamíl Sayeg do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo (IGc-USP), pelo auxílio com a metalização das amostras e por toda explicação científica e colaboração com os ensaios de EDS. Incrível como se é possível aprender muito em pouco tempo de convivência.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira e Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, pela amizade e agradável convivência com ambas durante todo o doutorado.

*Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, voluntários do trabalho *in situ*, não só pela participação, mas também pela boa vontade de contribuir e por levar muito a sério uma parte experimental na qual fui dependente 100% deles. Não poderia deixar de citar o nome dos meus amigos: Adriana Chung, Geraldo Marques Miranda, Gláucia Gonçalves Faro, Megg Aparecida Ribeiro, Júnia Oliveira Barbosa, Priscila Hollenben e Rosemary Soares dos Santos.*

*Aos alunos de iniciação **Ranieri Guimarães** e **Rafael Brizola**, pelo interesse e ajuda.*

Aos membros do conselho de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, por sempre estarem disponíveis e auxiliarem os pós-graduandos.

*À minha colega de pós-graduação e amiga, **Marta Majewski** e ao meu amigo técnico do Laboratório de Microbiologia **Sérgio Alves**, que são pessoas maravilhosas, queridas e com as quais tive uma convivência além de meios de cultura!*

*A **Carlos Alberto Guedes**, do Escritório de Assessoria de Fomento para Pesquisas e Bolsas de Estudo, pela ajuda, paciência e boa vontade, tendo tanto me ajudado com a parte burocrática e prestação de contas de relatórios de bolsa e auxílio. Muito obrigada!*

*À Profa. Adj. **Márcia Carneiro Valera**, que apesar de termos diminuído nossa convivência em relação ao mestrado, nos tornamos vizinhas e amigas!*

Ao meu gato de estimação *Adamastor Paradella* “*Damínha*”, que tantas vezes me fez companhia enquanto escrevia esta tese, media áreas, tabulava, fazia estatística dos dados e lia artigos. Você me mostrou muitas vezes como os gatos são muitas vezes os amigos que precisamos.

À minha irmã, *Evelise Cachutê Paradella-Helbling*, que mesmo do outro lado do mundo, sempre é presença constante.

À minha tia *Adriana*, meu tio *Liomar*, meu primo *Caio*, minha avó *Terezinha*, por todo apoio e carinho durante este período.

À minha segunda família: *Marco, Paula, Pilar, Bruna, Marcela, Quinho, Paulinho, Lucas, Vitória* e o querido *Bolívar* (*in memoriam*) *Cervantes García* (alguns Sousa outros Silva), que acompanharam a minha trajetória na pós-graduação e tantas vezes me emprestaram seus ombros amigos. Muito obrigada!

Ao meu querido *São Paulo Futebol Clube*, por ter proporcionado a mim e a toda torcida tricolor tanta alegria em 2005, 2006 e 2007.

E a todos os funcionários e professores da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOJSC-UNESP) que tanto me ajudaram nesta trajetória, meu sincero muito obrigada!!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu orientador, Professor Titular **Antônio Olavo Cardoso Jorge**, por ter confiado em mim desde o primeiro momento em que nos conhecemos e ter me orientado neste trabalho que espero seja o primeiro de muitos frutos científicos que ainda estão por vir.*

*À Professora Adjunta **Cristiane Yumi Koga-Ito**, coordenadora do curso de pós-graduação em Biopatologia Bucal, não só pela ajuda durante o curso, mas também pela amizade, bondade e carinho, os quais se tornaram sua marca registrada e fazem com que seja admirada e querida pelos seus alunos.*

DEDICATÓRIA

Ao meu querido namorado e pós-graduando como eu Mestre Fernando Augusto Cervantes García de Sousa, pelo carinho, paciência e empatia, sem os quais o caminho da pós-graduação teria sido bem mais difícil.

“Para fazer uma obra, não basta ter talento, não basta ter força, é preciso também viver um grande amor.”

Wolfgang Amadeus Mozart

Aos meus pais, Professor Dr. Waldir Renato Paradella e Mestra Marlene de Oliveira Cachutê Paradella, que sempre estiveram tão perto.

“Conduta de pais, caminho de filhos.”

Provérbio

“Winners are just willing to do what losers won’t.”

Million-dollar baby

O presente trabalho obteve aprovação e apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio de Bolsa de Doutorado (05/58458-6) e Auxílio à Pesquisa (06/52513-8).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 <i>Streptococcus mutans</i> , microbiologia e cariologia.....	22
2.1.1 Aderência de <i>S. mutans</i> à superfície dentária e de materiais restauradores.....	30
2.2 Ação anticariogênica de materiais restauradores.....	35
2.3 Microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS).....	38
3 PROPOSIÇÃO.....	44
4 MATERIAL E MÉTODO.....	45
4.1 Seleção e armazenamento das amostras.....	45
4.2 Preparos cavitários e divisão das amostras em grupos de acordo com o material restaurador.....	46
4.3 Separação dos corpos-de-prova conforme o método de indução de cárie.....	50
4.3.1 Desafio cariogênico com <i>S. mutans</i>	53
4.3.2 Desafio cariogênico com soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH).....	56
4.4 Análise das superfícies dos corpos-de-prova.....	58
4.4.1 Avaliação por meio de microscopia de luz polarizada.....	58
4.4.2 Avaliação por espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS).....	59
4.5 Estudo <i>in situ</i>	63
4.5.1 Determinação do fluxo salivar, capacidade tampão e contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva.....	64
4.5.2 Aparelhos palatais.....	66
4.6 Aderência de <i>S. mutans</i> aos materiais restauradores.....	68
4.6.1 Ensaio de aderência.....	68
4.7 Análise estatística.....	70
5 RESULTADOS.....	74
5.1 Microscopia de luz polarizada.....	74
5.2 Espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS).....	84
5.3 Aderência de <i>S. mutans</i> a materiais restauradores.....	106

6 DISCUSSÃO.....	108
7 CONCLUSÕES.....	121
8 REFERÊNCIAS.....	123
ANEXOS.....	135
APÊNDICES.....	138
<i>ABSTRACT</i>	144

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC = *American Type Culture Collection*

BHI = *Brain Heart Infusion*

Ca = Cálcio

CaSiO₃ = Silicato de cálcio

CIV-V= Ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE)

CIV-J = Cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX (GC International)

CO₂ = Dióxido de carbono

Cr₂O₃ = Trióxido de crômio

EDS = Espectroscopia por dispersão de raios-X

F = Flúor

g = Grama

GTF = Glicosiltransferases

H₀ = Hipótese nula

IgA = Imunoglobulina A

IGc-USP = Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo

INPE = Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

KeV = Quiloelétron-Volt

kGy = QuiloGray

LIT = Laboratório de Integração e Testes

Log10 = Logaritmo de base 10

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

µm = Micrometro

mm = Milímetro

mm² = Milímetro quadrado

μL = Microlitro

mL = Mililitro

mL/min = Mililitro por minuto

n = Número de corpos-de-prova

N = Normalidade

NaCl = Cloreto de sódio

P = Fósforo

p = Probabilidade

pH = Potencial de hidrogênio

PBS = *Phosphate Buffer Solution*

RC-Z = Resina composta convencional Z250 (3M ESPE)

RC-F = Resina composta modificada por poliácidos Freedom (SDI)

UFC = Unidade Formadora de Colônia

UFC/mL = Unidade Formadora de Colônia por mililitro

W = Watt

WDS = *Wavelength Dispersion Spectroscopy*

X = Vezes

X_g = Vezes gravidade

$^{\circ}\text{C}$ = Grau Celsius

$>$ = Maior

$<$ = Menor

$\pm$ = Aproximadamente

Paradella TC. Aderência de *Streptococcus mutans* em materiais restauradores e seus efeitos em cárie secundária *in vitro* e *in situ* avaliados por microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS) [tese de doutorado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2008.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes materiais restauradores após indução de cárie secundária *in vitro*, *in situ* e aderência de *S. mutans* sobre estes materiais. Oitenta e quatro molares humanos foram restaurados com diferentes materiais (Z250, Freedom, Vitremer e Fuji IX) e subdivididos em: desafio cariogênico com *S. mutans* ou ciclagem de pH (n=12). Para o estudo *in situ*, aparelhos removíveis contendo um espécime restaurado com cada material foram utilizados por 12 voluntários por 14 dias (dia e noite). Uma gota de sacarose a 20% foi pingada nos espécimes 8X/dia. O grupo controle teve espécimes restaurados e não submetidos aos desafios cariogênicos. Os espécimes foram submetidos à microscopia de luz polarizada e EDS. Para a aderência, espécimes dos materiais foram imersos em cultura de *S. mutans* ATCC 35688 em caldo sacarosado. Após 48h (37°C/5% CO₂), foi realizada contagem das unidades formadoras de colônias (log UFC/mL). Os resultados foram submetidos à análise estatística *Kruskal-Wallis* e *Student-Newman-Keuls* ou Comparação de *Dunn* e demonstraram diferenças entre as metodologias *in vitro* e *in situ* (p<0,05), porém sem diferenças entre as metodologias *in vitro*. Fuji IX demonstrou maior concentração de cálcio e menor desmineralização do esmalte adjacente, diferindo dos demais materiais. Os valores médios de aderência (±desvio padrão) foram: Z250 6,41 (0,15)a; Freedom 4,90 (0,95)b; Vitremer 5,13 (0,27)b; Fuji IX 4,89 (0,62)b. Letras diferentes significam diferença estatística significativa. Concluiu-se que conforme a metodologia de desafio cariogênico, os materiais restauradores apresentaram diferentes resultados e que materiais fluoretados apresentaram menor aderência de *S. mutans*.

PALAVRAS-CHAVE: *Streptococcus mutans*; cárie; cimentos de ionômero de vidro; resinas compostas; esmalte dentário; análise espectral por dispersão de raios-X.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa e transmissível dos tecidos calcificados dos dentes, resultando em perda localizada dos tecidos mineralizados, sendo multifatorial e possuindo como fatores determinantes a dieta e a presença de microrganismos cariogênicos na cavidade bucal. O processo carioso resulta em perda mineral que afeta as estruturas dentárias, sendo um processo que raramente é autolimitante quando não tratado. Os sinais da doença vão desde a perda inicial mineral ultra-estrutural até a destruição total do dente ^{11, 29, 38, 41, 55, 80, 82}.

Durante muito tempo, tinha-se como conceito que o tratamento da doença cárie envolvia apenas preparos e restaurações de cavidades. Estas condutas cuidavam apenas dos sintomas da doença, acreditando que somente as técnicas operatórias e os materiais restauradores seriam capazes de tratá-la. Entretanto, esta filosofia de "tratamento" levou muitas vezes à remoção progressiva das estruturas dentárias, inclusive estruturas não-afetadas pela doença. Hoje, a Odontologia moderna tem como objetivos principais prevenir novas lesões, paralisar as já existentes e evitar as lesões recorrentes, além da promoção de saúde bucal e conservação da estrutura dentária e tratamento das causas da doença cárie e não somente de suas seqüelas ^{29, 82}.

O esmalte hígido consiste de cristais de hidroxiapatita que se distribuem em prismas. Cada cristal é separado por espaços intercristalinos, que são preenchidos por água e material orgânico. Estes espaços intercristalinos formam uma rede de difusão e são chamados de poros do esmalte. Quando o esmalte é exposto aos ácidos bacterianos,

ocorre a dissolução de hidroxiapatita causando aumento dos espaços intercristalinos. O aumento da porosidade do esmalte conduz a uma mudança nas propriedades ópticas do esmalte, tornando-o opaco, originando a chamada lesão de mancha branca, considerada a primeira manifestação clínica da doença cárie. A lesão de mancha branca, histologicamente, em profundidade, se apresenta em quatro zonas: zona superficial, corpo da lesão, zona escura e zona translúcida. Se o processo progredir, ocorre ruptura da camada superficial e formação da cavidade^{28, 30, 80, 82}.

A pesquisa relacionada à cárie dentária tem se intensificado muito nos últimos anos, com o estudo dos fatores imunológicos envolvidos na ação dos estreptococos do grupo mutans, bactérias estas amplamente envolvidas no desenvolvimento da lesão cariosa, sobretudo *Streptococcus mutans*^{17, 52, 86}.

O maior conhecimento da etiologia da doença cárie, a compreensão do mecanismo de formação das lesões e a utilização de métodos e medidas preventivas têm levado a um considerável declínio da experiência de cárie primária em diferentes países do mundo^{29, 55}.

Embora a experiência de lesões de cárie primária tenha diminuído no mundo, lesões de cárie secundária, que se desenvolvem ao redor ou sob restaurações, continuam sendo um problema real na clínica odontológica, uma vez que estas lesões reduzem a vida útil de restaurações, alterando a superfície dentária e ameaçando a manutenção do elemento dentário na cavidade bucal⁷.

A cavidade bucal é um sistema ecológico complexo, no qual a composição salivar e o ambiente microbiano apresentam papéis importantes nos processos de desmineralização e remineralização da estrutura dentária. Portanto, o desenvolvimento de lesões de cárie secundária possui gênese multifatorial incluindo composição salivar, colonização bacteriana, idade, higiene dentária e qualidade da restauração⁷.

Para impedir a formação e controlar o desenvolvimento de lesões, indica-se a associação de diferentes procedimentos preventivos. Neste contexto, a utilização de materiais restauradores com flúor* parece ser importante para o controle das lesões de cárie secundária ^{11, 16, 29, 42}.

Desta forma, a pesquisa com materiais restauradores que liberam flúor, intensificou-se na última década ^{29, 30, 36, 42}. No entanto, faltam estudos que avaliem estes materiais em situações de desafio cariogênico, simulando a realidade encontrada no ambiente bucal ^{71, 72}. Além disso, estudos experimentais e clínicos são importantes para desenvolver regimes de prevenção eficazes em relação a lesões de cárie secundária e entender a complexa relação entre a restauração, o ambiente bucal e a superfície dentária ⁷.

Estudos envolvendo métodos de simulação de cárie têm se tornado freqüentes nos últimos anos, pois o estudo da formação e evolução das lesões cariosas, bem como seu comportamento sob as mais variadas condições, fornece subsídio às mais variadas situações clínicas encontradas na Odontologia ^{17, 65, 78, 80}.

Para isso, diversos métodos *in vitro* são utilizados, dentre eles a imersão em solução tampão ácida, que pode ou não conter cálcio e fosfato, ou a utilização de gel acidulado, dentre outros. A imersão em solução tampão ácida apresenta a tendência de produzir erosões superficiais. Além disso, estes modelos são estáticos e não simulam as condições *in vivo* ^{27, 64, 71, 72, 80}.

O modelo de ciclagem de pH, proposto por Featherstone e Rodgers ²⁸ e adaptado por Serra e Cury ⁷¹, é utilizado em estudos por ser dinâmico, pois a cárie dentária representa um processo de alterar fenômenos de desmineralização com remineralização, os quais são

*Termo genérico para definir as formas químicas (ion flúor ou fluoreto) e ionizável (iônica ou covalente) do elemento flúor. Definição em Ramires I. Manual: flúor e fluoretação da água de abastecimento público. 2005. 155p.

função direta das condições que mantêm um pH crítico no ambiente bucal⁵⁴. No entanto, este modelo descarta a participação bacteriana, fundamental na cariologia.

A simulação de cárie *in vitro* por meio de *S. mutans* utiliza o microrganismo considerado um dos principais agentes etiológicos da cárie de superfícies lisas, devido a sua capacidade acidogênica, acidúrica e de sintetizar polissacarídeos extracelulares, com a formação de grande quantidade de biofilme dentário e polissacarídeos intracelulares que permitem a produção de ácidos, mesmo na ausência de fontes exógenas de carboidratos^{21, 52, 53, 55}.

Estudos que realizam a comparação de metodologias são fundamentais na pesquisa odontológica, pois por meio deles há melhor orientação e direcionamento, no sentido de aplicarmos metodologias que tentem aproximar-se ao máximo da realidade clínica, tornando a pesquisa *in vitro* viável e com resultados que possam ser extrapolados para a situação *in vivo*. Além disso, diferentes resultados podem ser obtidos quando utilizados diferentes metodologias de simulação de lesões de cárie *in vitro*, o que impede a extrapolação dos resultados *in vitro* para situações clínicas, demonstrando a necessidade do estudo aprofundado destas metodologias^{24, 68, 76}.

Estudos *in situ* têm se tornado freqüentes na literatura, sendo considerados valiosos para monitoramento da desmineralização e remineralização de lesões artificiais, por permitirem maior controle das variáveis (em relação aos estudos *in vivo*) e serem mais perto da realidade clínica (em relação aos estudos *in vitro*)^{22, 34, 37, 81}.

A espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS – *Energy Dispersion X-ray Spectroscopy*) constitui-se em um método de análise a qual identifica e mede a concentração de elementos químicos, tais como cálcio, fósforo e flúor, presentes em uma amostra. Embora seja uma metodologia muito difundida em outras áreas do conhecimento, tais como Engenharia e Química, na Odontologia não é muito utilizada, porém

pode ser extremamente valiosa na determinação química de uma amostra, bem como no diagnóstico de uma lesão^{8, 23, 31, 49, 51}.

O uso do microscópio de luz polarizada tem sido amplamente utilizado na avaliação de lesões cariosas. A microscopia de luz polarizada baseia-se nos princípios de índice de refração de soluções nos espaços intercristalinos, tornando possível obter uma estimativa precisa da porosidade do tecido, e até mesmo distinguir áreas de esmalte com diferentes porosidades^{34, 35, 82}.

Embora haja a consideração de que o início e a progressão da cárie são resultantes de múltiplos fatores inter-relacionados, não há como negar que a destruição cariosa depende de acúmulos localizados de bactérias bucais na superfície do dente. Entretanto, os dentes podem estar revestidos por bactérias bucais sem sinais visíveis de lesão de cárie, podendo-se concluir que embora o biofilme seja necessário, não é suficiente sozinho para causar a cárie⁶⁸.

Assim, torna-se necessário o estudo aprofundado de diferentes métodos para indução de cárie *in vitro* e *in situ*, em associação a materiais restauradores, no intuito de se avaliar a histomorfometria e a composição química das lesões de cárie secundária formadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor entendimento, a revisão de literatura encontra-se dividida em tópicos. No primeiro tópico, *Streptococcus mutans*, microbiologia e cariologia, serão abordadas as principais características dos estreptococos do grupo mutans, sobretudo *S. mutans* e sua importância e correlação com a cariologia, bem como a descrição do processo de aderência de *S. mutans* à superfície dentária e de materiais restauradores. No segundo tópico, Ação anticariogênica de materiais restauradores, será descrito o estado da arte dos materiais restauradores diretos que possuem propriedades anticariogênicas. E finalmente, no último tópico, Microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS), serão discutidos os aspectos técnicos e propriedades de ambas as técnicas.

2.1 *Streptococcus mutans*, microbiologia e cariologia

Os estreptococos do grupo mutans são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dentária. Entre as espécies deste grupo estão:

- a) *S. mutans*, sendo esta a principal espécie relacionada à doença no homem;
- b) *S. sobrinus*, também relacionados à cárie dentária;
- c) *S. cricetus*, encontrados na cavidade bucal de hamsters;

- d) *S. rattus*, obtidos em ratos de laboratório;
- e) *S. ferus*, originalmente isolados da cavidade bucal de ratos que consumiam cana-de-açúcar como dieta alimentícia;
- f) *S. macacae*, que receberam este nome por terem sido isolados do biofilme dentário de macacos (*Macaca fascicularis*);
- g) *S. downei*, também isolados do biofilme dentário de macacos ⁴¹.

A colonização na cavidade bucal por estes microrganismos depende de superfícies duras, não-descamativas, e os mesmos não são detectados nos elementos dentários antes de sua erupção. Os fatores de risco, como a presença de biofilme dentário, o tipo de dieta, as variáveis relacionadas ao hospedeiro e a influência de aspectos sócio-econômicos e culturais, estão relacionados ao desenvolvimento da cárie dentária ⁴¹.

S. mutans são cocos imóveis, catalase-negativos, Gram-positivos, que formam cadeias curtas ou médias. Em ágar *mitis-salivarius* crescem formando colônias convexas, opacas, com aparência de vidro esmerilhado. Quando cultivados na presença de sacarose, apresentam cápsulas de glicano e levano e produzem polissacarídeos extracelulares insolúveis. *S. mutans* fermentam manitol e sorbitol, são anaeróbios facultativos e residentes da cavidade bucal. Seu potencial cariogênico é devido à sua capacidade acidogênica e acidúrica, favorecendo a formação de grande quantidade de biofilme dentário e polissacarídeos intracelulares, que permitem produção de ácido, mesmo na ausência de fontes exógenas de sacarose ^{21, 41, 52}.

Os estreptococos do grupo mutans, sobretudo *S. mutans* e *S. sobrinus*, são os microrganismos mais associados à cárie dentária de superfície lisa em seres humanos. As características microbiológicas, bem como os fatores de virulência determinam a patogenicidade de uma

espécie ⁶¹. Os fatores de virulência incluem aderência, ácido-resistência, ácido-tolerância. Existem diversos genótipos de *S. mutans*, com virulência elevada, presente em indivíduos com alta atividade de cárie ⁵³.

Em estudo realizado por Okada et al. ⁵⁵, crianças de 3 a 5 anos, com dentição decídua, tiveram o biofilme dentário coletado dos dentes erupcionados, para detectar a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus*, sendo os dados comparados com a incidência de lesões de cárie nesta mesma população após 1 ano. A presença de *S. mutans* no biofilme dentário foi de 61,7% e de *S. sobrinus* de 56,6%, indicando haver correlação entre presença das bactérias e o desenvolvimento de lesões de cárie envolvendo *S. mutans* em 16,6%. Os autores concluíram que crianças que são portadoras destas bactérias apresentam maior incidência de cárie dentária.

A cárie é uma doença infecto-contagiosa que resulta em perda localizada de minerais dos dentes afetados. O processo de desenvolvimento da lesão de cárie é simples no conceito, porém complicado no detalhamento, uma vez que a cárie é uma doença multifatorial que depende da interação de três fatores essenciais: o hospedeiro, representado pelos dentes e a saliva, a microbiota da região e a dieta consumida, tudo isso em função do tempo. Para que a cárie ocorra, estes fatores devem estar presentes e interagir em condições críticas: o hospedeiro com dentes susceptíveis, colonizados por microrganismos cariogênicos, consumindo com frequência uma dieta rica em sacarose ^{27, 41}.

Em condições normais, quando o pH na superfície do dente for superior a 5,5, a composição da saliva em cálcio e fosfato é supersaturante em relação a solubilidade da hidroxiapatita, logo a tendência físico-química do dente é ganhar cálcio e fosfato do meio bucal. Quando as características do biofilme dentário possibilitam aumento no número de bactérias que conseguem metabolizar carboidratos, produzindo ácido e se o pH ácido resultante foi menor que 5,5, a

composição da saliva torna-se subsaturante em relação ao produto da solubilidade da hidroxiapatita. Assim, a tendência físico-química do dente é perder cálcio e fosfato para o meio bucal, até atingir novo estado de equilíbrio, ocorrendo conseqüente desmineralização ⁴¹.

O pH 5,5 é chamado crítico para o esmalte, pois toda vez que carboidratos forem utilizados pelos microrganismos que produzem ácidos, o pH pode atingir valor abaixo de 5,5. A neutralização do pH pela saliva resulta novamente em saturação do cálcio e fosfato e em restituição desses para o tecido dentário. Assim, quando o pH retorna ao normal, o esmalte ganha cálcio e fosfato do meio bucal, repondo o que foi perdido no processo de desmineralização. Este fenômeno é chamado de remineralização. Um desequilíbrio nos processos de desmineralização e remineralização acarreta desde pequenas perdas minerais, observadas através de microscopia eletrônica ou óptica, perdas minerais observadas clinicamente (como manchas brancas), até a formação de cavidades. Atualmente, considera-se a cárie dentária como conseqüência do desequilíbrio entre os fatores de desmineralização e remineralização, sendo função direta das condições de mantêm o pH crítico, menor que 5,5 na cavidade bucal ^{41, 54}.

Bactérias bucais metabolizam e fermentam carboidratos, produzindo ácidos orgânicos como subprodutos. Estes ácidos se difundem no interior do esmalte e da dentina, dissolvendo o componente mineral do substrato dentário à medida que se difundem. Este estágio de desmineralização pode ser inibido por vários fatores como a concentração de cálcio e fosfato na saliva, bem como proteínas salivares e agentes antimicrobianos. A desmineralização parcial é rotineiramente revertida na cavidade bucal quando o pH aumenta acima do valor crítico e cálcio e fosfato, juntamente com flúor, remineralizam os cristais do esmalte. Estes cristais remineralizados na subsuperfície do esmalte são mais resistentes a uma posterior queda de pH ²⁷.

A prevenção da formação de lesão de cárie no substrato dentário por meio de flúor envolve duas ações: inibição da desmineralização e aumento a remineralização. O flúor acelera a remineralização e os cristais recém-formados são mais resistentes à desmineralização. A saliva tem papel chave uma vez que provê cálcio e fosfato e é um veículo para levar flúor das fontes exógenas (como água e dentifrícios) até a superfície dentária ^{27, 85}.

No entanto, outros fatores também estão relacionados com o desenvolvimento de lesões de cárie. Hara et al. ³⁵ afirmaram em seu estudo, que a desmineralização do esmalte dentário é dependente do tempo e está mais relacionada com a composição do biofilme do que com os fatores salivares isolados, como secreção salivar e capacidade tampão da saliva.

Em relação aos carboidratos, a sacarose é considerada o mais cariogênico e esta característica é parcialmente atribuída ao seu papel como substrato na síntese de polissacarídeos extracelulares. A presença dos polissacarídeos extracelulares aumenta a porosidade do biofilme dentário e mantém valor de pH baixo, causado por ácidos orgânicos do metabolismo bacteriano. Portanto, a alta frequência do consumo de sacarose ou à sua exposição leva a repetidos ciclos de queda de pH no biofilme dentário, o que resulta no aumento das espécies acidúricas e acidogências, como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. Esta freqüente exposição a estas condições de baixo pH pode também diminuir o tempo para a saliva repor qualquer perda mineral da superfície dentária. Em adição a isto, alta frequência de exposição à sacarose pode modificar as características bioquímicas do biofilme, o que então apresentará altas concentrações de polissacarídeos insolúveis e baixas concentrações de cálcio, fósforo e flúor ².

No sentido de facilitar o estudo da cariologia, modelos de estudo da cárie vêm sendo desenvolvidos há alguns anos ^{3, 80}. Podemos

dividir estes modelos em estudos *in vitro*, estudos *in situ* e estudos *in vivo* ²⁸.

Dentre os modelos *in vitro*, a imersão em solução tampão ácida ou a utilização de gel acidulado ^{7, 16, 25, 85} constituem-se em modelos de fácil execução, porém os resultados obtidos com estes modelos devem ser analisados com cuidado, uma vez que não há presença de nenhum componente salivar, não há estágio de remineralização ou a troca dos componentes ácidos. Além disso, o pH das soluções ácidas utilizadas nestes modelos de estudo tende a se manter constante, diferentemente da cavidade bucal, na qual há flutuação do pH ⁶³. Desta forma, este modelo pode não necessariamente apresentar uma indicação realista do que acontece na cavidade bucal. Uma das maiores desvantagens destes modelos é que qualquer substância liberada pelos materiais analisados (como flúor) permanece sobre o espécime e tende a se acumular com o tempo, tornando o experimento apenas mais um teste de como o flúor se comporta para inibir a desmineralização, sem considerar os componentes relacionados ao desenvolvimento da lesão de cárie ²⁷.

Outro modelo *in vitro* constitui-se da utilização de ciclagem de pH, que simula os fenômenos de desmineralização e remineralização que ocorrem dinamicamente na cavidade bucal ^{28, 34, 54, 68, 71, 72}. Neste modelo, as amostras são imersas em solução desmineralizante por horas e depois imersas em solução remineralizante. Esta ciclagem deve ser repetida por diversos dias. Embora seja um modelo de fácil execução e que simultaneamente mede a desmineralização e a remineralização ⁷¹, este modelo descarta a participação bacteriana, fundamental no processo de desenvolvimento de lesões de cárie.

Featherstone e Rodgers ²⁸ desenvolveram um método de indução de lesões de cárie secundária envolvendo ciclagem de pH, adaptada por Serra e Cury ⁷¹. Vários estudos utilizando este método

foram feitos comparando-se diferentes materiais restauradores^{54, 68, 72}. No entanto, Sá et al.⁶⁸, ao analisarem as propriedades anticariogênicas de diferentes materiais restauradores sob desafio cariogênico, por meio de ciclagem de pH e modelo microbiano, utilizando-se de microscopia eletrônica de laser confocal, concluíram que diferentes modelos de indução de lesões de cárie *in vitro* podem gerar resultados diferentes, uma vez que os cimentos de ionômero de vidro demonstraram propriedade anticariogênica quando o modelo de ciclagem de pH foi utilizado. Porém, quando o modelo microbiano foi utilizado, os mesmos materiais não demonstraram propriedades anticariogênicas significantes. Os autores enfatizaram a necessidade do estudo aprofundado de metodologias de indução de cárie secundária *in vitro*.

O modelo microbiano envolve a imersão da amostra em meio de cultura contendo *S. mutans* somente ou *S. mutans* em associação a outros microrganismos. *S. mutans* irão produzir ácidos orgânicos, de maneira similar a que ocorre no biofilme dentário. Há necessidade da troca do meio de cultura para que não haja acúmulo dos subprodutos e interferência no processo²⁷.

Além dos estudos *in vitro*, estudos *in situ* também são bastante encontrados na literatura, uma vez que estes estudos utilizam voluntários os quais utilizam aparelhos palatais contendo amostras. Nos estudos *in situ*, o desafio cariogênico ocorre fora da cavidade bucal, com a utilização de soluções de sacarose em variadas concentrações sendo pingadas sobre as amostras várias vezes ao dia durante um período específico de tempo. A remineralização ocorre no ambiente bucal, com a utilização do aparelho durante dia e noite. Neste tipo de estudo, é fundamental que os voluntários sejam examinados previamente, com uma minuciosa anamnese que diagnostique qualquer doença crônica que possa alterar o fluxo salivar (diabetes, Síndrome de Sjögren) ou qualquer condição que interfira no processo de remineralização (ingestão de determinados medicamentos como antidepressivos, antibióticos e

anfetaminas). Além disso, há necessidade de examinar o fluxo salivar, a capacidade tampão da saliva e realizar a contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva dos voluntários. Sete dias antes da utilização dos aparelhos palatais contendo as amostras, torna-se necessária a utilização de um dentífrico não-fluoretado, bem como a suspensão do uso de enxagüatórios bucais, para que flúor remanescente na cavidade bucal não interfira no processo de remineralização (período chamado de *washout*). Os estudos *in situ* têm sido bastante utilizados por representarem um estágio intermediário entre estudos *in vitro* e *in vivo*, permitindo o controle das condições clínicas relacionadas ao desenvolvimento de lesões de cárie^{22, 35, 81}.

Finalmente, métodos de estudo da cariologia *in vivo* envolvem modelos animais utilizando ratos ou a utilização de dentes com extração indicada em seres humanos. No caso de modelos animais, é importante salientar que estes modelos são dispendiosos e necessitam de tempo prolongado para se obterem resultados. Além disso, a cavidade bucal e os dentes de ratos são pequenos. A saliva dos ratos é diferente dos seres humanos, bem como sua dinâmica, o que torna os resultados possíveis de questionamento²⁷. A utilização de dentes com extração indicada seria o modelo mais próximo de ensaios clínicos. No entanto, cuidados devem ser tomados na seleção dos participantes e no tamanho da amostra, uma vez que não é fácil conseguir pacientes com as condições necessárias para participar destes estudos²⁷.

Estudos *in situ* apresentam vantagens sobre estudos *in vivo* em pacientes, uma vez que o desenho experimental é mais flexível, permitindo o teste de hipóteses as quais não poderiam ser avaliadas em testes clínicos. Além disso, menores problemas éticos e logísticos são criados, sendo estudos com menor custo e os resultados são adquiridos em menor tempo³⁷.

A cárie dentária é considerada um problema significativo na clínica odontológica e medidas preventivas têm reduzido com sucesso

a incidência de lesões primárias de cárie dentária, ainda que lesões secundárias continuem a ser um problema significativo para o clínico ⁶⁸. A *Federación Dentaire Internationale* definiu cárie secundária com sendo uma lesão cariosa positivamente diagnosticada, que ocorre nas margens de uma restauração pré-existente. Os passos mais importantes para a prevenção de cárie secundária são os mesmos utilizados para a cárie primária, e incluem: aplicação de flúor, controle da dieta e do biofilme dentário, tornando assim possível induzir o processo de remineralização. Desta forma, materiais liberadores de flúor, tais como cimentos de ionômero de vidro, podem contribuir para a redução de lesões de cárie secundária ^{11, 16, 17, 25, 29}.

2.1.1 Aderência de *S. mutans* à superfície dentária e de materiais restauradores

A aderência de *S. mutans* à superfície dentária ou ao material restaurador é fundamental para que se inicie a formação de biofilme e conseqüentemente, o desenvolvimento da lesão de cárie.

A aderência de bactérias bucais à superfície dentária ou a de materiais restauradores é descrita na literatura por diversos autores. Quirynem e Bollen ⁶⁶ descreveram a aderência de *S. mutans* a superfícies dentárias ou de materiais restauradores em quatro fases:

- a) transporte das bactérias em direção à superfície;
- b) adesão inicial, mediada por forças de curta e longa distância;
- c) adesão mediada por interações específicas;
- d) colonização.

A adesão inicial mediada por forças de Van der Waals e eletrostáticas é fraca e não permite verdadeira colonização, sendo os

microrganismos facilmente removidos por mecanismos de controle e regulação da microbiota bucal. No entanto, a adesão bacteriana mediada por interações específicas permite ancoragem mais forte entre bactérias e superfície. Isto ocorre pelo contato direto ou por verdadeiras pontes, como os apêndices filamentosos extracelulares entre microrganismos e superfícies. As ligações específicas são mediadas por componentes protéicos extracelulares específicos (adesinas), presentes na parede celular das bactérias e receptores complementares sobre as superfícies dentárias ou de materiais restauradores ¹⁵.

Embora a literatura considere que a aderência bacteriana apresenta uma fase inespecífica, mediada pela ação de forças, e outra fase específica, mediada pela expressão das adesinas, deve-se considerar que um microrganismo colonizando inicialmente uma superfície precisa interagir, por meio de forças inespecíficas para explorar as características químicas da superfície e então, desenvolver adesinas específicas ao material ¹⁵.

Conforme Idone et al. ³⁸, quando *S. mutans* entram em contato com glicoproteínas salivares que cobrem a superfície dentária ou de materiais restauradores, dois estágios de aderência ocorrem, seguidos do mediato desenvolvimento do biofilme dentário. O primeiro estágio é reversível e independente de sacarose, envolvendo interações iônicas e semelhante a lectinas, com antígenos bacterianos de superfície, como a proteína P1 e fatores derivados do hospedeiro na película adquirida. Neste estágio de aderência inicial, as proteínas salivares têm papel significativo na aderência de estreptococos bucais. No estudo de Ahn et al. ¹, mucinas de baixo peso molecular, α -amilase, IgA-secretória e proteínas ácidas ricas em prolina aderiram a todos os tipos de braquetes ortodônticos submetidos à cultura não-sacarosada de *S. mutans* e *S. gordonii*, confirmando o papel das proteínas salivares na aderência inicial.

Quando a sacarose proveniente da dieta torna-se disponível na cavidade bucal, glicosiltransferases passam a mediar a

tenaz aderência de *S. mutans* à superfície dentária ou de materiais restauradores sintetizando glucanos solúveis e insolúveis em água. Este estágio da aderência assegura que o microrganismo não será removido por meio da mastigação ou do fluxo salivar. Os fatores que mediam a expressão dos mediadores que contribuem na formação dos glucanos e das glicosiltransferases ainda não foram totalmente esclarecidos^{15, 41, 53, 66}.

Os genes *gtfB* e *gtfC* codificam as enzimas que sintetizam os glucanos insolúveis em água com ligações α 1,3, enquanto que o gene *gtfD* codifica a enzima glicosiltransferase S (GTF-S), que produz glucanos solúveis em água com ligações α 1,6. Os glucanos também interagem com as proteínas ligadoras de glucanos, que promovem agregação célula a célula, portanto contribuindo para as propriedades coesivas do biofilme. Desta forma, a inativação destes genes e destas proteínas pode alterar a estrutura do biofilme e a cariogenesis^{12, 38}.

Glucanos insolúveis em água são constituintes significantes do biofilme dentário, o qual facilita a aderência e a acumulação de biofilmes mediados por proteínas ligadoras de glucanos. A formação de biofilme é influenciada pela quantidade de GTF do tipo B e GTF do tipo C, produzidas por *S. mutans* e tanto GTFB e GTFC têm demonstrado estarem envolvidas na aderência e no desenvolvimento de lesões de cárie em modelos animais¹².

O desenvolvimento do biofilme dentário é iniciado por *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. gordonii* e *S. mitis*, seguida da colonização por lactobacilos e outros membros dos estreptococos do grupo mutans. O biofilme é uma comunidade microbiana mista, na qual há o desenvolvimento de microcolônias separadas por canais de água que permitem que nutrientes solúveis acessem células profundas no biofilme e eliminem produtos metabólicos. *S. mutans* é o componente acidogênico primário do biofilme, no qual metaboliza carboidratos exógenos, incluindo

a sacarose, e gera ácido láctico. O acúmulo de ácido no biofilme resulta em queda localizada do pH e subsequente desmineralização ³⁸.

De uma maneira simplificada, Napimoga et al. ⁵³ descreveu a formação do biofilme dentário em duas fases distintas: na primeira fase, proteínas de superfície bacterianas interagem com o hospedeiro ou com produtos bacterianos adsorvidos na superfície dentária ou no material restaurador. Na segunda fase, o biofilme se forma à medida que bactérias se acumulam por meio de agregação com as mesmas espécies ou com espécies diferentes, produzindo matriz extracelular polissacarídica.

A aderência de bactérias à superfície dentária e à de materiais restauradores também depende das características físico-químicas da superfície, sendo a energia livre de superfície e a liberação de flúor dois fatores que parecem influenciar esta adesão ^{17, 20}. Por outro lado, alguns autores afirmam que o flúor liberado por materiais restauradores não influenciam na aderência bacteriana ^{26, 50}.

Conforme Napimoga et al. ⁵³, uma importante característica de *S. mutans* na promoção de lesões de cárie é sua habilidade de aderência firme à superfície dentária ou de materiais restauradores na presença de sacarose, sendo esta adesão mediada principalmente pela ação enzimática de enzimas GTF. A superfície celular de *S. mutans* possui um antígeno protéico e GTF, que têm sido estudadas em relação a sua cariogenicidade. As GTF têm papel na caracterização dos sorotipos de *S. mutans*. Sorologicamente são descritos três sorotipos: *c*, *e*, *f*, conforme a composição química dos polissacarídeos da superfície celular. *S. mutans* produzem três tipos de GTF: GTFB, GTFC e GTFD, cuja ação cooperativa é essencial para adesão dependente de sacarose. Por outro lado, o antígeno protéico está correlacionado à adesão de *S. mutans* independente de sacarose. Recentemente, Nakano et al. ⁵² isolaram um novo tipo de *S. mutans*, sorotipo *k*, e testes de *Western blot* revelaram que um defeito na cadeia lateral de glicose deste sorotipo

específico de *S. mutans* pode estar associado à sua cariogenicidade, embora em menor extensão que as demais proteínas principais de superfície.

Os polissacarídeos sorotipo-específicos de *S. mutans* são constituídos por polímeros de ramnose-glicose com uma cadeia estrutural de ramnose e cadeias laterais de resíduos glicosídicos α ou β ligados. Polissacarídeos sorotipo-específicos têm importante papel na aderência estreptocócica a monócitos humanos e células fibroblásticas e foi especulado ser o componente mais eficiente na estimulação de citocinas⁵².

Em relação às GTF, GTFB é considerada responsável pela maior parte da síntese de glucanos insolúveis em água, os quais são importantes fatores de virulência no desenvolvimento da lesão inicial de cárie, além de causar aumento da aderência e acúmulo de estreptococos do grupo mutans no biofilme dentário⁵².

Em adição aos estreptococos do grupo mutans, sobretudo *S. mutans*, outras espécies bacterianas, como *S. sanguinis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces israeli*, estão sendo pesquisadas no desenvolvimento de cárie dentária, uma vez que a interação entre diferentes espécies bacterianas tem influência na desmineralização inicial da superfície dentária⁸⁶.

A cárie dentária é uma doença que apresenta uma série de fatores a serem considerados em relação à sua etiologia. Além da participação bacteriana, dieta cariogênica, rica em sacarose, além de higiene bucal insatisfatória, caracterizando um hospedeiro susceptível, em associação ao tempo, podem ser considerados os fatores etiológicos primários da cárie dentária⁸². O correto diagnóstico de lesões de cárie é fundamental e o primeiro sinal clínico de atividade de cárie são manchas brancas opacas e rugosas que surgem na superfície dentária⁶⁵. Em relação a lesões de cárie secundária, manchas brancas opacas e rugosas

ao redor de restaurações implicam em lesões de cárie ativa em pacientes que já tiveram contato com a doença.

2.2 Ação anticariogênica de materiais restauradores

Com a descoberta dos fatores etiológicos da cárie dentária e da importância do flúor na inibição de lesões de cárie, procurou-se aliar estética à prevenção. Neste sentido, surgiram os materiais restauradores que liberavam flúor – as resinas compostas modificadas por poliácidos. Concomitantemente, materiais que já apresentavam conhecido potencial anticariogênico, porém não eram utilizados para restaurações definitivas devido a propriedades mecânicas insatisfatórias, como os cimentos de ionômero de vidro, ganharam novas formulações, no intuito de melhorar seu desempenho clínico, surgindo os ionômeros de vidro modificados por resina ^{44, 59, 63, 85}.

A adição de flúor à composição de materiais restauradores é importante uma vez que em altas concentrações, o flúor pode diretamente afetar bactérias cariogênicas por meio da inibição de enzimas metabólicas chave, e desta forma reduzindo a habilidade destas bactérias de produzirem ácidos ^{30, 85}.

A liberação de flúor por materiais restauradores e seus efeitos na desmineralização dentária e no metabolismo bacteriano têm sido estudada por diversos autores ^{17, 19, 30, 36, 63, 85}, sendo afirmado que materiais restauradores liberadores de flúor apresentam benefícios cariostáticos por constantemente produzirem zonas de inibição na superfície dentária, liberando flúor às estruturas adjacentes às restaurações ⁶³.

Francci et al. ³⁰ compararam diversos materiais restauradores diretos, dentre eles cimento de ionômero de vidro

convencional (Fuji IX GP). Os materiais foram avaliados quanto à liberação de flúor durante as primeiras 24 horas e expostos à cultura de *S. mutans* por 6 horas, seguida da medição dos níveis de cálcio. Os resultados demonstraram que a liberação de flúor dos cimentos de ionômero de vidro convencionais foi significativamente maior do que dos outros materiais testados.

No estudo *in situ* de Amaral et al.⁴, as restaurações com cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX foram mais resistentes à desmineralização do que às restauradas com selantes resinosos.

Herrera et al.³⁶ avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes cimentos de ionômero de vidro restauradores (Ketac-Fil, 3M ESPE; Ketac-Silver, 3M ESPE; Fuji II LC, Fuji; e, Vitremer, 3M ESPE), quando expostos a microrganismos relacionados à cárie e à doença periodontal. Utilizando trinta e duas espécies bacterianas, de cinco gêneros incluindo *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Porphyromonas* spp. e *Clostridium* spp., foi possível observar que todos os cimentos de ionômero de vidro inibiram o crescimento bacteriano, embora com diferenças nos halos de inibição.

Na literatura, diversas metodologias têm sido citadas para avaliação da ação antibacteriana de diferentes materiais restauradores. Dentre elas, a avaliação de halos de inibição por meio da difusão em ágar¹⁷, testes de contato direto²⁰ e aderência^{26, 32}, além das metodologias envolvendo situações de desafio cariogênico.

A ação antibacteriana de diferentes materiais restauradores, incluindo ionômeros de vidro modificados por resina e resinas compostas modificadas por poliácidos, foi avaliada por Candido et al.¹⁷. Neste estudo, os autores observaram que o ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE) apresentou atividade antibacteriana homogeneamente inibitória frente a culturas puras de *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus* e culturas mistas, coletadas da cavidade bucal. As leituras dos halos de inibição

demonstraram que o material restaurador apresentou atividade antibacteriana homogeneamente inibitória frente aos microrganismos testados.

Pesquisas com resinas compostas modificadas por poliácidos, bem como ionômeros de vidro modificados por resina, intensificaram-se na última década ^{4, 16, 19, 20, 25, 44, 50, 54, 63, 64, 68}. Em estudo realizado por Benelli et al. ¹¹, o potencial anticariogênico do cimento de ionômero de vidro Chelon-Fil – 3M ESPE foi avaliado em estudo *in situ*, por meio da utilização de blocos de esmalte restaurados com o material. *S. mutans* e *Lactobacillus* foram quantificados no biofilme dentário e os resultados mostraram que a quantidade de bactérias no biofilme formado sobre as restaurações com o material foi menor que nas demais superfícies, confirmando o efeito anticariogênico deste material, que pode ser de grande valia para a prevenção de cáries secundárias, ou em condições de alto risco à doença cárie.

Em outro estudo, Kotsanos ⁴² avaliou o potencial cariostático de materiais liberadores de flúor, dentre eles o ionômero de vidro modificado por resina Vitremer – 3M ESPE, analisando lesões de cárie induzidas em esmalte em contato com os materiais intra-oralmente. O autor verificou que o potencial anticariogênico do Vitremer foi de 82%, além das restaurações não apresentarem lesões subsuperficiais típicas, que os demais grupos com outros materiais restauradores apresentaram.

Em estudo *in vitro*, realizado por Pin et al. ⁶⁴, o ionômero de vidro modificado por resina Vitremer – 3M ESPE demonstrou maior poder cariostático, resultado este também obtido por Lobo et al. ⁴⁶, no qual avaliaram diversos materiais restauradores por meio de diferentes métodos de indução de lesão de cárie *in vitro*. Os autores utilizaram o método microbiano, bem como a ciclagem de pH e concluíram que em ambos os métodos, o ionômero de vidro modificado por resina Vitremer obteve bons resultados. Os demais materiais testados no estudo também apresentaram comportamentos semelhantes nos dois métodos.

No entanto, quando outros métodos de indução de cárie secundária são utilizados, como no estudo de Yaman et al.⁸⁵, os resultados entre os materiais são diferentes. Neste estudo, os autores testaram a capacidade de diferentes materiais contendo flúor, como compômeros, de inibir a formação de lesão de cárie secundária, imergindo as amostras restauradas com diferentes materiais em gel ácido por seis semanas. Os resultados demonstraram que os materiais resinosos e compômeros não foram capazes de inibir a formação de lesão de cárie secundária como os cimentos de ionômero de vidro convencionais. Entretanto, os autores afirmaram que em lesões de Classe V, embora os compômeros tenham menor eficácia na prevenção de lesões de cárie secundária, estes devem ser usados quando a alternativa for uma resina composta, devido a melhores propriedades mecânicas.

É possível observar que há pouca literatura que confirme ou não o potencial anticariogênico de compômeros na inibição de lesões de cárie secundária em estudos *in situ* ou *in vivo*⁴⁴. Assim, torna-se claro a necessidade de pesquisas mais aprofundadas sobre o potencial anticariogênico de diferentes materiais liberadores de flúor, quando diferentes metodologias de indução de lesão de cárie secundária são utilizadas.

2.3 Microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS)

A luz natural (luz solar, por exemplo) é composta de ondas que oscilam em todos os ângulos possíveis no plano perpendicular

ao movimento. Polarização é um fenômeno que ocorre quando a luz passa através de certos materiais, que contêm dois índices de refração, sendo ditas birrefringentes, tais como os cristais. A luz é dividida de modo que emergem dois raios luminosos derivados de um só. Um polarizador de luz é um material que permite a passagem de luz somente em um ângulo de vibração específico. A luz é considerada como sendo linearmente polarizada quando esta contém ondas que oscilam em um único plano específico ¹⁴.

O uso de microscopia de luz polarizada é corriqueiro no estudo de cristais. O microscópio de luz polarizada é dotado de alguns acessórios especiais entre os quais se destacam um par de polarizadores com ângulo relativo ajustável entre os eixos ópticos. O primeiro deles, situado embaixo da platina do microscópio próximo à fonte de luz é dito polarizador, sendo constituído por um prisma de quartzo Nicol, filtrando a luz e permitindo que sobre a amostra incida luz polarizada. Após passar por esta e pela amostra (que se encontra sobre uma platina giratória), a luz atravessa o segundo polarizador, dito analisador, que está localizado perto da ocular dentro do tubo do microscópio. Quando a posição dos prismas analisador e polarizador é ajustada, de modo que os feixes luminosos tenham um trajeto paralelo, uma imagem normal pode ser vista através da ocular. Se o analisador é então rodado de modo que o seu eixo fique em ângulo reto com o polarizador, nenhuma luz alcança a ocular e nada pode ser visto. Colocando-se um objeto amorfo (não refringente) na platina do microscópio, com os prismas na mesma posição em ângulo reto, nada será visto, porque os raios de luz não foram divididos pelo objeto. Porém, se for colocado um objeto cristalino ou birrefringente (ou seja, que possui a propriedade de criação de dois raios refratados a partir de um único raio inicial) na platina, uma imagem luminosa aparecerá em fundo escuro ¹⁴.

Assim, a fim de que materiais biológicos alterem a direção da luz e possam ser vistos por meio de luz polarizada, sua

estrutura submicroscópica deve ser de moléculas assimétricas orientadas. Dentre os diversos materiais biológicos estudados com auxílio de microscopia estão incluídas fibras musculares, fibras de tecido conjuntivo e gotículas de gordura, que exibem birrefringência, assim como materiais cristalinos e têm sido estudados intensivamente com microscópio de luz polarizada ¹⁴. No caso do esmalte dentário, devido à sua histologia composta por cristais de hidroxiapatita, é possível o estudo de lesões de cárie em esmalte por meio da microscopia de luz polarizada, uma vez que a subsuperfície e a região superficial do esmalte apresentam birrefringência ⁸⁴.

Um estudo recente ⁷⁵ demonstrou que existe a possibilidade matemática de se calcular o conteúdo mineral de uma superfície de esmalte (V_1) por meio da microscopia de luz polarizada. Para isso, basta aplicar a seguinte expressão matemática:

$$V_2 = 1 - V_1, \text{ assim como}$$

$$V_2 = \alpha_1 + \alpha_2 + \beta$$

$$n_2 = 1,33 \frac{\alpha_1}{V_2} + n_1 \frac{\alpha_2}{V_2} + 1,56 \frac{\beta}{V_2}$$

na qual α_1 é o volume de água deixada no esmalte após secagem a vácuo por 48 horas, α_2 é o volume de água removida por este procedimento, n_1 é o índice de refração do meio, n_2 é o índice de refração da fase não-mineral e β é o volume da matriz orgânica. O resultado do trabalho demonstrou que o esmalte dentário possui composição mineral variando de 88,16% a 97,71%. A composição mineral do esmalte é basicamente hidroxiapatita e sua variação se deve ao grau de maturação do tecido, bem como variações individuais ⁷⁵.

A espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS – *Energy Dispersion X-ray Spectroscopy*) determina quantitativamente os elementos químicos de uma amostra, irradiando-a com raios-X e então

analisando a fluorescência dos raios-X re-emitidos. A EDS representa uma técnica valiosa para realização de análise qualitativa e quantitativa dos elementos químicos presentes em materiais ^{8, 49, 51}.

Os componentes básicos do espectrômetro por dispersão de raios-X podem ser resumidos em:

- a) fonte de excitação;
- b) um arranjo geométrico para colimação e monocromatização de radiação primária;
- c) um detector de raios-X;
- d) *software* para operar o instrumento, aquisição de dados e determinar a concentração de cada elemento químico presente na amostra ⁸.

Quando uma amostra é excitada pelos raios-X, os elementos químicos individuais que compõe esta amostra re-emitem seus próprios raios-X característicos e estes podem ser quantitativamente analisados para confirmar quais elementos químicos estão presentes no material ^{6, 8}.

A microanálise por EDS permite analisar minuciosamente diminutas partículas de amostras biológicas para decifrar a patogênese de várias doenças. Apesar de esta técnica estar sendo usada em alguns tipos de pesquisa odontológica (tais como análise de ligas para implantes odontológicos), pouca aplicação de diagnóstico bucal prático de doenças tem sido reportada na literatura ²³.

A microanálise por EDS pode ser melhor entendida observando-se o conceito de Bohr da estrutura atômica: no centro do átomo temos nêutrons e prótons com elétrons orbitando em camadas de energia específica. Vagas criadas pela interação dos elétrons nas camadas mais internas são preenchidas por elétrons que “saltam” das camadas mais externas. Um detector de lítico associado a um analisador computadorizado detecta fótons específicos de energia liberados por este “salto” das camadas de energia. A análise do quanta de energia revela a

presença de elementos químicos em particular. Torna-se aparente que esta técnica pode ser utilizada no auxílio ao diagnóstico e pode na verdade ser o único instrumento satisfatório com o qual se obtém um diagnóstico em casos selecionados ²³.

Para análise do *software* da EDS, são necessários os seguintes parâmetros para o cálculo da concentração relativa dos elementos químicos: voltagem do feixe de elétron incidente, detector do ângulo azimute, ângulos de elevação e inclinação, ângulo inicial da amostra, computada por uma fórmula trigonométrica e espessura específica do detector, corrigida para possível desalinhamento da amostra. O usuário indica quais elementos serão pesquisados na amostra (máximo de vinte) e para cada elemento, o programa estabelece de sua base de dados o número atômico. É também estabelecida a camada de elétron (K ou L, por exemplo) e a série da camada (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 ou β_3 ou várias séries em conjunto) e o algoritmo que o programa pode processar, mediante as informações recebidas. Além destes fatores, o *software* também trabalha com o valor da absorção corrigida, espessura aparente da amostra (dado este fornecido pelo usuário) e a densidade da amostra. Com todos estes dados e por meio de cálculos avançados, o *software* consegue estabelecer mediante a energia liberada pelos elétrons, a concentração aparente dos elementos químicos naquela amostra ⁸³.

Além da EDS, as metodologias que podem ser empregadas para análise química de uma amostra incluem a espectroscopia fotoelétrica de raios-X e a espectroscopia por ressonância nuclear magnética. A espectroscopia fotoelétrica de raios-X é um método específico utilizado para determinar o potencial de ligação química em superfícies de substrato com não mais que dez camadas atômicas e tem sido usada na tentativa de provar a ligação química estabelecida entre materiais restauradores e a superfície dentária. No caso da espectroscopia por ressonância nuclear magnética, há a identificação e avaliação da estrutura química molecular, uma vez que esta metodologia

possui resolução e sensibilidade suficiente para analisar possíveis reações químicas ³¹.

Tem sido sugerido que as propriedades mecânicas de um tecido calcificado são geralmente ligadas ao seu conteúdo mineral. A incorporação de outros elementos químicos como sódio, flúor ou carbono na estrutura apatita de cristais de esmalte pode resultar em alterações físico-químicas e nas propriedades mecânicas do esmalte. Por exemplo, uma maior concentração de carbonato na estrutura cristalina leva a menor cristalinidade e portanto, maior solubilidade dos tecidos dentais duros, enquanto que a substituição por fluoreto resulta em cristais maiores e melhor cristalinidade, o que reduz a solubilidade do esmalte. Entender a natureza e o conteúdo mineral é também importante quando se estuda a adesão de materiais restauradores à superfície dentária. Alguns materiais, como os cimentos de ionômero de vidro, dependem da adesão aos componentes mineralizados do substrato dentário. A EDS pode ser utilizada para adquirir informação sobre as apatitas biológicas presentes no esmalte dentário ⁴⁸.

Embora a EDS não analise a estrutura química molecular da amostra, nem seu potencial de ligação química, ela se apresenta como um método confiável, o qual fornece o percentual relativo de determinado elemento químico da estrutura analisada, bem como a energia por ele liberada.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- a) avaliar os efeitos de diferentes materiais restauradores quando submetidos a metodologias *in vitro* de indução de lesões de cárie secundária: desafio cariogênico em cultura de *S. mutans* e desafio cariogênico em soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH), e *in situ* com aparelhos palatais, por meio de microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS);
- b) avaliar a aderência de cultura de *S. mutans* à superfície de diferentes materiais restauradores.

4 MATERIAL E MÉTODO

A metodologia aplicada neste estudo foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOSJC-UNESP), (ANEXO A e B).

4.1 Seleção e armazenamento das amostras

Foram utilizados para este estudo 84 molares humanos, inclusos, não-impactados, com 1/3 de raiz formada, recém-extraídos, armazenados em soro fisiológico e congelados, obtidos da Clínica de Cirurgia e Periodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista (FOSJC-UNESP). O tecido pulpar coronário foi removido retrogradamente com limas do tipo Hedströen (Maillefer) n° 45, 50 e 60 esterilizadas. As cavidades pulpares e os condutos radiculares foram irrigados retrogradamente com 10 mL de hipoclorito de sódio 0,5% para remoção dos resíduos. Os dentes foram mantidos em soro fisiológico, em freezer (-10°C), até o momento de uso⁵. O Equipamento de Proteção Individual composto por luvas, máscara, gorro, óculos de proteção e jaleco foi utilizado durante toda a parte experimental.

As coroas dos dentes foram analisadas em lupa estereoscópica (Olympus 2000, USA), com aumento de 10X e iluminação direta, tendo como critério de inclusão do espécime ausência de alteração de cor, trincas e/ou fraturas. Os dentes receberam polimento coronário,

utilizando-se taças de borracha, montadas em peça de mão em baixa velocidade e pasta de pedra pomes e água por 15 segundos ⁵⁴. A seguir, as amostras foram lavadas abundantemente com spray de ar e água até a remoção da pasta. Isto feito, as amostras foram mantidas em umidade relativa 100% em estufa de cultura (Fanem Ltda. – Modelo 002 DB, Brasil) a 37°C ⁵⁴.

4.2 Preparos cavitários e divisão das amostras em grupos de acordo com o material restaurador

Os dentes receberam preparos classe V padronizados em suas superfícies vestibulares e linguais. Todos os preparos foram realizados 5 mm acima da junção cimento-esmalte, no centro da superfície vestibular ou lingual. Estes preparos foram realizados com ponta diamantada (KG Sorensen, Referência 2294, Brasil), cuja ponta ativa contém 2,0 mm de diâmetro e 1,5 mm de profundidade, limitados por um stop, o que resultou em preparos cavitários padronizados, com margens totalmente localizadas em esmalte. Cada ponta diamantada foi acoplada a uma caneta de alta rotação (Kavo Super Torque 625, Brasil), com refrigeração constante de ar e água e foi utilizada para realizar 5 preparos.

Sessenta dentes receberam corte em sentido méso-distal, separando as superfícies vestibular e lingual, totalizando 120 espécimes.

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: RC-Z (n=30), no qual os espécimes foram restaurados utilizando-se sistema adesivo Prime & Bond 2.1 (Dentsply – Brasil) e resina composta Z-250 (3M ESPE, St. Paul, Minnesota, USA); RC-F (n=30), no qual os espécimes foram restaurados utilizando-se o sistema adesivo

Prime & Bond 2.1 e resina composta modificada por poliácidos Freedom (SDI, Florida, USA); CIV-V (n=30), no qual os espécimes foram restaurados, utilizando-se ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE); CIV-J (n=30), no qual os espécimes foram restaurados utilizando-se cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX (GC International, USA).

O grupo controle foi composto por seis espécimes restaurados com cada material restaurador dos grupos anteriores (n=24). Os materiais restauradores foram utilizados na cor A3,5, em incremento único ⁹, sendo ativados com o fotopolimerizador Optilight Plus (Gnatus, Brasil), previamente regulado em 500mW/cm² de potência ⁴⁵.

Vinte e quatro horas após os procedimentos restauradores ⁴⁵, os espécimes receberam acabamento e polimento com o sistema Sof-lex (3M ESPE) de discos de óxido de alumínio. Para a aplicação destes materiais restauradores, as recomendações de cada fabricante, expostas no Quadro 1, foram seguidas.

Após as restaurações, acabamento e polimento, cada espécime foi analisado em lupa estereoscópica (aumento de 10X) para avaliação da superfície restaurada. Os espécimes que apresentaram trincas ou fendas na superfície restaurada foram eliminados do estudo e substituídos por outros.

Quadro 1: Aplicação dos materiais restauradores utilizados de acordo com as recomendações dos fabricantes (continua)

Material	Grupo (s)	Descrição	Modo de utilização
Gel Etchant (3M ESPE)	RC-Z e RC-F	Gel para condicionament o ácido	Aplicar na superfície dentária após o preparo, aguardar 15 segundos, lavar com água da seringa triplice por 15 segundos e secar suavemente por 5 segundos com ar da seringa triplice.
Prime & Bond 2.1 (Dentsply – Brasil)	RC-Z e RC-F	Sistema Adesivo	Aplicar com o auxílio de um pincel tipo Microbrush* uma camada, aplicar um jato de ar para evaporação do solvente, aplicar uma segunda camada e fotoativar* por 10 segundos.
Z-250 (3M ESPE)	RC-Z	Resina composta microhíbrida	Aplicar incremento único utilizando-se uma espátula* (Thompson número 4 – Moyco Union Broach) e fotoativar* por 40 segundos.
Freedom (SDI)	RC-F	Resina composta modificada por poliácidos	Aplicar incremento único utilizando uma espátula* (Thompson número 4 – Moyco Union Broach) e fotoativar* por 40 segundos.
Primer Vitrem (3M ESPE)	CIV-V	Primer ácido do sistema Vitrem	Aplicar uma camada com auxílio de um pincel tipo Microbrush*, secar por 5 segundos com leves jatos de ar da seringa triplice e fotoativar* por 40 segundos
Vitrem (3M ESPE)	CIV-V	Ionômero de vidro modificado por resina	Espátular o material na proporção de pó/líquido 1:1 durante 45 segundos. Inserir na cavidade com pontas LCCV* descartáveis e uma Seringa Centrix*. Inserir na cavidade em incremento único e fotoativar* por 40 segundos.
Vitrem Finishing Gloss (3M ESPE)	CIV-V	Protetor de superfície	Aplicar uma camada com auxílio de pincel tipo Microbrush* e fotoativar* por 20 segundos.

Quadro 1: Aplicação dos materiais restauradores utilizados de acordo com as recomendações dos fabricantes (conclusão)

Material	Grupo (s)	Descrição	Modo de utilização
Fuji IX GP(GC International)	CIV-J	Cimento de ionômero de vidro convencional	Aglutinar pó e líquido na proporção 1:1 por 25-30". Aplicar na cavidade. Após a geleificação do material, aplicar uma camada de Verniz Fuji GC para proteção superficial.
Sistema Sof-lex (3M ESPE)	RC-Z, RC-F e CIV-V	Sistema de discos de óxido de alumínio para acabamento e polimento	Foram utilizados os discos de granulação fina e ultrafina acoplados em um mandril em baixa rotação (KAVO) com refrigeração de ar e água durante 15 segundos cada disco ⁵⁴ .

* Microbrush Disposable Brush Tips (3M ESPE)

* Fotoativação realizada com fotopolimerizador Optilight Plus (Gnatus), previamente regulado em 500 mW/cm² de potência.

♦ Espátula utilizada para inserção da resina: Thompson número 4 (Moyco Union Broach).

* Pontas descartáveis e Seringa Centrix (Centrix Inc., USA).

4.3 Separação dos corpos-de-prova conforme o método de indução de cárie

Cada espécime foi cortado utilizando-se um disco diamantado dupla face (KG Sorensen – Referência 7020) acoplado a uma peça de mão (Kavo), com refrigeração de ar e água até atingir a área de 16 mm², ou seja, 4 mm de largura por 4 mm de comprimento. Para que todos os corpos-de-prova apresentassem o mesmo tamanho, eles tiveram suas arestas lixadas e mensuradas utilizando-se um paquímetro. A seguir, os corpos-de-prova receberam duas camadas de esmalte para unha (Colorama), de cor vermelha, com exceção da superfície que continha a restauração e que foi submetida à simulação de lesões de cárie *in vitro*^{54, 71}.

Para certificação de que os corpos-de-prova não apresentavam lesão de cárie inicial ou qualquer alteração do esmalte, os mesmos foram radiografados com auxílio de radiografia digital e examinados por um único avaliador. Corpos-de-prova com alteração radiográfica visível na superfície do esmalte foram excluídos do estudo.

A seguir, os corpos-de-prova foram colocados em placa de cultura de células (Costar Cambridge, Massachussets, USA), identificados, conforme demonstrado no Quadro 2, e esterilizados, utilizando dose de 20 kGy de radiação gamma, por meio da Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD), para não afetar a microdureza do esmalte nem sua resistência à desmineralização^{44, 67}. Após a esterilização, a placa de cultura de células contendo os corpos-de-prova foi armazenada em estufa bacteriológica a 37°C.

Os materiais restauradores estão demonstrados na Figura 1, bem como o espécime radiografado digitalmente.



FIGURA 1 – (A) Resina composta Z-250, grupo RC-Z; (B) Resina composta modificada por poliácidos Freedom, grupo RC-F; (C) Ionômero de vidro modificado por resina Vitremer, grupo CIV-V; (D) Cimento de ionômero de vidro Fuji IX, grupo CIV-J; (E) Verniz protetor aplicado no grupo CIV-J; (F) Radiografia digital de corpo-de-prova antes da submissão ao desafio cariogênico.

Quadro 2: Descrição dos grupos com os respectivos materiais restauradores e indução de lesões de cárie

Grupo	Material restaurador	n*	Indução de lesões de cárie <i>in vitro</i>
RC-Z	Resina composta Z-250 (3M ESPE)	12	Desafio cariogênico com cultura de <i>S. mutans</i>
RC-Z	Resina composta Z-250 (3M ESPE)	12	Desafio cariogênico com soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH)
RC-Z	Resina composta Z-250 (3M ESPE)	6	Sem indução de lesões de cárie (grupo controle)
RC-F	Resina composta modificada por poliácidos Freedom (SDI)	12	Desafio cariogênico com cultura de <i>S. mutans</i>
RC-F	Resina composta modificada por poliácidos Freedom (SDI)	12	Desafio cariogênico com soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH)
RC-F	Resina composta modificada por poliácidos Freedom (SDI)	6	Sem indução de lesões de cárie (grupo controle)
CIV-V	Ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE)	12	Desafio cariogênico com cultura de <i>S. mutans</i>
CIV-V	Ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE)	12	Desafio cariogênico com soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH)
CIV-V	Ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE)	6	Sem indução de lesões de cárie (grupo controle)
CIV-J	Cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX (GC International)	12	Desafio cariogênico com cultura de <i>S. mutans</i>
CIV-J	Cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX (GC International)	12	Desafio cariogênico com soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH)
CIV-J	Cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX (GC International)	6	Sem indução de lesões de cárie (grupo controle)

* n= número de corpos-de-prova por grupo

Os corpos-de-prova do grupo controle não foram submetidos a nenhuma metodologia de indução de lesões de cárie. Metade dos corpos-de-prova deste grupo (3 corpos-de-prova de cada material) foi submetida à análise por microscopia de luz polarizada e EDS 24 horas após a esterilização. A outra metade (3 corpos-de-prova de cada material) foi submetida à mesma análise após 28 dias em imersão em água destilada. Um padrão da área e da composição química da superfície de esmalte restaurada com cada material foi obtido após a média aritmética dos valores obtidos com os corpos-de-prova 24 horas, após a esterilização e 28 dias após a imersão em água destilada.

4.3.1 Desafio cariogênico com *S. mutans*

Os corpos-de-prova foram submetidos ao desafio cariogênico utilizando cultura de *S. mutans* (ATCC 35688), semeada em meio de cultura proposto por Gibbons e Nygaard³³, constituído pelos componentes descritos no Quadro 3.

Para o preparo, os componentes foram misturados em um recipiente e foi acrescentada água destilada, completando 1.000mL. A seguir, o meio foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavado a 121°C por 15 minutos e armazenado em geladeira^{33, 62}.

Quadro 3 – Descrição do meio de cultura para *S. mutans* descrita por Gibbons e Nygaard⁵¹

Nome da substância	Fórmula química	Quantidade em 1.000 mL
Trypticase	*****	20 g
Cloreto de sódio	NaCl	2 g
Fosfato de potássio diabásico	K ₂ HPO ₄	3 g
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	2 g
Carbonato de potássio	K ₂ CO ₃	1 g
Sulfato de magnésio	MgSO ₄	120 mg
Sulfato de manganês	MnSO ₄	15 mg
Sacarose	C ₆ H ₈ O ₇	50 g
Água destilada	H ₂ O	1000 mL

A amostra padrão de *S. mutans* foi mantida em sangue de coelho, desfibrinado, a -10°C. Para a semeadura, a amostra foi descongelada e repicada em caldo infusão cérebro-coração (*BHI Brain Heart Infusion, Difco*) e incubada por 24 horas, em microaerofilia, a 37°C. Foram feitos três repiques antes da inoculação em meio sólido. A partir do crescimento em meio sólido, os microrganismos foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%), com o auxílio de alça de platina e as suspensões foram padronizadas em 10⁶ células/mL, com auxílio de espectrofotometria (Shinadzu modelo UV-1203, Kyoto – *Japan*). Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda utilizados para *S. mutans* foram, respectivamente 0,620 e 398 nm, estabelecidos previamente no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (FOSJC-UNESP)¹⁸.

Em câmara de fluxo laminar e com auxílio de micropipetas de 1 mL e 1 µL (Labmate, HTL, USA) e pinça esterilizada, foi colocado em cada poço da placa de cultura de células: 1 corpo-de-prova, 2 mL de meio de cultura para *S. mutans* e 0,1 mL da suspensão de *S. mutans*. Os corpos-de-prova foram incubados a 37°C em microaerofilia. A

cada 48 horas, o meio de cultura foi trocado em câmara de fluxo laminar, utilizando-se micropipeta de 1 mL. A turvação do meio após a troca denotou crescimento bacteriano. Para certificar que não houve contaminação, a cada troca de meio foi obtido o esfregaço e realizada a coloração de Gram, que evidenciou a ausência de contaminação.

Os corpos-de-prova ficaram imersos em cultura de *S. mutans* por 14 dias, conforme descrito por Itota et al.³⁹ e Seeman et al.⁷⁰. Após este período, os corpos-de-prova foram imersos em solução remineralizante durante 14 dias, conforme descrito por Seeman et al.⁷⁰, que se encontra descrita no Quadro 4. A solução remineralizante que foi utilizada apresentou pH igual a 6,8 e mucina em sua composição^{26, 69}.

Findado os 28 dias de metodologia microbiológica de indução de lesão de cárie secundária (14 dias de imersão em cultura de *S. mutans* e 14 dias de imersão em solução remineralizante), os corpos-de-prova foram armazenados em umidade relativa 100% a 37°C.

Quadro 4 – Solução remineralizante proposta por Seeman et al.⁷⁰

Nome da substância	Fórmula química	Quantidade
Água destilada	H ₂ O	1.000 mL
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	0,33 g
Fosfato de sódio monobásico	Na ₂ HPO ₄	0,34 g
Cloreto de potássio	KCl	1,27 g
Tiocianeto de sódio	NaSCN	0,16 g
Cloreto de sódio	NaCl	0,58 g
Cloreto de cálcio	CaCl ₂	0,17 g
Cloreto de amônio	NH ₄ Cl	0,16 g
Uréia	CO(NH ₂) ₂	0,2 g
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	0,03 g
Vitamina C (ácido ascórbico)	C ₆ H ₈ O ₆	0,002 g
Mucina tipo III (Sigma-Aldrich Brasil, Ltda.)	*****	2,7 g

4.3.2 Desafio cariogênico com soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH)

O desafio cariogênico com soluções desmineralizantes e remineralizantes, também chamada de ciclagem de pH, foi preconizado por Featherstone e Rodgers²⁸ e adaptado por Serra e Cury⁷¹.

Utilizou-se 24 mL de cada solução por corpo-de-prova, baseando-se na quantidade de solução pela área do corpo-de-prova (15mL de solução para cada 10mm² de área do corpo-de-prova)⁷¹. Os componentes da solução desmineralizante estão descritos no Quadro 4 e da solução remineralizante no Quadro 5.

Quadro 4 – Componentes da solução desmineralizante

Nome da substância	Fórmula química	Quantidade
Água destilada	*****	144,45 mL
Hidróxido de cálcio	Ca(OH)_2	154,13 mg
Ácido acético	CH_3COOH	3 mL
Acetato de sódio	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	3,1 g
Ácido orto-fosfórico	H_3PO_4	0,13 mL
Água destilada (q.s.p.)	H_2O	1000 mL

Fonte: Serra e Cury⁷¹

Quadro 5 – Componentes da solução remineralizante

Nome da substância	Fórmula química	Quantidade
Água destilada	H_2O	144,45 mL
Hidróxido de cálcio	Ca(OH)_2	115,59 mg
Ácido clorídrico	HCl	1 mL
Cloreto de potássio	KCl	11,18 g
Ácido orto-fosfórico	H_3PO_4	0,06 mL
Tris-hidroximetil-aminometano	$\text{NH}_2\text{C(CH}_2\text{OH)}_3$	2,42 g
Ácido clorídrico	HCl	2 mL
Água destilada (q.s.p.)	*****	1000 mL

Fonte: Serra e Cury⁷¹

Após o preparo das soluções, foi aferido o pH das mesmas, utilizando-se pHmetro (Metler Toledo MP 220), obtendo-se pH 4,0 para a solução desmineralizante e pH 7,0 para a solução remineralizante^{54, 78}.

As soluções foram armazenadas em embalagens plásticas de 5000 mL, devidamente tampadas e em geladeira. As soluções foram colocadas em um agitador magnético (MA 085 – Marconi Equip. Lab., Brasil), para homogeneização por 30 minutos, antes da utilização das mesmas. Os corpos-de-prova receberam a ciclagem de pH por 9 ciclos, sendo cada ciclo correspondente a 6 horas em solução desmineralizante e 18 horas em solução remineralizante^{54, 71}.

As soluções foram colocadas em potes plásticos individuais pretos (para que a luz não alterasse a solução). Após o período de imersão, os potes plásticos individuais e os corpos-de-prova

eram lavados em água destilada corrente por 1 minuto e secos com toalhas de papel descartáveis. A solução era trocada e os potes plásticos individuais contendo os corpos-de-prova imersos nas respectivas soluções mantidos em estufa de cultura a 37°C ⁵⁴.

4.4 Análise das superfícies dos corpos-de-prova

Após a indução de cárie *in vitro*, os corpos-de-prova foram lavados em água destilada corrente por 1 minuto e submetidos à análise por microscopia e luz polarizada e EDS.

4.4.1 Avaliação por meio de microscopia de luz polarizada

Para avaliação qualitativa em microscópio de luz polarizada, os corpos-de-prova foram desgastados até atingirem a espessura mínima de 1 mm de espessura, conferida por um paquímetro, utilizando-se para tal, lixas d'água de carbureto de silício 400, 600, 800 e 1200 granulações, em politriz a 600 rotações por minuto. A seguir, os corpos-de-prova foram desgastados manualmente utilizando-se somente lixa d'água de carbureto de silício de 1200 granulações até atingir a espessura necessária para polarização da luz.

A seguir, os corpos-de-prova foram colocados em lâminas de vidro e pingada água destilada sobre eles. A análise da superfície foi realizada em microscópio de luz polarizada (Axiophot 2 – Zeiss, Germany), utilizando-se água destilada como meio de embebição dos corpos-de-prova ¹⁶. A análise da área da lesão de mancha branca formada foi realizada por meio da utilização do software NIH Image J, versão 1.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

As imagens foram inicialmente digitalizadas por uma câmera fotográfica digital Sony Cyber Shot, modelo DSC (Sony Corporation, USA), acoplada ao fotomicroscópio e então transferidas para microcomputador, no qual foi inserido o *software* para análise das imagens obtidas.

O sistema foi calibrado por meio de régua micrometrada (Zeiss), com intervalos de 10 μm , com objetiva de 10X de aumento. Após a calibração, o *software* automaticamente converteu, para milímetros, as medidas obtidas em *pixels*.

4.4.2 Avaliação por espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS)

A análise por EDS das lesões de cárie formadas foi realizada no Laboratório de Integração e Testes (LIT), Qualificação e Confiabilidade de Componentes, do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) em São José dos Campos, SP e no Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo (IGc-USP) em São Paulo, SP. Para isso, os espécimes foram desidratados, sendo imersos em soluções crescentes de alcóois a 70% por 15 minutos, 80% por 15 minutos, álcool 90% por 15 minutos e 100% por 30 minutos^{60, 62} e secos com papel de filtro. No LIT-INPE e no IGc-USP, os espécimes foram colocados em um *stubs*, sob fita de alumínio (3M Adhesives, Ltd., USA), submetidos à vácuo em um metalizador (Fisions Instruments, USA), no qual formou-se o plasma e uma fina camada de ouro foi depositada sobre cada corpo-de-prova.

Em seguida, os *stubs* contendo os espécimes foram colocados sob microscópio eletrônico de varredura (Link Isis Oxford Instrument PLC. Leica, USA) para serem submetidos novamente a vácuo. Com a fotomicrografia do espécime disposta no monitor acoplado ao

microscópio eletrônico de varredura, três *windows* de 1 mm x 1 mm, sendo separadas por 1 mm, cobrindo a área desmineralizada foram selecionadas ⁴⁰, conforme demonstrado na Figura 2. A análise por área permitiu analisar a composição química de vários pontos, tornando seus resultados mais precisos.

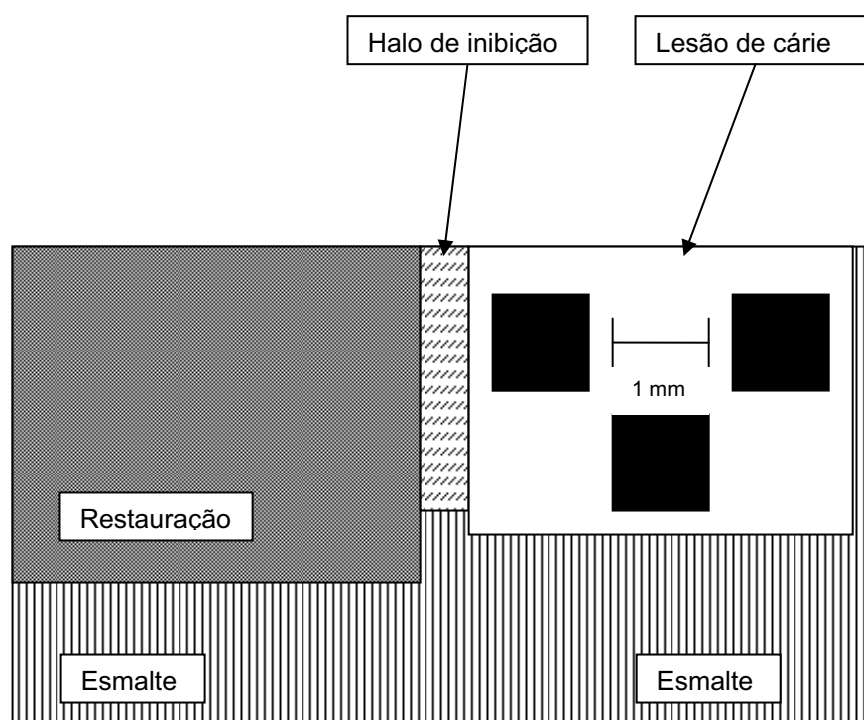


FIGURA 2 – Representação esquemática das medidas obtidas por microscopia de luz polarizada e EDS. Legenda: ■ *Windows* de EDS. Adaptado de Itthagarun et al. ⁴⁰.

Após a seleção da área, um feixe de elétrons de 20 KeV e 20 kV de voltagem de aceleração atingiu o *window* e após 50 segundos, o *software Isis Suíte Revision 3.35* providenciou o cálculo da energia liberada pelo elemento químico (resultados em KeV) e a porcentagem relativa do respectivo elemento químico.

Desta forma, a análise por EDS forneceu o padrão químico de cálcio, fósforo e flúor e este padrão foi comparado com o obtido com os espécimes do grupo controle, para que se observasse a alteração química nestes elementos ocorrida após as metodologias de simulação de lesões de cárie *in vitro*. Com a sobreposição dos padrões obtidos, foi possível observar a variação na concentração de cálcio, fósforo e flúor e a relação cálcio/fósforo em cada corpo-de-prova^{8, 31, 49, 56}.

Uma vez que o espectrômetro de dispersão de raios-X encontra-se acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, foi realizada microscopia eletrônica de varredura em todos os espécimes.

O espectrômetro de dispersão de raios-X foi calibrado a cada quatro *stubs* (cada um contendo 8 espécimes), utilizando-se amostras-padrão de Cr_2O_3 , titânio e sílica e CaSiO_3 ⁷⁷, com desvio padrão de 1%.

A Figura 3 demonstra os microscópios de luz com acessório para polarização e eletrônico de varredura, bem como o acessório para dispersão de raios-X.



FIGURA 3 – (A) Fotomicroscópio de luz com acessório para polarização; (B) Plasma de ouro sendo depositado sobre espécimes em metalizador; (C) Microscópio eletrônico de varredura; (D) Acessório para espectroscopia para dispersão de raios-X; (E e F) *Stub* com espécimes sendo colocado dentro do microscópio eletrônico de varredura

4.5 Estudo *in situ*

Para o estudo *in situ*, foram confeccionados 48 corpos-de-prova constituídos de esmalte dentário humano, de 4 mm x 4 mm x 2 mm⁸¹, restaurados com os materiais restauradores e esterilizados com radiação gamma conforme previamente descritos. Um total de 12 voluntários de 19-28 anos de idade^{2, 81} foram selecionados entre os alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOSJC-UNESP). Todos os voluntários foram informados da pesquisa e concordando com sua participação assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido^{2, 35, 44, 79} (APÊNDICE 1).

Para exclusão ou inclusão dos voluntários, foi realizada uma minuciosa anamnese (APÊNDICE 2) e exame clínico por meio da avaliação do Índice de biofilme descrito por Silness e Løe⁷³ e Índice de sangramento de Løe e Silness⁴⁷, descritos no Quadro 6. Foram excluídos indivíduos que apresentassem hábitos relacionados com fumo e etilismo, portadores de doenças sistêmicas, distúrbios de glândulas salivares, lesões de cárie ativa ou crônica, doença periodontal ou outro tipo de lesão bucal, além de usuários de medicamentos que interferissem na secreção salivar, enxagüatórios bucais e ainda, indivíduos que fizessem o uso de antibióticos nos três meses prévios ao início do estudo^{35, 44, 79, 81}.

Foi realizada a coleta de saliva estimulada e não-estimulada, para a determinação do fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e contagem de estreptococos do grupo mutans de cada voluntário^{79, 81}.

Quadro 6 – Descrição do Índice de biofilme de Silness e Løe⁷³ e Índice de sangramento de Løe e Silness⁴⁷

Dentes examinados	16, 12, 24, 36, 32 e 44
Faces analisadas	Vestibular, Mesial, Distal e Palatina (Lingual)
Score 0	Ausência de sangramento ou biofilme
Score 1	Leve inflamação com ausência de sangramento/ Biofilme presente, fortemente aderido à região cervical
Score 2	Inflamação visível, sangramento provocado/ Biofilme visível a olho nu, fracamente aderido e somente na região cervical
Score 3	Inflamação acentuada, sangramento espontâneo/ Biofilme abundante e presente em toda a face analisada
Score médio por dente	Soma dos escores das faces analisadas dividido por quatro
Score médio por voluntário	Soma dos escores médios por dente dividido por seis
Critério de inclusão	Score médio por voluntário abaixo de 2,0

4.5.1 Determinação do fluxo salivar, capacidade tampão e contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva

Para a coleta de saliva não-estimulada, os voluntários sentaram-se com suas cabeças ligeiramente posicionadas para baixo e removeram a saliva acumulada na boca gentilmente com uma espátula. Para a coleta estimulada, os voluntários reteram um pedaço de parafina na boca até que este ficasse amolecido. Então a saliva produzida foi deglutida e passou-se a contar o tempo de 5 minutos quando os voluntários começaram a mastigar a parafina. Após 5 minutos, cessou-se a mastigação e colheu-se a última porção de saliva estimulada. O volume foi medido e a velocidade avaliada em mililitro/minuto, sendo a velocidade normal de 1-2 mL/min. Voluntários que apresentaram valores abaixo da velocidade normal foram excluídos do estudo^{41, 81}.

Para a avaliação da capacidade tampão da saliva, 1 mL de saliva estimulada coletada dos voluntários foi adicionada a 3 mL de solução de HCl 0,005N. Após agitação, o tubo foi mantido aberto por 10 minutos para remoção de CO₂, a seguir o pH foi medido em pHmetro (Metler Toledo MP 220). Valores finais de pH de capacidade tampão de saliva entre 5 e 7 foram considerados normais, sendo valores abaixo motivos para exclusão dos voluntários ^{41, 81}.

Para a contagem de estreptococos do grupo mutans, 1 mL da saliva coletada dos voluntários foi diluída em base 10 e semeada em meio de cultura Mitis Salivarius (Difco), acrescido de 15% de Sacarose e Bacitracina (Acros Organics, New Jersey, USA) sendo diluídos 0,05 g de Bacitracina em 10 mL de água destilada. Após filtração, a solução foi adicionada ao meio de cultura na proporção de 0,72 mL de solução para 900 mL de meio. Após 72 horas de incubação a 37°C em microaerofilia, o número de unidade formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi determinado e valores acima de 10⁶ foram considerados altos e motivo de exclusão de voluntários ^{41, 81}. Os resultados dos exames para inclusão e exclusão dos voluntários encontram-se descritos no APÊNDICE 3.

Sete dias antes da inserção dos voluntários no estudo, eles utilizaram o dentífrico à base de sílica não-fluoretado, manipulado especialmente para este estudo (Becker Farmácia de Manipulação Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil) e após o período *washout*, iniciaram o uso dos aparelhos palatais ^{2, 4, 35, 79}.

4.5.2 Aparelhos palatais

Todos os voluntários incluídos no estudo foram moldados com silicona de adição (Optosil, Dentsply, Brasil) e um aparelho acrílico individual foi confeccionado para cada um ². Cada aparelho continha um corpo-de-prova de cada material, que foi aleatoriamente colocado a 1 mm da margem de acrílico ^{11, 22, 35, 44}. Oito vezes ao dia (8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00, 20:00, 22:00), dez voluntários removeram os aparelhos e pingaram uma gota de solução de sacarose a 20% ^{2, 35, 81} filtrada e dois pingaram uma gota de água destilada estéril (grupo controle) ². O excesso de fluido foi removido com um *swab*, na tentativa de se evitar o efeito *cross-over* ². Após 5 minutos, os aparelhos foram recolocados na boca ^{2, 35}. Esta parte do experimento teve duração de 14 dias ².

Durante este período, os voluntários usaram somente dentífricos à base de sílica não-fluoretados ^{2, 4, 35, 79}. Além disso, a água consumida foi fluoretada, da cidade de São José dos Campos, São Paulo. Os voluntários receberam instruções escritas para durante o estudo *in situ*, não utilizarem antimicrobianos ou produtos fluoretados ^{2, 4, 81}. Após este período, os blocos de esmalte foram delicadamente removidos e submetidos à análise por microscopia de luz polarizada e EDS, conforme descritos anteriormente.

Um exemplo de aparelho palatal utilizado no estudo *in situ* está demonstrado na Figura 4.

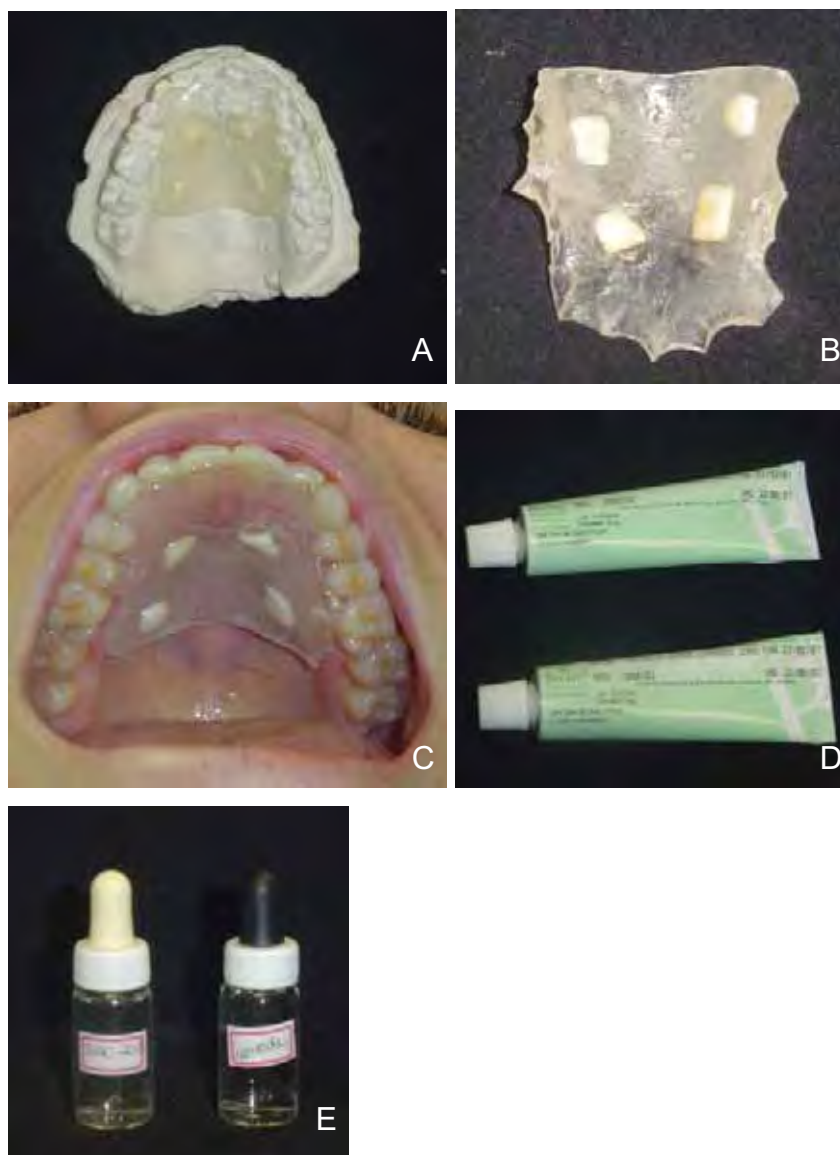


FIGURA 4 – (A) Aparelho palatal contendo os espécimes em modelo de trabalho; (B) Aparelho palatal; (C) Aparelho colocado na cavidade bucal de voluntário; (D) Dentífrício não-fluoretado; (E) Conta-gotas com soluções de sacarose a 20% e água destilada.

4.6 Aderência de *S. mutans* aos materiais restauradores

Foram confeccionados 10 corpos-de-prova de cada material restaurador, descrito no Quadro 1, sendo divididos em quatro grupos (n=10). Para a confecção dos corpos-de-prova, foi utilizada uma matriz de teflon bi-partida, contendo um orifício central de 5 mm de diâmetro por 2 mm de altura, demonstrada na Figura 5. A matriz de teflon está contida em uma matriz metálica, na qual foi inserida uma tira de poliéster sob a matriz de teflon. Os materiais restauradores foram manipulados conforme as recomendações do fabricante (descritas no Quadro 1) e inseridos em incremento único⁹, sendo armazenados em umidade relativa 100% a 37°C por 24 horas⁵⁴. A seguir, os corpos-de-prova receberam duas camadas de esmalte para unha (Colorama Ind. e Com., Brasil), da cor vermelha em todas as superfícies, com exceção da superfície que permaneceu em contato com a tira de poliéster. Os corpos-de-prova foram acondicionados em placas de cultura de células (Costar) e submetidos à esterilização por radiação gamma, conforme descrito no item 4.3.

Após a esterilização, as placas de cultura de células foram mantidas em estufa a 37°C.

4.6.1 Ensaio de aderência

Foi utilizada amostra-padrão de *S. mutans* (ATCC 35688), a qual foi semeada em placas de ágar infusão cérebro e coração (BHI – Difco, Detroit, USA) e incubadas a 37°C por 48 horas. A partir do crescimento, foram preparadas suspensões de *S. mutans* contendo 10⁶ células/mL¹⁸. As suspensões foram padronizadas por análise em espectrofotometria, conforme item 4.3.1.

O teste de aderência foi realizado em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), sendo adicionado a cada poço contendo um corpo-de-prova: 2 mL de meio de cultura para *S. mutans* descrita por Gibbons e Nygaard ³³ (Quadro 3) e 0,1 mL da suspensão padronizada de *S. mutans*.

As placas de cultura de células foram tampadas e incubadas a 37°C por 24 horas, em microaerofilia. A seguir, os corpos-de-prova foram removidos com auxílio de uma pinça clínica estéril e lavados três vezes com 1 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%), com auxílio de uma micropipeta de 1 mL, para remoção de microrganismos não-aderidos ^{32, 57} e transferidos para tubos Falcon contendo 20 mL de solução PBS (*Phosphate Buffer Saline*) ²⁶, com pH 7,0.

Os tubos Falcon foram submetidos ao homogeneizador ultra-sônico Sonoplus HD 2200 a 50 W durante 30 segundos, conforme preconizado por Otake et al. ⁵⁸, para remover as células bacterianas aderidas à superfície do material restaurador. Em seguida, os tubos Falcon foram levados à centrífuga refrigerada a 4°C por 6030 Xg durante oito minutos, para que houvesse formação do *pellet* ³². Os corpos-de-prova foram desprezados. O sobrenadante foi também desprezado em recipiente de vidro, dentro da câmara de fluxo laminar e 3 mL de solução fisiológica esterilizada foram adicionados a cada tubo Falcon, com auxílio de uma micropipeta de 1 mL. A seguir, cada tubo Falcon foi agitado em agitador de tubos Vortex durante 60 segundos para homogeneizar a solução. A suspensão obtida foi diluída (10^{-1} a 10^{-3}) e alíquotas foram transferidas, em duplicata, para placas com ágar BHI ⁵⁷.

Após 48 horas de incubação a 37°C em microaerofilia, o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) foi determinado para cada corpo-de-prova. As placas escolhidas para contagem foram aquelas que apresentaram entre 30 e 300 UFC de cada diluição ⁴¹.



FIGURA 5 – (A) Matriz de teflon bi-partida; (B) Espectrofotômetro; (C) Centrífuga refrigerada; (D) Homogeneizador ultra-sônico.

4.7 Análise estatística

Foram utilizados os *softwares* KyPlot versão 2.0 beta 15, Biostat versão 4.0 e Excel for Windows 2003. A análise estatística da variação na área de lesão formada e da composição química dos corpos-de-prova fornecida pela EDS foi realizada por meio dos testes *Kruskal-Wallis* e *Student-Newman-Keuls*, todos em nível de significância de 5%.

Para a correlação entre a área de lesão de cárie formada e a concentração de cálcio, utilizou-se a Correlação de *Spearman*, também em nível de significância de 5%.

Em relação à aderência, os resultados em UFC/mL foram transformados em logaritmo de base 10 (Log10) e analisados estatisticamente por meio do teste *Kruskal-Wallis*, seguido da Comparação de *Dunn*, também em nível de significância de 5%. A hipótese nula (H_0) utilizada na análise estatística foi que não haveria diferença entre os materiais restauradores em relação à área desmineralizada ou à concentração dos elementos químicos ou entre as metodologias de desafio cariogênico.

Fluxogramas da metodologia de desafios cariogênicos encontram-se descritos na Figura 6 e dos ensaios de aderência na Figura 7.

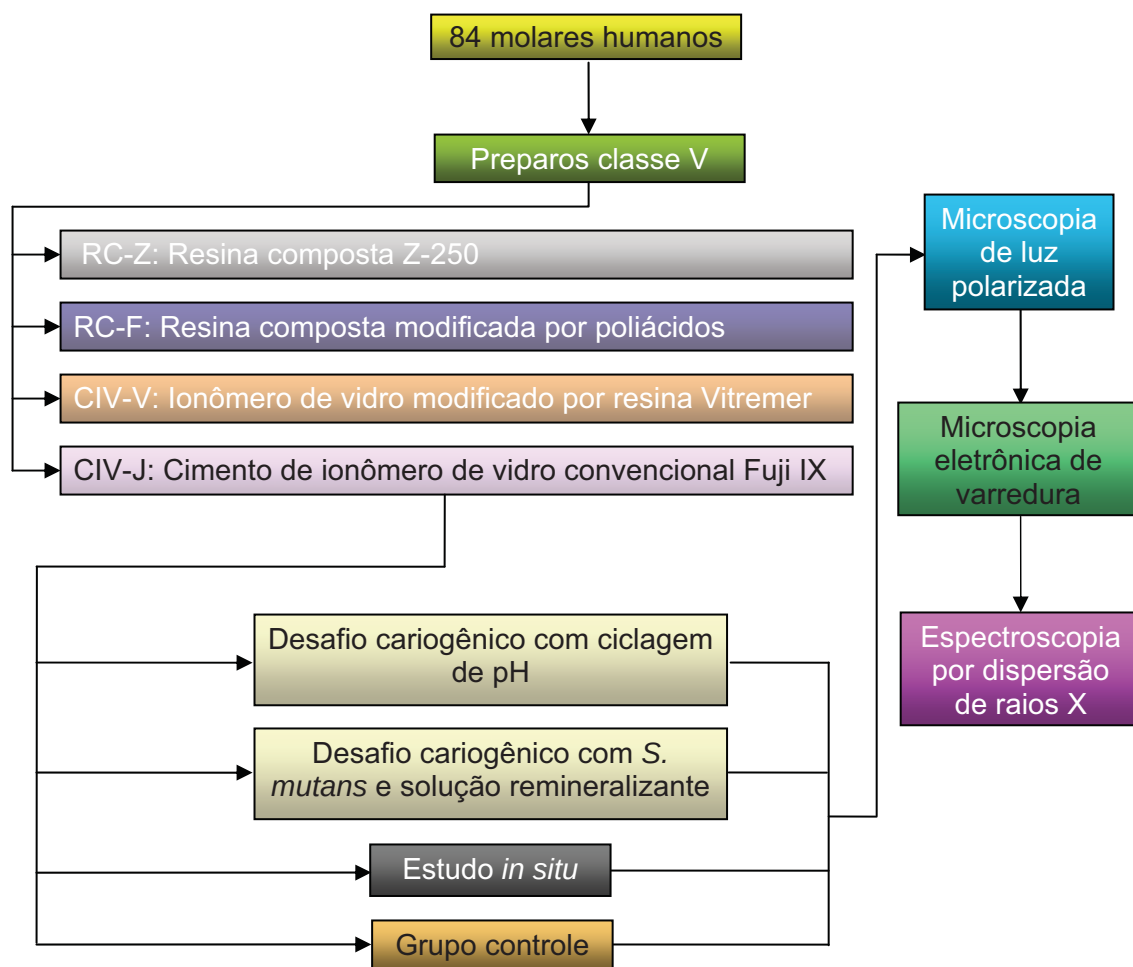


FIGURA 6 – Fluxograma da metodologia empregada nos desafios cariogênicos *in vitro* e *in situ*.

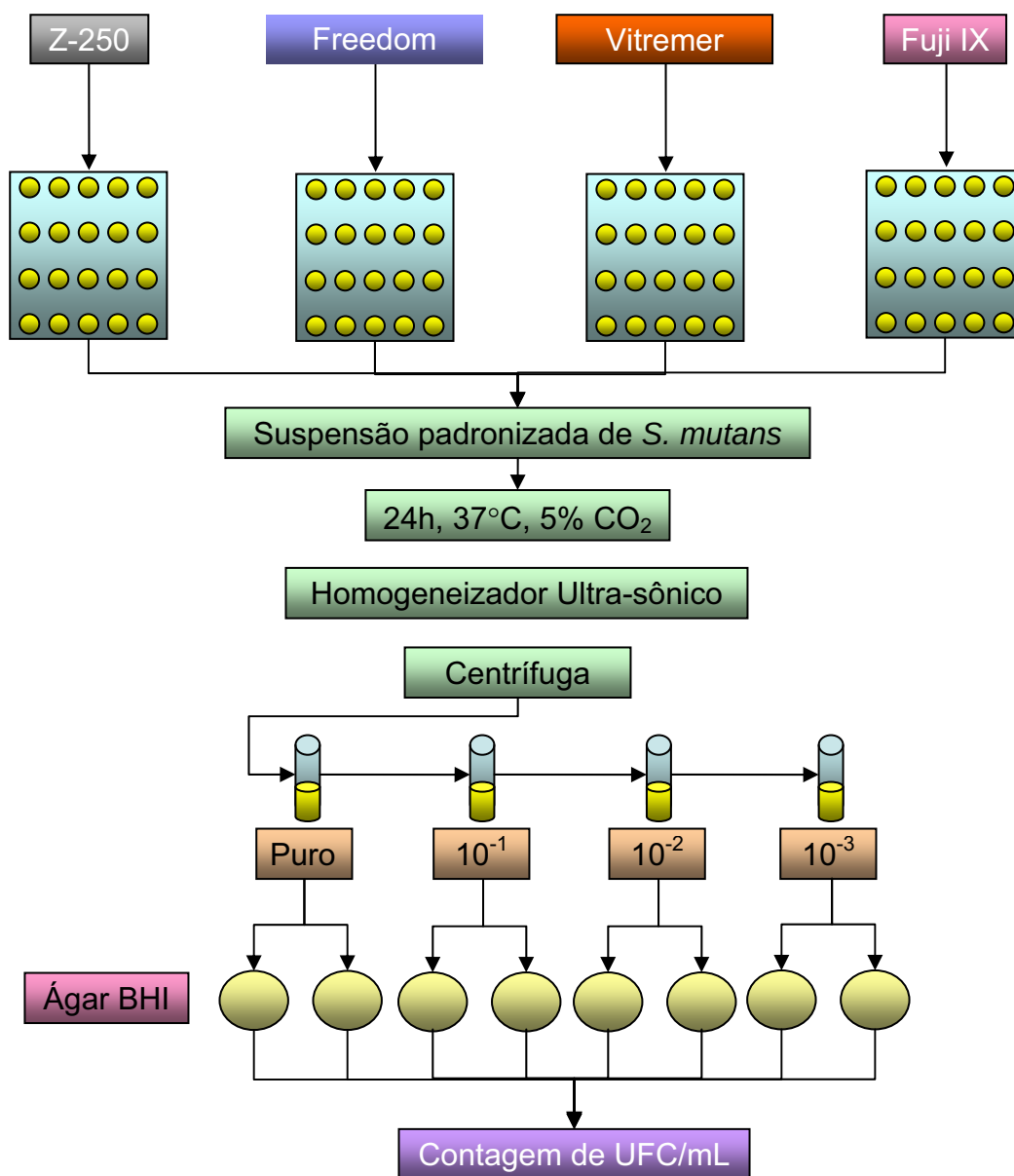


FIGURA 7 – Fluxograma dos ensaios de aderência

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos na parte experimental encontram-se divididos nos tópicos: microscopia de luz polarizada, espectroscopia de dispersão de raios-X (EDS) e aderência.

5.1 Microscopia de luz polarizada

Na análise macroscópica em lupa estereoscópica dos espécimes submetidos às metodologias de indução de cárie secundária, pode-se observar que os espécimes submetidos à ciclagem de pH apresentaram manchas brancas mais intensas do que os espécimes submetidos ao desafio cariogênico com *S. mutans*, como demonstrados na Figura 8.

Pode-se observar que em um mesmo grupo, os espécimes submetidos ao desafio cariogênico com *S. mutans*. apresentaram manchas brancas em esmalte mais brilhante, porém de extensão semelhante aos espécimes submetidos à ciclagem de pH.

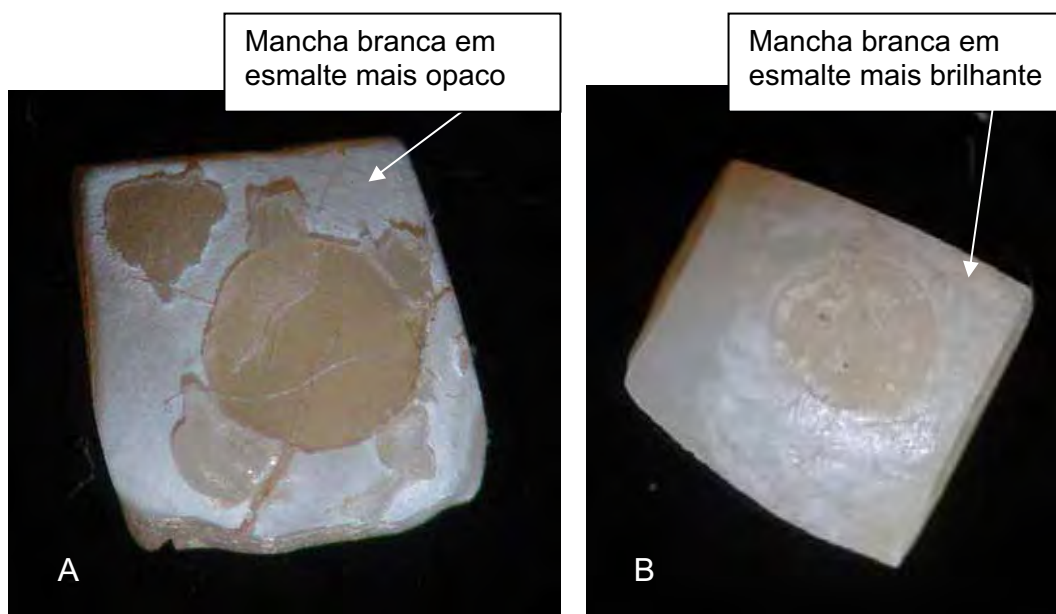


FIGURA 8 – Espécime do grupo RC-Z submetido à ciclagem de pH (A) e espécime do grupo RC-Z submetido ao desafio cariogênico com *S. mutans* (B) com aumento de 60 X.

Ao serem submetidos à microscopia de luz polarizada, os espécimes tiveram a área de lesão de cárie secundária medida após as fotografias utilizando-se vários filtros, arte negativa e diferentes desgastes. Com isso, foi possível observar a lesão de cárie secundária e áreas de birrefringência negativa (azul) e birrefringência positiva (vermelho), conforme demonstrado na Figura 9.

As áreas de lesão formadas nos espécimes conforme a metodologia de indução de cárie secundária estão apresentadas na Tabela 1 (desafio cariogênico por *S. mutans*).

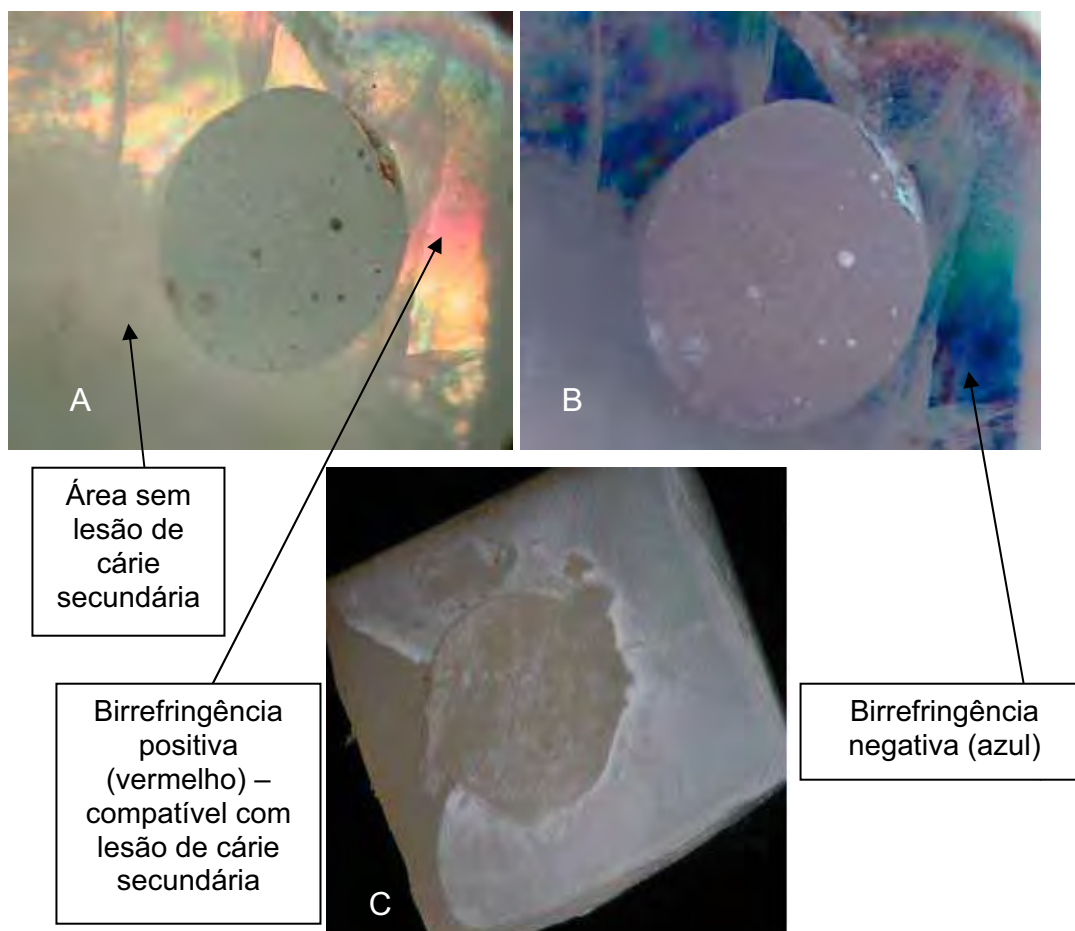


FIGURA 9 – (A) Microscopia de luz polarizada em espécime desgastado até 1000 μm mostrando lesão de cárie ao redor de restauração de resina composta modificada por poliácidos Freedom. Notar as áreas de birrefringência positiva (vermelho); (B) Microscopia de luz polarizada de espécime do mesmo grupo com efeito negativo, possibilitando observar a birrefringência negativa (azul); (C) Espécime observado na lupa estereoscópica, aumento de 60 X.

Com o aumento do desgaste dos espécimes (até 80 μm) foi possível observar os prismas de esmalte. O desgaste até 100 μm possibilitou a observação de área desmineralizada compatível com lesão de cárie, bem como área de esmalte hígido (coloração esverdeada), como demonstrado na Figura 10

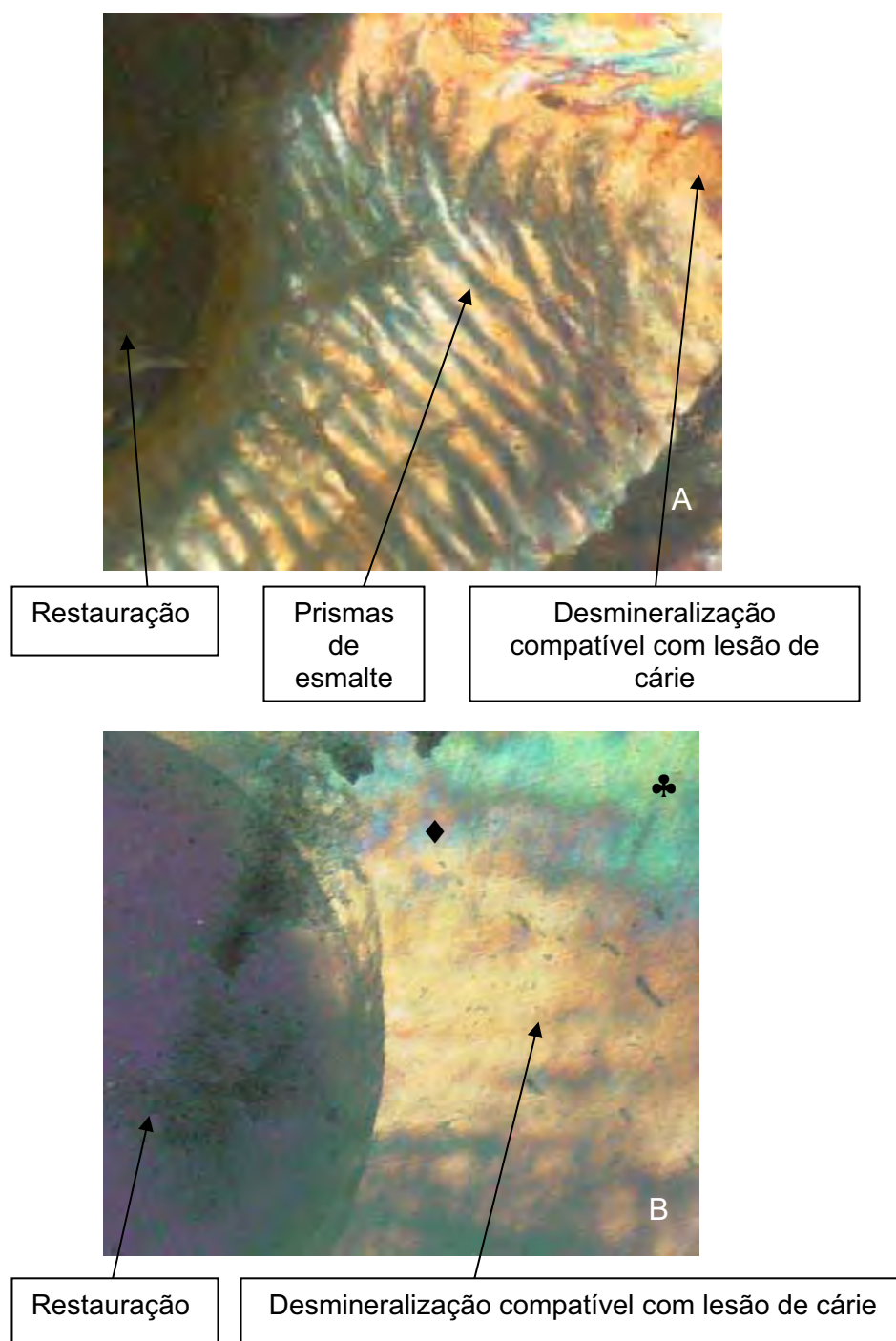


FIGURA 10 – (A): Microscopia de luz polarizada de espécime com 80 μm de espessura. Notar prismas de esmalte e área desmineralizada compatível com lesão de cárie; (B): Microscopia de luz polarizada de espécime com 100 μm de espessura. ♣ Esmalte hígido; ◆ Birrefringência negativa

Tabela 1 – Resultados médios e desvio padrão da área de lesão de cárie formada nos espécimes submetidos a desafio cariogênico por *S. mutans* conforme grupo

Grupo	Área média (mm ²)	Desvio padrão	Valor máximo	Valor mínimo
RC-Z	10,98	2,42	13,49	6,66
RC-F	9,86	1,70	12,80	7,40
CIV-V	7,31	1,49	9,27	4,26
CIV-J	3,62	1,10	4,79	2,05

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

Os resultados dos testes estatísticos *Kruskal-Wallis* e *Student-Newman-Keuls* estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados dos testes estatísticos na área de lesão formada no desafio cariogênico por *S. mutans*

Grupo	Combinação	p	Diferença estatística significante
RC-Z (1)	1 e 2	0,4932	não
RC-F (2)	1 e 3	0,0041	sim
CIV-V(3)	1 e 4	<0,0001	sim
CIV-J (4)	2 e 3	0,0287	sim
	2 e 4	<0,0001	sim
	3 e 4	0,0149	sim

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

Foi possível observar que somente os grupos RC-Z e RC-F não diferiram entre si. Todos os demais grupos apresentaram valores de área significativamente diferentes entre si, sendo o maior valor médio atribuído para o grupo RC-Z e o menor para o grupo CIV-J.

Os resultados médios dos espécimes submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados médios e desvio padrão da área de lesão de cárie formada nos espécimes submetidos a desafio cariogênico por ciclagem de pH conforme grupo

Grupo	Área média (mm ²)	Desvio padrão	Valor máximo	Valor mínimo
RC-Z	10,09	1,27	12,43	7,78
RC-F	9,60	1,18	11,40	7,74
CIV-V	7,05	2,18	11,05	3,34
CIV-J	3,37	2,71	11,03	0,90

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

Os resultados submetidos aos testes estatísticos *Kruskal-Wallis* e *Student-Newman-Keuls* estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos testes estatísticos na área de lesão formada no desafio cariogênico por ciclagem de pH

Grupo	Combinação	p	Diferença estatística significante
RC-Z (1)	1 e 2	0,5403	não
RC-F (2)	1 e 3	0,0070	sim
CIV-V(3)	1 e 4	<0,0001	sim
CIV-J (4)	2 e 3	0,0371	sim
	2 e 4	<0,0001	sim
	3 e 4	0,0543	não

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

A análise estatística demonstrou que não houve diferença entre os materiais resinosos (RC-Z e RC-F) e entre os materiais ionoméricos (CIV-F e CIV-J), porém as demais combinações de materiais apontaram diferenças estatísticas significantes.

Quando os métodos *in vitro* de desafio cariogênico foram comparados, não houve diferença estatística em nenhum grupo de material restaurador.

Os resultados médios da área de lesão de cárie secundária formada no desafio cariogênico *in situ* por material restaurador estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da área de lesão de cárie formada nos espécimes submetidos ao desafio cariogênico *in situ*

Grupo	Área média (mm ²)	Desvio padrão	Valor máximo	Valor mínimo
RC-Z	14,72	0,61	15,48	13,94
RC-F	14,05	1,12	15,52	12,27
CIV-V	13,10	1,04	14,80	11,41
CIV-J	12,99	1,70	15,15	9,77

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

Os dados foram submetidos aos testes estatísticos *Kruskal-Wallis* e *Student-Neuman-Keuls*, cujos resultados estão descritos na Tabela 6

Tabela 6 – Resultados dos testes estatísticos na área de lesão formada no desafio cariogênico *in situ*

Grupo	Combinação	p	Diferença estatística significante
RC-Z (1)	1 e 2	0,1934	não
RC-F (2)	1 e 3	0,0016	sim
CIV-V(3)	1 e 4	0,0039	sim
CIV-J (4)	2 e 3	0,0635	não
	2 e 4	0,1124	não
	3 e 4	0,7889	não

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

Em relação à área de lesão formada no desafio cariogênico *in situ*, foi possível observar diferença estatística significativa somente entre os grupos RC-Z e CIV-V e entre os grupos RC-Z e CIV-J.

Quando os métodos de indução de lesão de cárie secundária foram comparados, houve diferença estatística significativa em todos os grupos de materiais restauradores entre o desafio cariogênico *in situ* e desafio cariogênico por *S. mutans* e entre o desafio cariogênico *in situ* e desafio cariogênico por ciclagem de pH, porém não houve diferenças estatísticas significantes entre os dois desafios cariogênicos *in vitro*, conforme demonstrado na Figura 11.

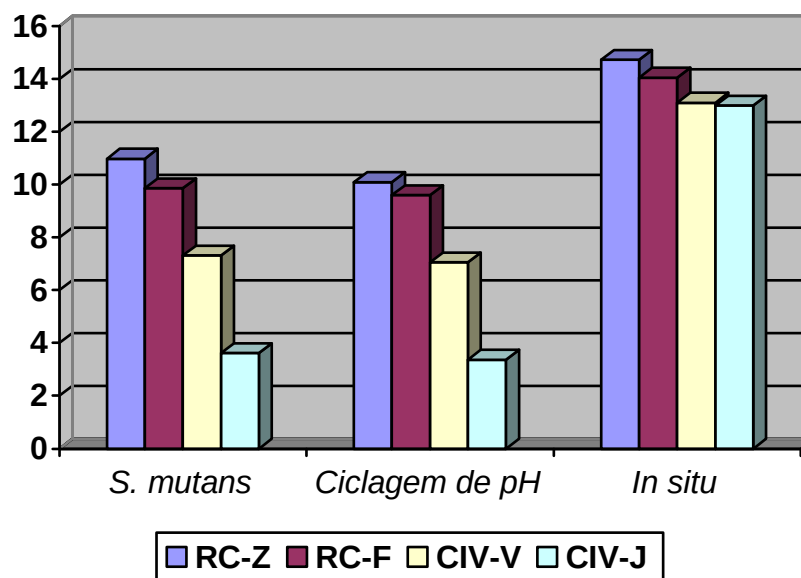


FIGURA 11 - Áreas médias de desmineralização de esmalte por grupo em cada metodologia de indução de lesão de cárie. Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

5.2 Espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS)

Para serem submetidos à EDS, os espécimes foram inicialmente submetidos a vácuo para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e depois novamente a vácuo para a EDS. Este duplo vácuo causou em alguns espécimes pequenas fraturas nas bordas dos espécimes, como demonstrado na Figura 12. No entanto, estas fraturas não comprometeram a análise por EDS, uma vez que as medidas foram realizadas na área de lesão de cárie longe das fraturas.

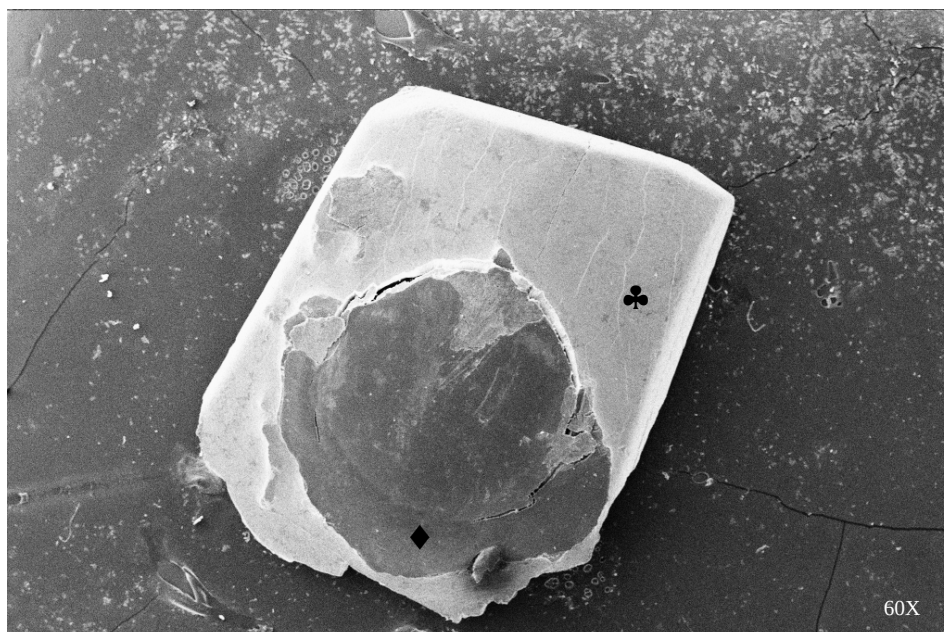


FIGURA 12 – Espécime do grupo resina composta Z250 (RC-Z) submetido à MEV. Notar áreas de fraturas na borda do espécime, resultantes provavelmente do duplo vácuo; ♣ Área com lesão de cárie secundária; ♦ Área sem lesão de cárie secundária.

Foi possível observar diferenças no padrão de desmineralização dos espécimes conforme a metodologia de desafio cariogênico empregada, conforme demonstrado na Figura 13 e 14.

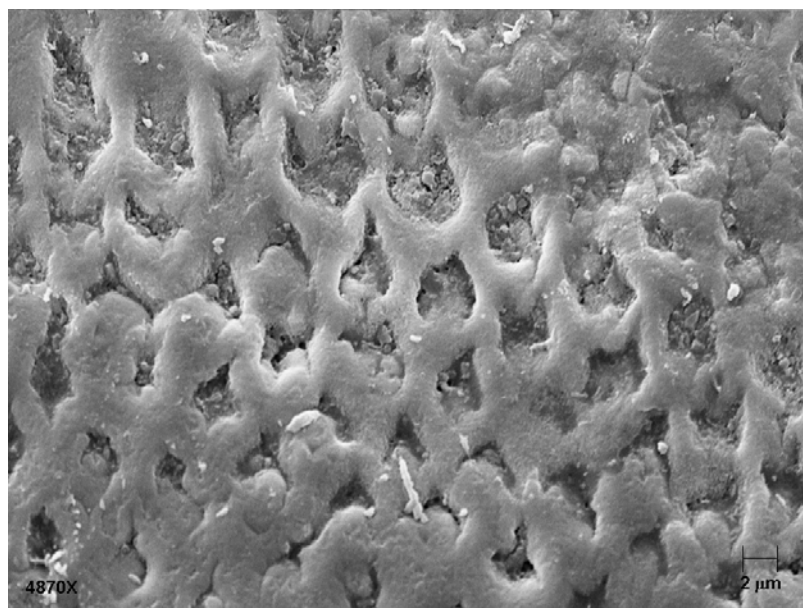


FIGURA 13 – MEV de um espécime do grupo RC-F submetido ao desafio cariogênico com *S. mutans* sob aumento de 4870X.

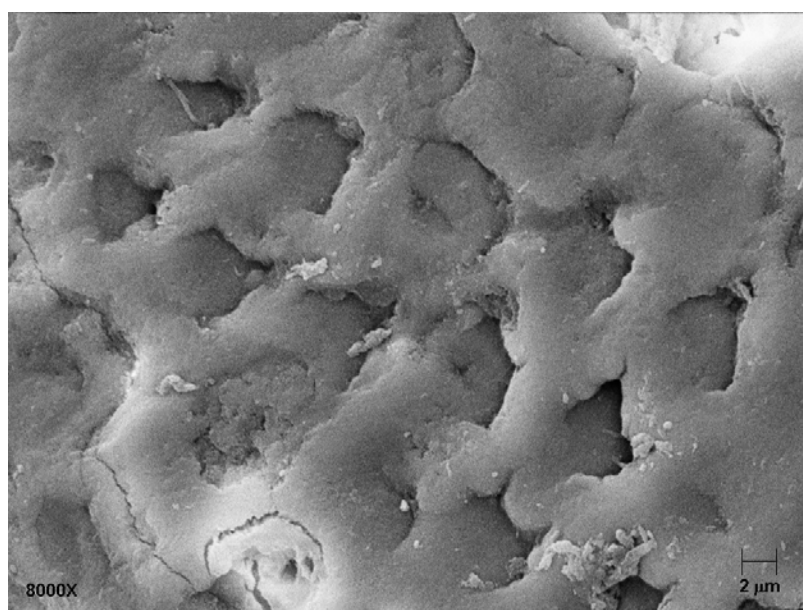


FIGURA 14 – MEV de um espécime do grupo CIV-V submetido ao desafio cariogênico com *S. mutans* sob aumento de 8000X.

Na Figura 13, quando a metodologia de desafio cariogênico com *S. mutans* foi aplicada nos espécimes do grupo RC-F,

observou-se um padrão de desmineralização de esmalte organizado, que se repetiu no grupo CIV-V, demonstrado na Figura 14.

Os espécimes do grupo CIV-J não apresentaram padrão de desmineralização de esmalte organizado, mas sim sinais de pouca desmineralização, junto com regiões de esmalte não-desmineralizado, conforme demonstrado na Figura 15.

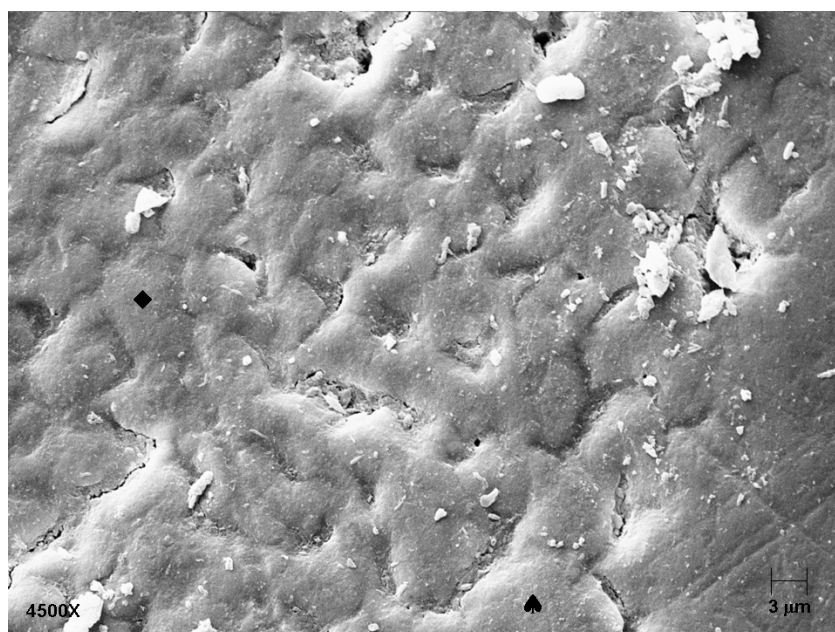


FIGURA 15 - MEV de um espécime do grupo CIV-J submetido ao desafio cariogênico com *S. mutans* sob aumento de 4500X. ♦ Região com esmalte desmineralizado; ▲ Região com esmalte não-desmineralizado.

Os espécimes do grupo RC-Z apresentaram regiões com profunda desmineralização misturadas às regiões com pouca ou nenhuma desmineralização conforme demonstrado na Figura 16. As regiões com profunda desmineralização só foram encontradas nos espécimes deste grupo.

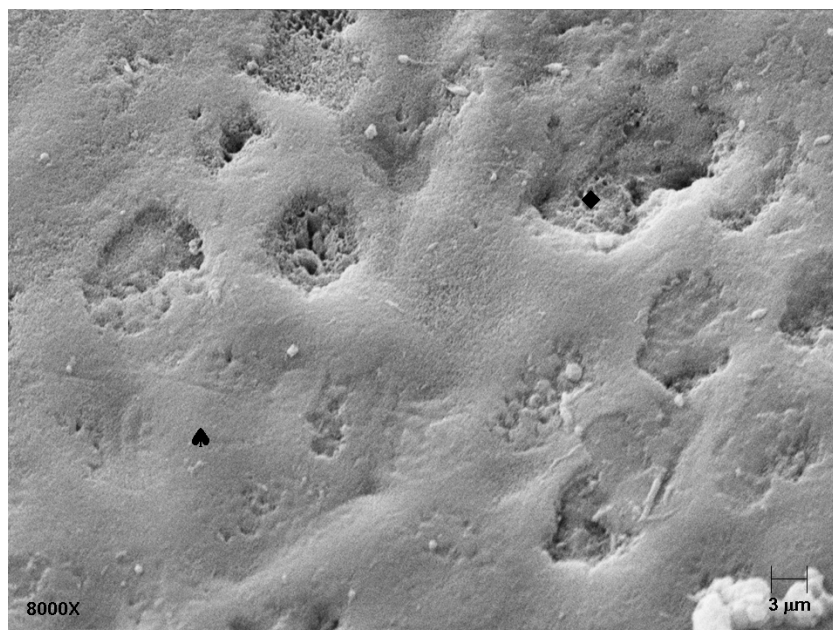


FIGURA 16 - MEV de um espécime do grupo RC-Z submetido ao desafio cariogênico com *S. mutans* sob aumento de 8000X. ◆ Região com esmalte desmineralizado; ▲ Região com esmalte não-desmineralizado.

Os espécimes submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH apresentaram sob MEV dois tipos de morfologia. Os grupos RC-Z e RC-F apresentaram grande desmineralização, porém sem padrão definido e com grandes áreas com depressões conforme demonstrado na Figura 17.

Já os espécimes dos grupos CIV-V e CIV-J submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH apresentaram leves sinais de desmineralização sob MEV e trincas na superfície do esmalte, conforme demonstrado na Figura 18.

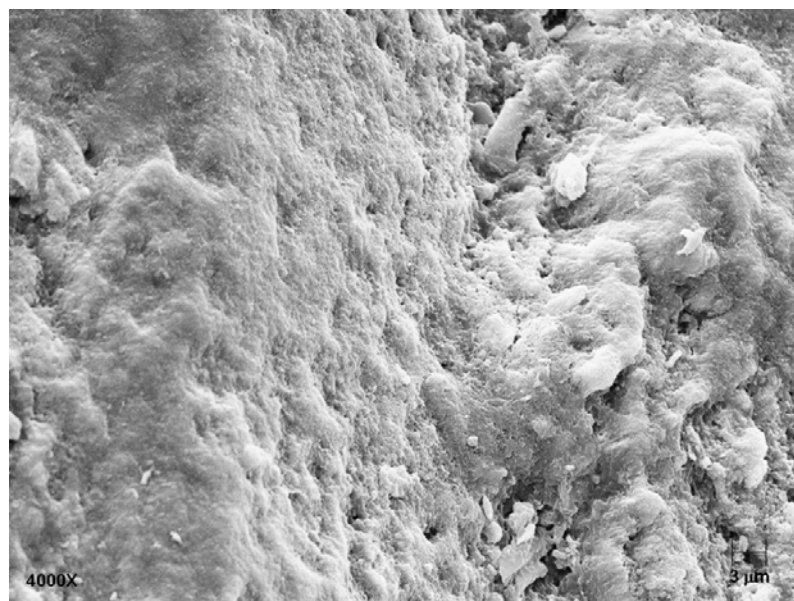


FIGURA 17 - MEV de um espécime do grupo RC-Z submetido ao desafio cariogênico com ciclagem de pH sob aumento de 4000X.

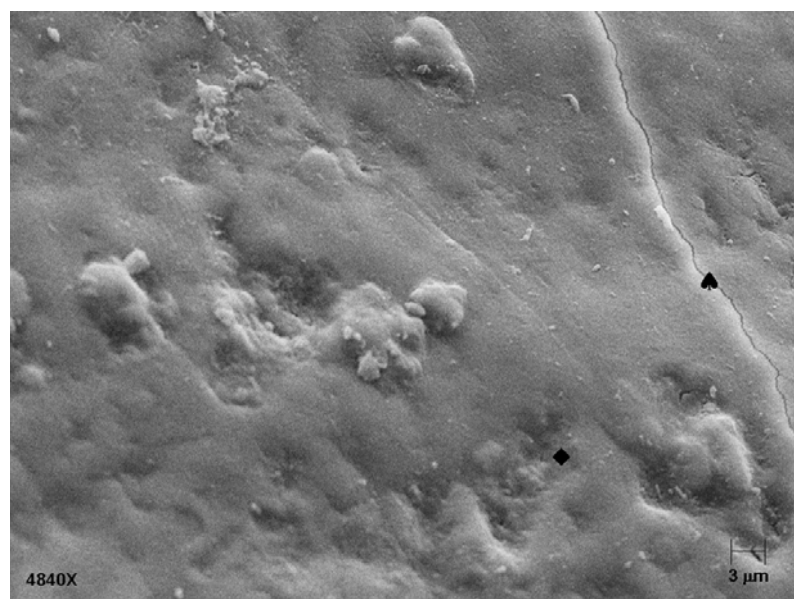


FIGURA 18 - MEV de um espécime do grupo CIV-J submetido ao desafio cariogênico com ciclagem de pH sob aumento de 4840X. ◆ Região com esmalte desmineralizado; ▲ Trinca na superfície do esmalte.

Em relação à morfologia sob MEV dos espécimes submetidos ao desafio cariogênico *in situ*, os grupos RC-Z, RC-F e CIV-V

demonstraram leve desmineralização na superfície do esmalte, conforme demonstrado na Figura 19 e 20.

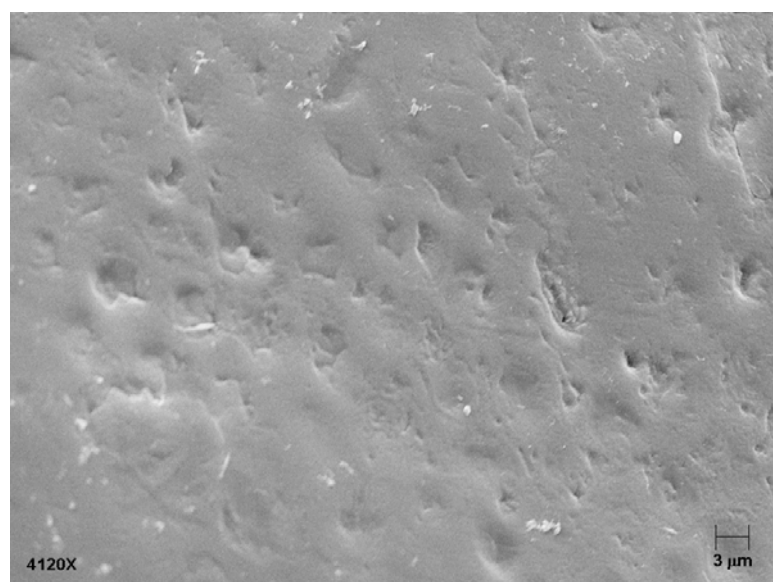


FIGURA 19 - MEV de um espécime do grupo RC-Z submetido ao desafio cariogênico *in situ* sob aumento de 4120X.

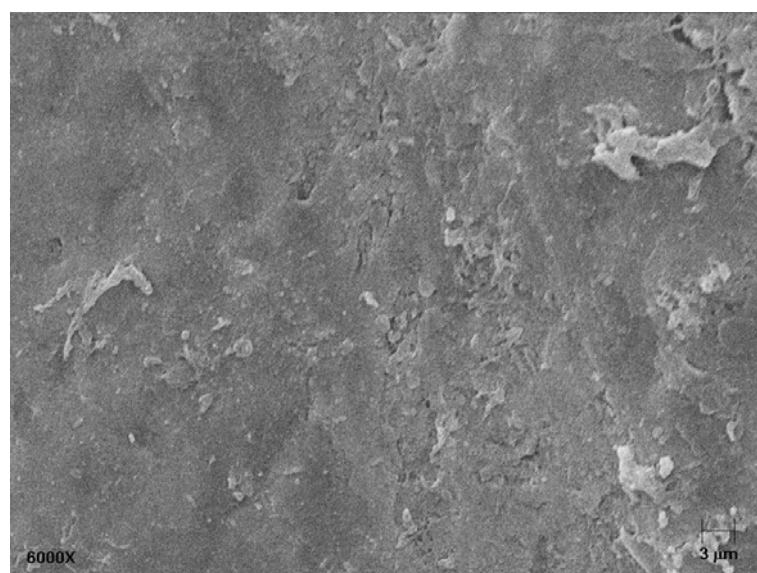


FIGURA 20 - MEV de um espécime do grupo CIV-J submetido ao desafio cariogênico *in situ* sob aumento de 6000X.

Em relação à EDS, os resultados médios por espécime (média aritmética das três medidas de EDS por espécime) são apresentados em porcentagem (%) dos elementos químicos cálcio (Ca), fósforo (P) e flúor (F). O grupo controle para o desafio cariogênico por *S. mutans* e desafio cariogênico por ciclagem de pH é o mesmo e os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Os resultados de EDS para desafio cariogênico com *S. mutans* estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 7 – Resultados médios (desvio padrão) da concentração de cálcio, fósforo e flúor no grupo controle

Grupo	% Ca	% P	% F	Razão Ca/P
RC-Z	37,31 ($\pm 2,11$)	23,66 ($\pm 4,12$)	0,26($\pm 0,3$)	1,57
RC-F	34,83 ($\pm 3,20$)	23,29 ($\pm 3,96$)	2,19 ($\pm 1,97$)	1,49
CIV-V	37,39 ($\pm 2,62$)	26,66 ($\pm 3,95$)	2,42 ($\pm 1,05$)	1,40
CIV-J	37,34 ($\pm 1,66$)	21,16 ($\pm 3,0$)	3,91 ($\pm 1,79$)	1,76

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Os materiais restauradores do grupo controle foram analisados estatisticamente entre si e os resultados demonstraram que os materiais não apresentaram diferença estatística significativa na concentração de cálcio e fósforo, porém houve diferença estatística significativa entre os grupos RC-Z e CIV-V ($p=0,0261$); RC-Z e CIV-J ($p=0,0008$) na concentração de flúor, com maior concentração de flúor no esmalte dos espécimes restaurados com os materiais ionoméricos.

Tabela 8 - Resultados médios (desvio padrão) da concentração de cálcio, fósforo e flúor nos grupos experimentais submetidos ao desafio cariogênico com *S. mutans*

Grupo	% Ca (desvio padrão)	% P (desvio padrão)	% F (desvio padrão)	Razão Ca/P
RC-Z	23,05 ($\pm 7,19$)	16,26 ($\pm 7,25$)	1,71($\pm 0,93$)	1,41
RC-F	28,73 ($\pm 5,41$)	18,06 ($\pm 5,70$)	3,26 ($\pm 2,39$)	1,59
CIV-V	29,69 ($\pm 3,65$)	19,71 ($\pm 4,10$)	3,77 ($\pm 2,32$)	1,50
CIV-J	33,09 ($\pm 5,17$)	21,89 ($\pm 5,33$)	5,18 ($\pm 2,65$)	1,51

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

A Figura 21 ilustra dos resultados da análise por EDS no grupo RC-Z (resina composta Z250), com os picos de cálcio, fósforo e flúor. Na Figura 22, ilustrativa dos resultados da análise por EDS no grupo RC-F, podemos observar um pico mais acentuado de cálcio, o que resultou uma concentração mais elevada de cálcio nos espécimes submetidos ao desafio cariogênico com *S. mutans*. A Figura 23 ilustra os resultados da análise por EDS no grupo CIV-V e a Figura 24 no grupo CIV-J. Ambos os grupos apresentaram picos acentuados de cálcio.

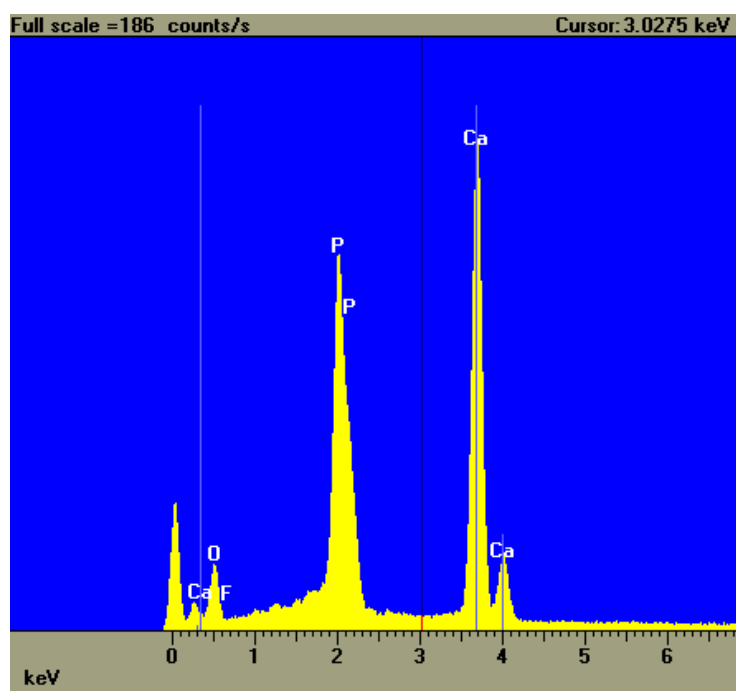


FIGURA 21 – Figura ilustrativa dos resultados da análise por EDS no Grupo RC-Z (resina composta Z250).

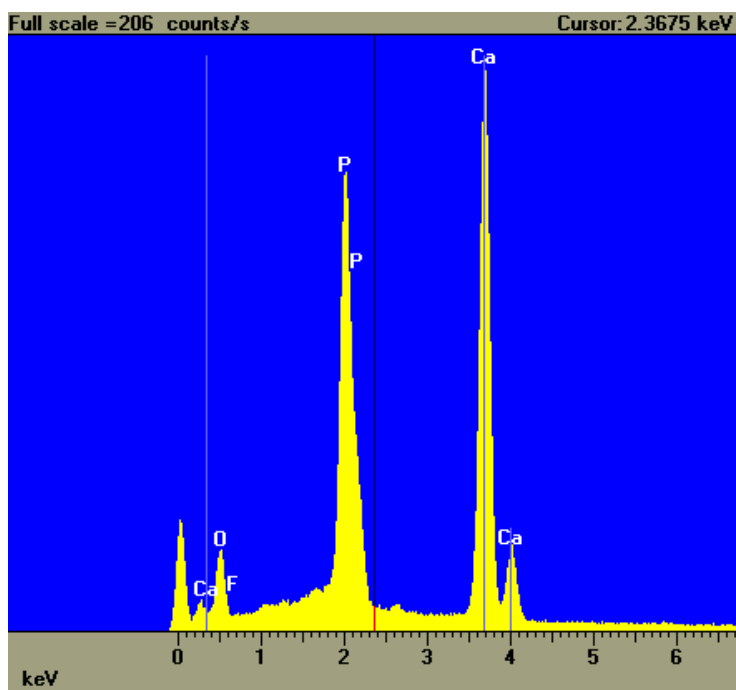


FIGURA 22 – Figura ilustrativa dos resultados da análise por EDS no Grupo RC-F (resina composta modificada por poliácidos Freedom).

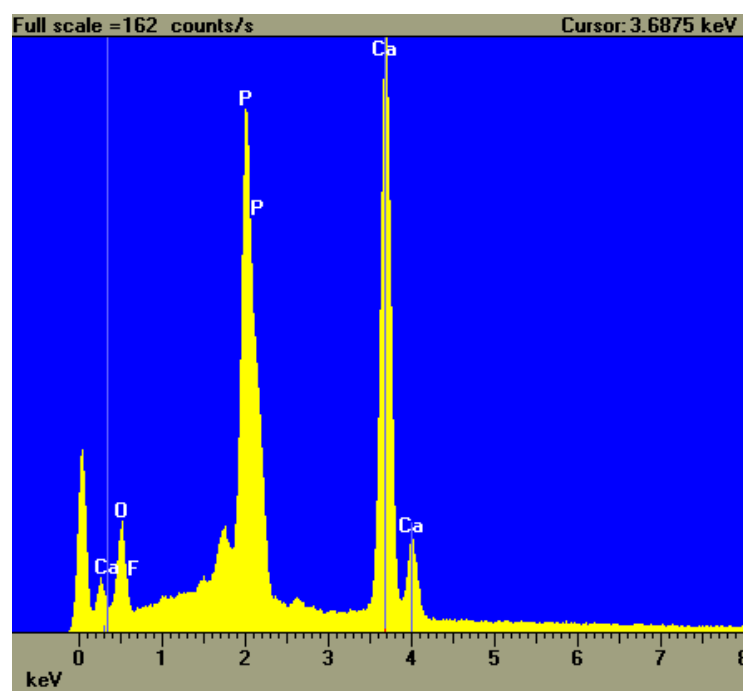


FIGURA 23 – Figura ilustrativa dos resultados da análise por EDS no Grupo CIV-V (ionômero de vidro modificado por resina Vitremer).

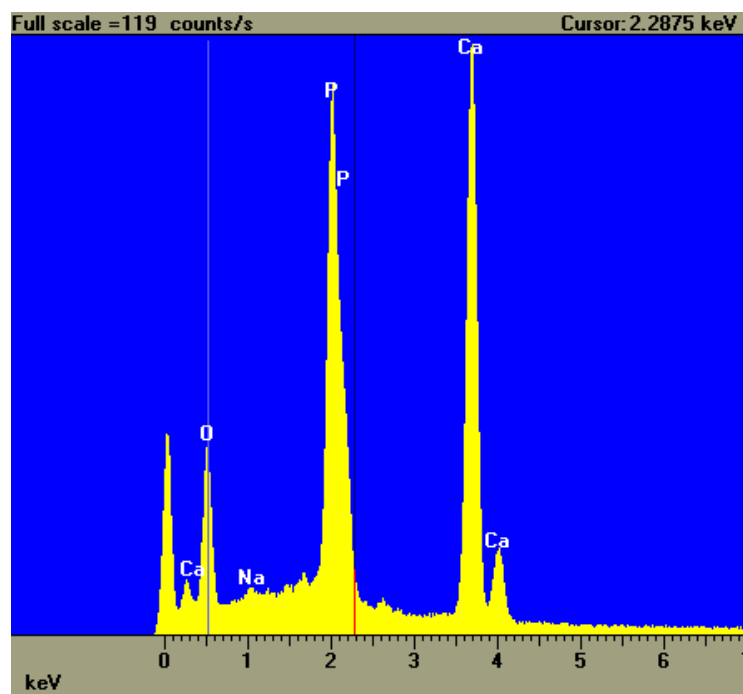


FIGURA 24 – Figura ilustrativa dos resultados da análise por EDS no Grupo CIV-J (cimento de ionômero de vidro Fuji IX).

Os materiais restauradores dos grupos experimentais foram submetidos à análise estatística, sendo comparados entre si e com o grupo controle. A análise com o grupo controle em relação à concentração de cálcio está ilustrada na Figura 25.

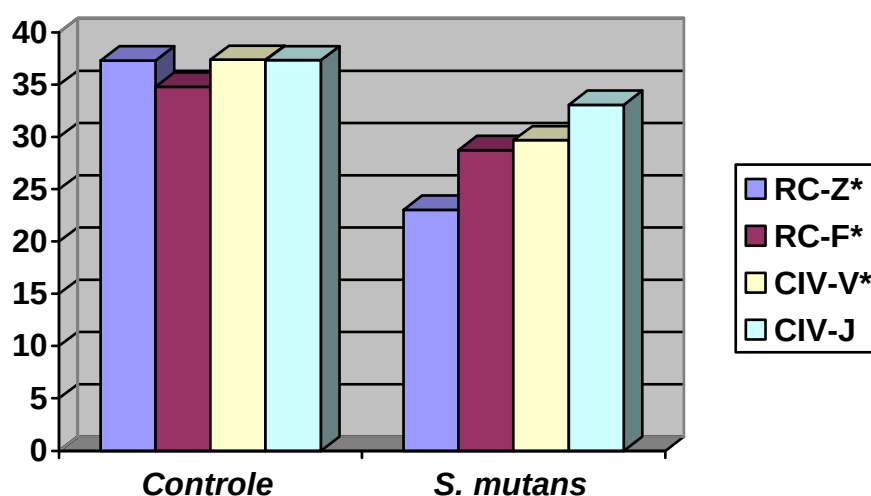


FIGURA 25 - Concentração média de cálcio nos diferentes grupos submetidos ao desafio cariogênico por *S. mutans* e no grupo controle. *Grupos com diferença estatística significativa. RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

A análise estatística demonstrou que houve diferença estatística significativa na concentração de cálcio em relação ao controle dos grupos experimentais RC-Z ($p=0,0015$), RC-F ($p=0,0277$), CIV-V ($p=0,0020$) quando submetidos ao desafio cariogênico com *S. mutans*. Estes resultados foram coerentes com a análise por MEV, na qual somente o grupo CIV-J não demonstrou sinais visíveis de desmineralização, o que foi confirmado pela análise por EDS.

As concentrações médias de fósforo nos grupos experimentais e no controle estão demonstradas na Figura 26.

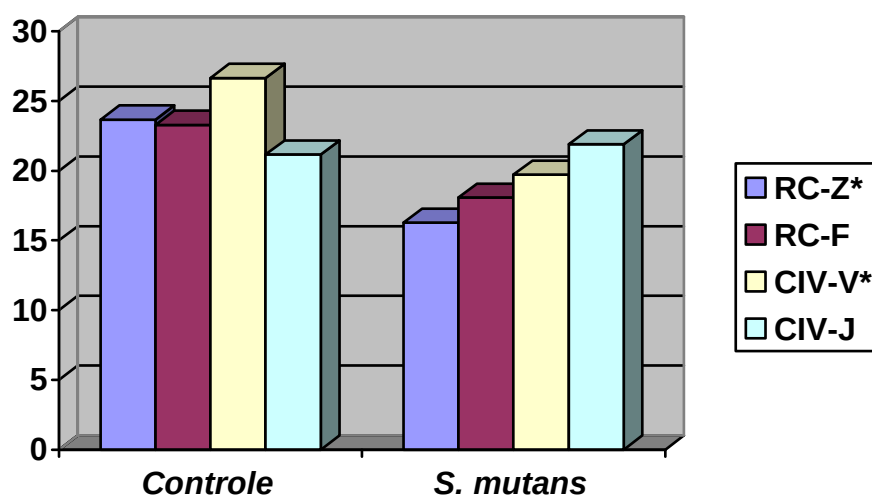


FIGURA 26 - Concentração média de fósforo nos diferentes grupos submetidos ao desafio cariogênico por *S. mutans* e no grupo controle. *Grupos com diferença estatística significativa. RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Após a análise estatística, foi possível observar diferença significativa na concentração de fósforo entre os grupos experimentais e controle no grupo RC-Z ($p=0,0394$) e no grupo CIV-V ($p=0,0066$).

Em relação à concentração de flúor, a Figura 27 ilustra a comparação dos resultados médios nos grupos experimentais e controle.

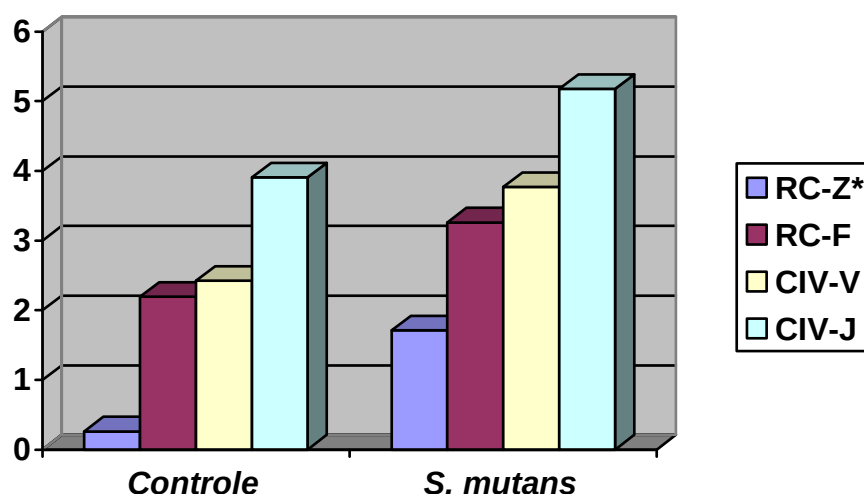


FIGURA 27 - Concentração média de flúor nos diferentes grupos submetidos ao desafio cariogênico por *S. mutans* e no grupo controle. *Grupo com diferença estatística significativa. RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Após a análise estatística foi possível observar diferença significativa entre os grupos experimentais e controle somente no grupo RC-Z ($p=0,0037$) em relação à concentração de flúor. Nos demais grupos, a variação na concentração de flúor na superfície do esmalte não foi estatisticamente significativa.

Quando os materiais restauradores foram analisados dentro do grupo experimental de indução de cárie por *S. mutans*, foi possível observar que houve diferença estatística significativa na concentração de cálcio entre os grupos RC-Z e CIV-V ($p=0,0377$); RC-Z e CIV-J ($p=0,0009$). Em relação à concentração de fósforo, não houve diferença estatística significativa entre os materiais, no entanto houve diferença estatística significativa em relação à concentração de flúor entre os materiais RC-Z e RC-F ($p=0,0450$); RC-Z e CIV-V ($p=0,0107$); RC-Z e CIV-J ($p<0,0001$).

Os resultados de EDS para desafio cariogênico com ciclagem de pH estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados médios (desvio padrão) da concentração de cálcio, fósforo e flúor nos grupos experimentais submetidos ao desafio cariogênico com ciclagem de pH

Grupo	% Ca (desvio padrão)	% P (desvio padrão)	% F (desvio padrão)	Razão Ca/P
RC-Z	24,32 ($\pm 6,09$)	19,02 ($\pm 6,07$)	1,67 ($\pm 0,65$)	1,27
RC-F	25,52 ($\pm 5,95$)	16,77 ($\pm 6,22$)	2,64 ($\pm 1,45$)	1,52
CIV-V	28,21 ($\pm 6,56$)	20,47 ($\pm 5,84$)	4,60 ($\pm 1,94$)	1,37
CIV-J	34,09 ($\pm 2,40$)	23,46 ($\pm 4,14$)	4,51 ($\pm 2,10$)	1,45

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Os grupos experimentais submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH foram analisados estatisticamente, sendo comparados entre si e com o grupo controle. Quando os materiais restauradores foram comparados entre si dentro do grupo experimental, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre os grupos RC-Z e CIV-J ($p < 0,0001$); RC-F e CIV-J ($p = 0,0004$); CIV-V e CIV-J ($p = 0,0070$) em relação à concentração de cálcio. No que se refere à concentração de fósforo, houve diferença estatística significativa entre os grupos RC-F e CIV-J ($p = 0,0038$), bem como entre CIV-V e CIV-J ($0,0038$). Em relação à concentração de flúor, houve diferença entre RC-Z e CIV-V ($p < 0,0001$), RC-Z e CIV-J ($p < 0,0001$); RC-F e CIV-V ($0,0182$); RC-F e CIV-J ($p = 0,0298$).

A análise com o grupo controle em relação à concentração de cálcio está ilustrada na Figura 28. A análise estatística

demonstrou que houve diferença estatística significativa na concentração de cálcio em relação ao controle de todos os grupos experimentais: RC-Z ($p=0,0027$), RC-F ($p=0,0037$), CIV-V ($p=0,0050$) e CIV-J ($p=0,0087$). Estes resultados confirmaram a análise por MEV, na qual todos os grupos apresentaram sinais de desmineralização na superfície.

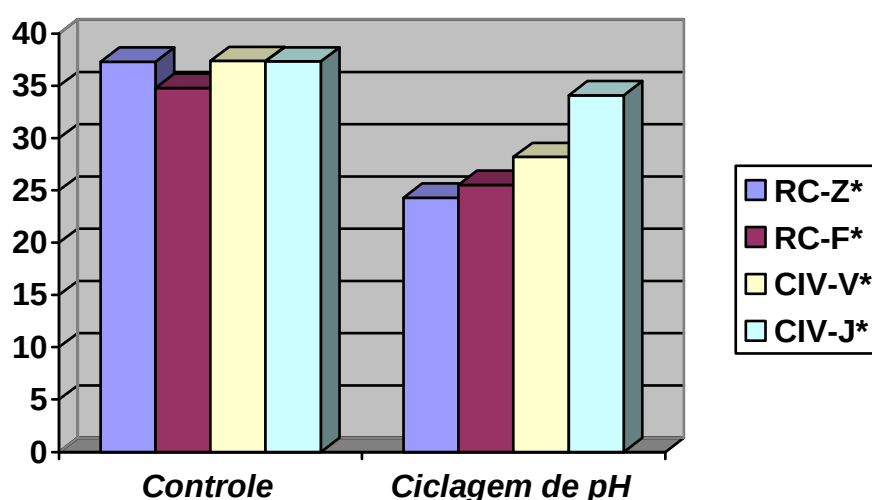


FIGURA 28 - Concentração média de cálcio nos diferentes grupos submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH e no grupo controle. *Grupos com diferença estatística significativa. RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX

Em relação à concentração de fósforo, os resultados médios dos grupos experimentais e controle estão demonstrados na Figura 29.

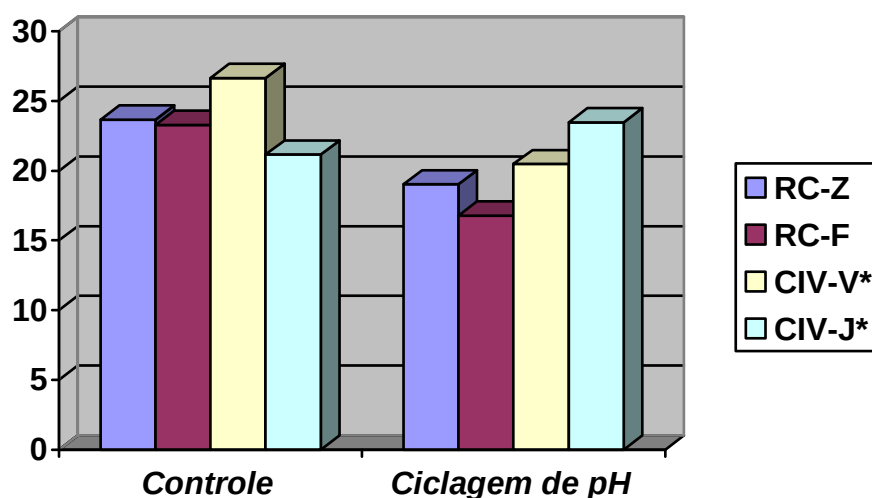


FIGURA 29 - Concentração média de fósforo nos diferentes grupos submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH e no grupo controle. *Grupos com diferença estatística significativa. RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Após a análise estatística, foi possível observar diferença significativa na concentração de fósforo entre os grupos experimentais e controle no grupo no grupo CIV-V ($p=0,0050$) e no grupo CIV-J ($p=0,0007$).

Em relação à concentração de flúor, a Figura 30 ilustra a comparação dos resultados médios nos grupos experimentais e controle.

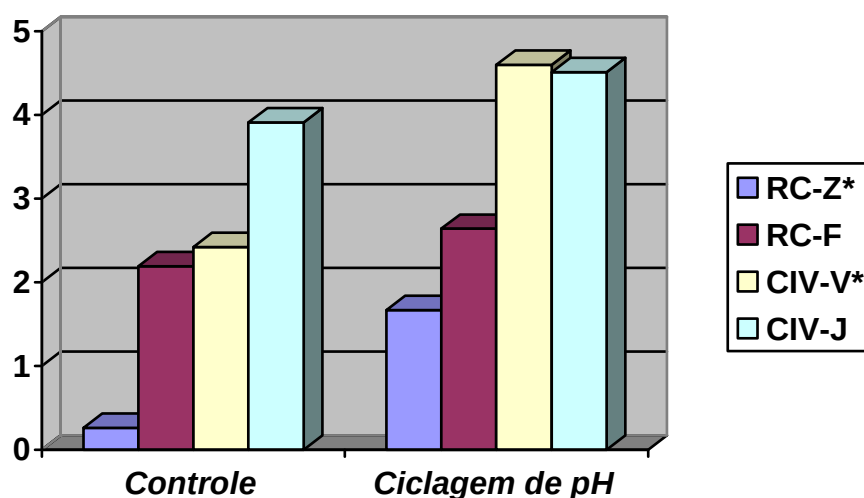


FIGURA 30 - Concentração média de flúor nos diferentes grupos submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH e no grupo controle. *Grupos com diferença estatística significativa. RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Após a análise estatística foi possível observar diferença significativa entre os grupos experimentais e controle nos grupos RC-Z ($p=0,0010$) e CIV-V ($p=0,0246$).

A Figura 31 ilustra a comparação entre as metodologias de indução de cárie em relação às concentrações de cálcio, fósforo e flúor.

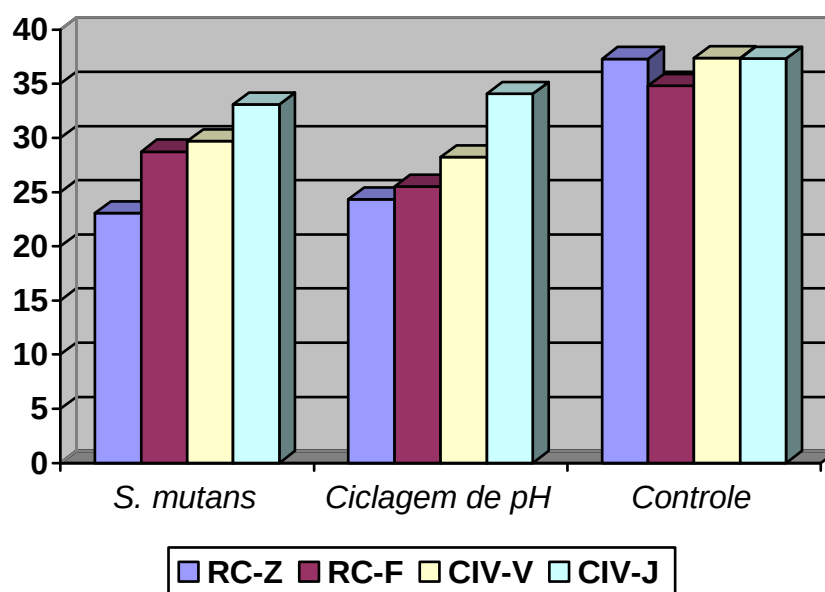


FIGURA 31 - Concentração média de cálcio nos diferentes grupos por metodologia de indução de cárie e no grupo controle. Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Comparando-se as metodologias *in vitro* de indução de cárie (*S. mutans* x ciclagem de pH), em relação à concentração de cálcio, fósforo e flúor, observou-se que não houve diferença estatística em nenhum dos grupos de materiais restauradores.

Os resultados dos grupos controle e experimental do desafio cariogênico *in situ*, juntamente com a análise estatística de comparação (controle x experimental) estão demonstrados na Tabela 10 para o cálcio, na Tabela 11 para o fósforo e na Tabela 12 para o flúor.

Tabela 10 – Valores médios da concentração de cálcio dos grupos controle e experimental submetidos ao desafio cariogênico *in situ*

Grupo	% Ca grupo controle (desvio padrão)	% Ca grupo experimental (desvio padrão)	Diferença estatística
RC-Z	30,86 ($\pm 1,53$)	25,23 ($\pm 3,56$)	p=0,0141
RC-F	33,85 ($\pm 1,08$)	26,46 ($\pm 2,58$)	p= 0,0112
CIV-V	36,36 ($\pm 0,62$)	31,08 ($\pm 1,79$)	p= 0,0112
CIV-J	36,43 ($\pm 0,69$)	32,62 ($\pm 1,64$)	p = 0,0112

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Tabela 11 – Valores médios da concentração de fósforo dos grupos controle e experimental submetidos ao desafio cariogênico *in situ*

Grupo	% P grupo controle (desvio padrão)	% P grupo experimental (desvio padrão)	Diferença estatística
RC-Z	19,78 ($\pm 5,44$)	15,60 ($\pm 2,31$)	não
RC-F	21,10 ($\pm 3,98$)	17,46 ($\pm 2,17$)	p = 0,0425
CIV-V	25,01 ($\pm 0,45$)	19,40 ($\pm 3,10$)	p = 0,0425
CIV-J	22,94 ($\pm 2,64$)	20,67 ($\pm 3,90$)	não

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Tabela 12 – Valores médios da concentração de flúor dos grupos controle e experimental submetidos ao desafio cariogênico *in situ*

Grupo	% F grupo controle (desvio padrão)	% F grupo experimental (desvio padrão)	Diferença estatística
RC-Z	0,62 ($\pm 0,27$)	1,57 ($\pm 0,73$)	não
RC-F	3,26 ($\pm 0,35$)	2,38 ($\pm 0,57$)	p = 0,0425
CIV-V	10,75 ($\pm 2,21$)	7,44 ($\pm 4,67$)	não
CIV-J	15,95 ($\pm 1,61$)	12,01 ($\pm 2,86$)	não

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX.

Quando os materiais restauradores foram comparados entre si dentro do grupo controle, pode-se observar que em relação ao cálcio, os grupos RC-Z e CIV-V ($p=0,0174$); RC-Z e CIV-J ($p=0,0066$) diferiram entre si. Em relação ao fósforo, foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos RC-Z e CIV-V ($p=0,0495$), RC-F e CIV-V ($p=0,0495$). Em relação ao flúor, foram encontradas diferenças entre todos os grupos estudados ($p=0,0495$).

Quando os materiais restauradores foram comparados entre si dentro do grupo experimental, observou-se diferença estatística significativa na concentração de cálcio entre os grupos RC-Z e CIV-V ($p=0,0010$); RC-Z e CIV-J ($p<0,0001$); RC-F e CIV-V ($p<0,0044$); RC-F e CIV-J ($p<0,0001$). Em relação à concentração de fósforo, foram encontradas diferenças significantes somente entre os grupos RC-Z e CIV-V ($p=0,0055$); RC-Z e CIV-J ($p=0,0010$). A análise estatística também demonstrou diferenças estatísticas significantes na concentração de flúor nos grupos experimentais entre RC-Z e CIV-V ($p=0,0002$); RC-Z e CIV-J ($p<0,0001$); RC-F e CIV-V ($p=0,0151$); RC-F e CIV-J ($p=0,0003$), demonstrando maior liberação de flúor pelos materiais ionoméricos

(grupos CIV-V e CIV-J) quando comparados aos materiais resinosos (grupos RC-Z e RC-F).

Embora com diferentes grupos controle, quando as três metodologias de indução de cárie (*S. mutans*, ciclagem de pH e *in situ*) foram comparadas entre si em relação à concentração de cálcio, pode-se observar que não houve diferença estatística significativa nos grupos RC-Z, RC-F e CIV-J, porém houve diferença no grupo CIV-V, com menor perda de cálcio no desafio cariogênico *in situ*, quando comparado ao desafio cariogênico por ciclagem de pH com *in situ* ($p=0,037$).

Em relação à concentração de fósforo, quando comparadas as três metodologias de indução de cárie, não houve diferença estatística significativa em nenhum dos grupos de materiais restauradores.

Quando a concentração de flúor foi analisada estatisticamente, comparando-se os três métodos de indução de cárie, não houve diferença nos grupos RC-Z, RC-F, porém houve diferença no grupo CIV-V, quando comparadas as metodologias de indução de cárie por *S. mutans* e *in situ* ($p=0,0348$), com maior liberação de flúor no desafio cariogênico *in situ* e no grupo CIV-J, quando comparadas as metodologias de indução de cárie por *S. mutans* x *in situ* ($p=0,0006$) e ciclagem de pH x *in situ* ($p=0,0002$), sendo a liberação de flúor maior no desafio cariogênico *in situ*.

Quando os resultados da área de lesão de cárie formada nos três desafios cariogênicos foram correlacionados por meio da Correlação de *Spearman* em nível de 5% com a concentração de cálcio em cada um dos materiais, não houve correlação em nenhum dos grupos.

5.3 Aderência de *S. mutans* a materiais restauradores

Os resultados da aderência de *S. mutans* nos diferentes grupos experimentais estão apresentados na Tabela 13. Os resultados individuais estão apresentados no APÊNDICE 4. A Figura 32 representa uma placa com colônias características de *S. mutans* em ágar BHI após ensaios de aderência.

Tabela 13 - Valores médios dos ensaios de aderência (log10 UFC/mL)

Grupo	Log10 médio*	Desvio padrão
RC-Z	6,41	0,15
RC-F	4,90	0,95
CIV-V	5,13	0,27
CIV-J	4,89	0,62

Legenda: RC-Z: resina composta Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-J: cimento de ionômero de vidro Fuji IX; *média aritmética de todos os valores no grupo.

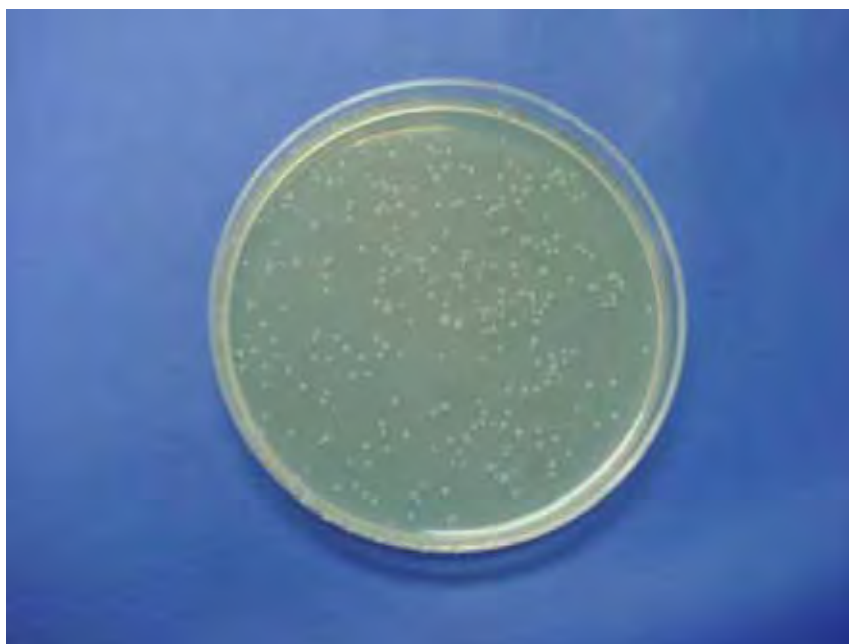


FIGURA 32 - Colônias características de *S.mutans* em ágar BHI após os ensaios de aderência

Em relação ao teste *Kruskal-Wallis*, seguido da Comparação de *Dunn*, em nível de significância de 5%, houve diferença entre os grupos RC-Z e RC-F ($p<0,05$), bem como entre os grupos RC-Z e CIV-V ($p<0,05$) e RC-Z e CIV-J ($p<0,05$). Pode-se concluir que estatisticamente, o grupo RC-Z apresentou-se diferente dos demais grupos, porém não houve diferença estatística entre os grupos RC-F, CIV-V e CIV-J, sendo estes estatisticamente iguais.

6 DISCUSSÃO

A respeito da metodologia empregada neste estudo, podem ser ressaltados alguns fatos. Os presentes materiais foram utilizados no estudo uma vez que cada um representa um grupo de materiais restauradores: a resina Z250 representa um material restaurador estético convencional que não libera flúor. A resina composta modificada por poliácidos Freedom foi incluída uma vez que esta categoria de materiais foi desenvolvida na tentativa de combinar as propriedades mecânicas superiores dos compósitos com a capacidade de liberar flúor dos cimentos de ionômero de vidro ^{44, 59, 63, 85}. Em adição a isso, estudos *in situ* com esta categoria de materiais ainda não são freqüentes na literatura, sobretudo os relacionados à remineralização dos espécimes na cavidade bucal ⁴⁴. O ionômero de vidro modificado por resina Vitremer apresenta bons resultados em estudos *in vitro* ^{17, 36, 42} assim como o cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX ⁴ material indicado para o Tratamento Restaurador Atraumático (ART) ⁷⁴. No entanto, ainda há dúvida sobre o real potencial anticariogênico de materiais liberadores de flúor quando comparados a materiais não-liberadores de flúor em estudos *in situ* e *in vivo* ⁴⁴.

A esterilização dos espécimes foi realizada por meio de radiação gamma, ao invés da esterilização por autoclave, pois a esterilização por autoclave poderia danificar os materiais restauradores. A radiação gamma foi utilizada para esterilização dos espécimes, uma vez que este tipo de esterilização nesta dose não altera a microdureza nem a resistência à desmineralização do esmalte ^{44, 67}.

O exame radiográfico inicial dos espécimes foi adicionado apenas como certificação de ausência de alterações iniciais do esmalte. Uma vez que para a EDS, há necessidade de metalização dos espécimes, não foi possível realizar uma análise inicial e final dos mesmos espécimes, havendo a necessidade de um grupo controle em separado. Desta forma, a radiografia digital foi incluída para confirmação de ausência de perda mineral nos espécimes de esmalte antes de serem submetidos aos desafios cariogênicos.

Em relação às metodologias de análise dos espécimes submetidos aos desafios cariogênicos (microscopia de luz polarizada, MEV e EDS), de acordo com Kühnisch et al.⁴³, a MEV pode ser considerada como padrão-ouro na análise de uma superfície cariada, uma vez que um simples exame visual não pode ser considerado apropriado para detectar mínimas alterações de superfície, inclusive em condições laboratoriais. A MEV é provavelmente um método mais sensível de análise da superfície para verificar pequenas alterações de esmalte em relação à microscopia de luz e microrradiografia⁴³. No entanto, a microscopia de luz polarizada permite a visualização de áreas com diferentes porosidades. Birrifringência positiva e negativa permitem a visualização de áreas nas quais houve liberação de flúor ou desmineralização com deposição de novos cristais⁸⁴.

Para o entendimento dos resultados obtidos em microscopia de luz polarizada, algumas definições são importantes. Birrifringência é a propriedade que alguns materiais têm de possuírem dois índices de refração, o que resulta em dois raios emergentes a partir de um único raio incidente¹⁴. A birrifringência pode ser positiva ou negativa. Em termos físicos, birrifringência positiva ocorre quando o índice de refração extraordinário (o qual é dependente da velocidade de propagação do campo paralelo ao eixo óptico) é maior do que o índice de refração ordinário (o qual é dependente da velocidade de propagação do campo perpendicular ao eixo óptico). Birrifringência negativa ocorre

quando o índice de refração extraordinário é menor do que o índice de refração ordinário. Quando se analisa uma lâmina em microscopia de luz polarizada, as áreas de birrefringência positiva apresentam-se avermelhadas. Estas áreas são compatíveis, conforme Valença et al.⁸⁴ com áreas na qual houve liberação de flúor pelos materiais restauradores. Já áreas de birrefringência negativa apresentam-se azuladas correspondem a áreas em que houve desmineralização e deposição de novos cristais, com redução da porosidade, porém não por flúor.

De acordo com Sá et al.⁶⁸, a análise da área da lesão de cárie secundária formada é mais representativa do que a análise da lesão inteira, uma vez que a profundidade da lesão nem sempre é uniforme e pode apresentar variabilidade significativa em diferentes pontos.

A análise dos espécimes por espectroscopia por EDS possibilitou avaliar a perda mineral, devido à concentração de cálcio e fósforo. No entanto, deve-se ter cuidado na análise dos resultados da concentração de flúor por EDS, uma vez o flúor é um elemento químico que pode ter sua concentração mais corretamente medida por meio de espectrometria por dispersão de ondas (*wavelength dispersive spectrometry* – WDS), uma vez que se trata de um elemento químico leve. Elementos químicos leves como flúor, bório, carbono, nitrogênio e oxigênio são mais corretamente detectados e medidos com técnicas que utilizam microsonda, como a WDS¹³. Alguns autores como Francci et al.³⁰ afirmaram que flúor, em altas concentrações, podem diretamente afetar bactérias cariogênicas por inibir enzimas metabólicas-chave, reduzindo a habilidade de bactérias produzirem ácido, embora algumas resinas modificadas por poliácidos apresentarem pequenas quantidades de flúor, que agem somente como catalisadores e desta forma, não inibem a produção de ácido por *S. mutans*.

Pereira et al.⁶³ concluíram em seu estudo que na cavidade bucal, em adição ao pH, proteínas salivares e sistemas-tampão podem afetar a liberação de flúor e a dissolução da superfície dentária,

assim como a erosão de componentes não-solúveis dos cimentos de ionômero de vidro e que portanto, fatores como composição do material e liberação de outros elementos pelos cimentos de ionômero de vidro podem ser mais significativos e apresentarem maior influência na formação da zona de inibição do que somente a liberação de flúor. A zona de inibição foi observada no presente estudo em espécimes restaurados, sobretudo com CIV-V e CIV-J, como demonstrado sob MEV na Figura 12.

Morfohistologicamente, sob microscopia de luz polarizada, áreas nas quais houve liberação de flúor (birrifringência positiva) foram comuns nos grupos RC-F, CIV-V e CIV-J e áreas de birrifringência negativa foram comuns no grupo RC-Z. Este resultado era esperado, uma vez que os grupos RC-F, CIV-V e CIV-J são compostos por materiais liberadores de flúor e o grupo RC-Z não.

Observando-se os resultados obtidos na análise por microscopia de luz polarizada nos três desafios cariogênicos em todos os grupos de materiais restauradores, pode-se notar que o desafio cariogênico *in situ* apresentou valores maiores de área de lesão de cárie secundária do que os desafios cariogênicos por *S. mutans* e ciclagem de pH, não havendo diferença entre os desafios cariogênicos *in vitro*. Isto demonstra que a metodologia *in situ* proporcionou maior desmineralização dos espécimes do que as metodologias *in vitro*, do ponto de vista de microscopia de luz polarizada. Porém, quando as metodologias foram comparadas do ponto de vista da EDS, houve diferença somente em relação ao material CIV-V, o qual apresentou maior perda de cálcio quando a metodologia *in situ* foi utilizada em relação às metodologias *in vitro*. Desta forma, pode-se observar que os resultados apresentados pelos materiais restauradores submetidos a desafio cariogênicos dependem da forma de análise da lesão cariosa.

Quando os materiais restauradores foram analisados após o desafio cariogênico por *S. mutans* e ciclagem de pH, observou-se menor área de lesão de cárie no grupo CIV-J, sem diferenças estatísticas

entre os desafios cariogênicos. Os resultados diferem dos obtidos no estudo por Sá et al.⁶⁸, no qual o ionômero de vidro modificado por resina preveniu a desmineralização melhor do que os demais materiais no modelo microbiano do que no modelo por ciclagem de pH. Os autores compararam diferentes materiais restauradores, incluindo um cimento de ionômero de vidro convencional, ionômero de vidro modificado por resina e resinas compostas modificadas por poliácidos e concluíram que o modelo por ciclagem de pH foi mais sensível à quantidade de flúor liberados pelos materiais do que o modelo microbiano e que no modelo por ciclagem de pH, um efeito preventivo foi observado com os materiais ionoméricos. No modelo microbiano, este efeito não foi observado. Os autores afirmaram que nenhuma relação pode ser estabelecida entre a capacidade anti-cariogênica dos materiais ionoméricos e a liberação de flúor quando o modelo microbiano foi utilizado. No entanto, os modelos utilizados pelos autores diferem do presente estudo em relação ao tempo (3 dias) e não houve análise da área de lesão formada, nem da perda mineral por EDS, somente a análise por microscopia a laser confocal.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os estudos de Pin et al.⁶⁴ e Dionysopoulous et al.²⁵, uma vez que nenhum material restaurador conseguiu prevenir o estabelecimento de lesão de cárie secundária e os materiais resinosos não demonstraram qualquer efeito cariostático, o qual foi demonstrado pelos materiais ionoméricos.

A estatística empregada nos resultados de uma maneira geral foi bastante diversificada em virtude da grande quantidade de grupos experimentais. O teste estatístico *Kruskal-Wallis*, seguido do teste *Student-Newman-Keuls* foram escolhidos uma vez que os resultados apresentaram, em sua grande maioria, distribuição não-paramétrica. Além disso, estes testes são utilizados para espécimes independentes com n desigual (no caso, o grupo controle de todos os desafios cariogênicos apresentava número menor de espécimes)¹⁰. Desta forma, para padronizar o teste estatístico, contribuindo para posterior comparação dos

resultados, um mesmo teste foi aplicado nos resultados de todos os grupos experimentais. Ressalva seja feita aos resultados de aderência, nos quais foram aplicados os testes *Kruskal-Wallis*, seguida da comparação de *Dunn*, uma vez que os resultados transformados em Log10 apresentaram pequena variação e pequenos valores ordinais (mínimo 3,85, máximo 6,70), o que não foi o caso dos demais grupos experimentais.

Independente da metodologia de indução de cárie secundária, a análise estatística dos resultados de microscopia de luz polarizada demonstrou haver diferenças significantes entre os materiais ionoméricos (CIV-V e CIV-J) e os materiais resinosos (RC-Z e RC-F), com menor lesão de cárie secundária formada pelos materiais ionoméricos ($p < 0,05$). Bynum e Donly¹⁶ afirmaram em seu estudo que cimentos de ionômero de vidro fornecem maior prevenção à cárie secundária do que resinas compostas modificadas por poliácidos, porém quando estes materiais são expostos a dentifrícios fluoretados, os cimentos de ionômero de vidro e as resinas compostas modificadas por poliácidos demonstram o mesmo grau de remineralização, quando observados por microscopia de luz polarizada.

Francci et al.³⁰ relataram o efeito positivo da liberação de flúor por cimentos de ionômero de vidro, incluindo Fuji IX, na resistência à desmineralização dentária, quando os espécimes restaurados foram colocados em desafio cariogênico com *S. mutans*, embora a metodologia utilizada diferisse consideravelmente do presente trabalho.

O ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (grupo CIV-V) apresentou resultados melhores que outros cimentos de ionômero de vidro convencionais no estudo de Herrera et al.³⁶, quando os espécimes foram associados a diferentes microrganismos relacionados ao desenvolvimento de lesões de cárie, dentre eles *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Porphyromonas* spp. e *Clostridium*

spp. Os autores concluíram que a ação antibacteriana dos materiais ionoméricos não é limitada a microrganismos do esmalte, como os estreptococos, mas também contra microrganismos envolvidos em cárie cementária, como *Actinomyces* spp. e periodontopatógenos, como *Porphyromonas* spp., afirmando que estudos *in vivo* envolvendo materiais restauradores pudessem em breve corroborar os resultados obtidos.

Dionysopoulos et al.²⁵ afirmaram em seu estudo que a progressão de lesões de cárie secundária pode ser significativamente reduzida quando cimentos de ionômero de vidro convencionais, ionômeros de vidro modificados por resina ou resinas compostas modificadas por poliácidos, forem utilizadas como materiais restauradores em cavidades radiculares. No entanto, os autores utilizaram apenas método *in vitro* de indução de cárie secundária radicular.

Os estudos *in situ* apresentam vantagens relatadas na literatura sobre os métodos *in vitro* e *in vivo*^{22, 35, 37}, que incluem maior controle das condições clínicas e utilização da saliva humana no processo de remineralização das lesões. Com modelo utilizado neste estudo, no qual a desmineralização ocorreu fora da cavidade bucal, há possibilidade de se testar agentes ou procedimentos que poderiam ser deletérios à dentição natural, portanto eticamente inaceitáveis. No entanto, enquanto tais protocolos aumentam o controle do experimento, eles também reduzem o realismo no qual o modelo representa uma lesão de cárie verdadeira. Além disso, a habilidade de remoção do aparelho palatal pelos voluntários por razões triviais pode levar à colaboração diminuída ao estudo³⁷. Há na literatura³⁷ a sugestão de estudos *in situ* com a fixação dos espécimes em dentes posteriores, por meio de bandas ortodônticas, entretanto estes modelos são inflexíveis em relação à múltiplos tratamentos e controles.

Kotsanos⁴² utilizou metodologia *in situ* para avaliar a microdureza do esmalte adjacente às restaurações com materiais ionoméricos e resinas compostas modificadas por poliácidos. O maior

efeito protetor contra lesões de cárie foi demonstrado pelo ionômero de vidro modificado por resina Vitremer e os resultados demonstraram que ionômeros de vidro modificados por resina e cimentos de ionômero de vidro convencionais foram superiores às resinas compostas modificadas por poliácidos e isto poderia ser explicado por meio da natureza química de cada material. Cimentos de ionômero de vidro convencionais são produzidos pela mistura de pó/líquido e liberam mais flúor do que resinas compostas modificadas por poliácidos, que necessitam de fotoativação e não apresentam reação química de aderência à superfície dentária ^{42, 72, 85}. Nos resultados de seu estudo, Kotsanos ⁴² afirmou que os espécimes restaurados com Vitremer não apresentaram nenhum sinal de lesão de cárie, diferente do presente trabalho, embora também afirmem que a microscopia de luz polarizada apresenta limitações em quantificar a perda mineral.

Em relação aos resultados por EDS, os grupos controles dos desafios cariogênicos *in vitro* e *in situ* apresentaram resultados concordantes com o estudo de Moshonov et al. ⁵¹, no qual a média da porcentagem de cálcio no esmalte humano variou de 33,8 ($\pm 2,3$) a 35 ($\pm 4,3$) e Arnold et al. ⁶, com porcentagens médias de concentração de cálcio de 36,38 ($\pm 4,05$). Porém, os resultados do presente estudo foram mais baixos do que os apresentados por Aires et al. ², no qual a porcentagem média de cálcio foi de 39,4 ($\pm 17,2$).

A hipótese nula (H_0) aplicada em todo o estudo foi que os materiais não apresentariam diferenças em relação à área ou à concentração dos elementos químicos ou à aderência de *S. mutans*. Esta hipótese foi rejeitada em muitos testes estatísticos utilizados no presente estudo. Em relação ao desafio cariogênico por *S. mutans*, observou-se que o grupo RC-Z apresentou menor concentração de cálcio do que os demais materiais restauradores dentro do grupo experimental, confirmando os resultados obtidos com microscopia de luz polarizada, nos quais o grupo RC-Z apresentou maior área de lesão de cárie secundária.

Em relação ao desafio cariogênico por ciclagem de pH, o grupo CIV-J apresentou maior concentração de cálcio do que os demais materiais, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Este resultado confirmou a análise por microscopia de luz polarizada, na qual o grupo CIV-J demonstrou menor formação de lesão de cárie secundária, com diferenças estatísticas significantes em relação aos grupos RC-Z e RC-F. Entretanto, embora não houvesse diferença entre os materiais ionoméricos quando submetidos ao desafio cariogênico por ciclagem de pH, houve diferença na concentração de cálcio apresentado por eles, o que evidencia a maior sensibilidade do EDS na avaliação do espécime, embora somente a análise por EDS não permita avaliar a histomorfometria do espécime. É importante salientar que diferentes metodologias devem ser associadas para a avaliação de espécimes submetidos a desafios cariogênicos, uma vez que cada metodologia apresenta particularidades, vantagens e desvantagens.

No caso dos materiais submetidos ao desafio cariogênico *in situ* dentro do grupo controle e também nos grupos experimentais no que se refere à concentração de cálcio, fósforo e flúor, H_0 foi rejeitada. Em relação à concentração de cálcio, pode-se observar que houve maior perda de cálcio pelos materiais resinosos (RC-Z e RC-F) do que pelos materiais ionoméricos (CIV-V e CIV-J), porém a inclusão de flúor na composição de RC-F não pareceu ser significativa, uma vez que não houve diferença em relação à concentração de cálcio, fósforo e flúor, entre RC-F e RC-Z, o qual não possui flúor adicionado em sua composição.

Não houve a correlação dos dados de área de lesão formada por meio da microscopia de luz polarizada com a concentração de cálcio fornecida pela EDS, o que corroborou o modelo matemático proposto por Sousa et al.⁷⁵, no qual imagens de microscopia de luz polarizada foram utilizadas para cálculo matemático do conteúdo mineral do esmalte e concluiu-se que diferenças na birrefringência do esmalte sob

imersão em meio aquoso ou ar não podem ser atribuídas somente às variações minerais. A inter-relação com os elementos, bem como o método de tratamento das amostras pode interferir no cálculo.

A aderência bacteriana à superfície de resina composta e a outros materiais restauradores é um parâmetro importante na etiologia da formação de lesões de cárie secundária⁵⁰. O biofilme dentário pode abrigar espécies bacterianas que estão envolvidas no desenvolvimento de lesões de cárie secundária e do processo de desmineralização do esmalte. A formação do biofilme na superfície dentária é um fenômeno complexo e diferentes fatores-chaves estão envolvidos. Primeiro, há adsorção de proteínas salivares do hospedeiro na superfície dentária ou do material restaurador. A seguir, há a aderência das células bacterianas e neste momento, a colonização da nova superfície ocorre. A influência do material não está definida, mas diferentes estudos sugerem que diversos materiais restauradores podem apresentar atividade antibacteriana ou podem induzir o crescimento de diversas espécies bacterianas, no entanto, apenas informação limitada está disponível sobre aderência bacteriana na superfície de materiais restauradores^{12, 50}.

Em relação aos resultados de aderência de *S. mutans* aos materiais restauradores neste estudo, os dados resultantes dos ensaios de aderência cobriram uma faixa muito grande. Desta forma, conforme recomendado por Itota et al.³⁹ e Cassanho et al.²⁰ os dados foram estatisticamente analisados após conversão logarítmica.

A ausência de diferença estatística significativa entre os grupos RC-F, CIV-V e CIV-J em relação à aderência de *S. mutans* foi um resultado importante, uma vez que embora apresentem flúor em sua composição, estes materiais restauradores são bastante diferentes: no grupo RC-F, temos um compômero, no grupo CIV-V um ionômero modificado e no grupo CIV-J um cimento de ionômero de vidro convencional. Esta diferença na composição não pareceu alterar a aderência de *S. mutans* à superfície dos materiais.

Estes resultados diferiram do estudo de Candido et al.¹⁷, no qual RC-F demonstrou atividade antibacteriana diferenciada em relação ao CIV-V. No entanto, os autores afirmaram que RC-F apresentou maior atividade anti-*Lactobacillus acidophilus* do que anti-*S. mutans*. No entanto, os autores utilizaram uma metodologia diferente da aplicada no presente estudo, com a utilização de discos de difusão em ágar, metodologia esta também utilizada por Herrera et al.³⁶, que comparou diferentes cimentos de ionômero de vidro modificados ou não por resina. Dentre os resultados, o ionômero de vidro modificado por resina Vitremer apresentou maior efeito antibacteriano diante de *Streptococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Actinomyces* spp, *Porphyromonas* spp e *Clostridium* spp.

Diversas metodologias estão presentes na literatura com o objetivo de testar os efeitos antimicrobianos de materiais restauradores. Dentre elas, o teste de difusão em ágar, utilizado em alguns estudos^{17, 36}, embora as diferenças nas velocidades de difusão que são características de cada material, sejam uma limitação para comparação destes materiais²⁰. Desta forma, cuidado deve ser tomado quando se compara o efeito antimicrobiano de diferentes materiais restauradores em estudos que utilizam diferentes metodologias, abrangendo estudos de aderência, formação de biofilme, halo de inibição, dentre outros.

Os resultados do presente estudo também diferiram dos resultados de Eick et al.²⁶, no qual a aderência de *S. mutans* não foi inibida pelo CIV-V. Os autores afirmaram que a concentração de flúor não inibiu a aderência de *S. mutans*, resultados concordantes com Montanaro et al.⁵⁰, os quais afirmaram que os cimentos de ionômero de vidro modificados ou não por resina não foram capazes de reduzir a aderência bacteriana, embora diferentes metodologias foram utilizadas nestes estudos.

Montanaro et al.⁵⁰ afirmaram que os ionômeros de vidro modificados por resina apresentam capacidade de reduzir o crescimento

bacteriano em testes de difusão em ágar, mas a atividade antibacteriana nem sempre coincide com a habilidade de dado material de prevenir a aderência bacteriana em sua superfície. A liberação de flúor dos materiais restauradores pode agir reduzindo a proliferação e o metabolismo bacteriano, portanto inibindo o crescimento bacteriano, mas pode ser incapaz de prevenir o rápido e espontâneo processo de aderência bacteriana inicial.

A aderência de *S. mutans* a materiais restauradores na cavidade bucal envolve diversos elementos, dentre eles proteínas salivares ¹ e componentes presentes nos materiais restauradores ¹⁷. Em adição, testes de aderência levam algumas horas, portanto somente os primeiros estágios da adesão bacteriana são estudados, embora de acordo com Gaines et al. ³², grande parte da aderência bacteriana ocorre dentro dos primeiros 10 minutos do tempo de incubação dos espécimes em meio de cultura com microrganismos e o efeito de saturação é observado após 30 minutos. As bactérias atingem a superfície dos materiais restauradores de maneira ativa ou passiva, aderindo a esta superfície primeiramente de maneira reversível depois irreversível e neste processo a retenção bacteriana depende da energia de superfície inicial e o fluxo salivar ²⁶. O presente estudo, no entanto, não avaliou o fluxo salivar como componente da aderência, sendo necessários futuros estudos para estabelecer o efeito do fluxo salivar nos resultados do presente estudo.

A cavidade bucal é um complexo sistema ecológico no qual a composição salivar apresenta um papel muito importante nos processos de desmineralização e remineralização da superfície dentária. Portanto, o desenvolvimento de lesões de cárie secundária nas margens de restaurações é de gênese multifatorial, incluindo composição salivar, colonização bacteriana, idade, higiene bucal, biodisponibilidade de flúor e qualidade da restauração. Desta forma, mais estudos são necessários para o desenvolvimento de regimes de prevenção a lesões de cárie

secundária, bem como para o entendimento da complexa interação entre restauração, ambiente bucal e superfície dentária ⁷.

7 CONCLUSÕES

Com as limitações deste estudo, pode-se concluir que:

- a) todos os materiais restauradores apresentaram desmineralização quando submetidos ao desafio cariogênico em cultura de *Streptococcus mutans*, desafio cariogênico em soluções desmineralizantes e remineralizantes (ciclagem de pH) e desafio cariogênico *in situ*, com diferentes resultados conforme as metodologias de indução de lesão de cárie secundária;
- b) os espécimes restaurados com a resina composta convencional Z250 foram os que apresentaram maior lesão de cárie secundária sob microscopia de luz polarizada, não diferindo dos espécimes restaurados com a resina composta modificada por poliácidos Freedom, quando submetidos ao desafio cariogênico em cultura de *S. mutans*. Sob análise de espectroscopia por dispersão de raios-X (EDS), somente os espécimes restaurados com cimento de ionômero de vidro Fuji IX não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação à concentração de cálcio, quando os espécimes do grupo controle e do grupo experimental submetido ao desafio cariogênico por *S. mutans* foram comparados;
- c) quando os espécimes submetidos à ciclagem de pH foram analisados sob microscopia de luz polarizada, não houve diferença entre os materiais resinosos (RC-Z e RC-F) e entre os materiais ionoméricos (CIV-F e CIV-J), porém as demais combinações de materiais apontaram diferenças estatísticas significantes. Sob

análise de EDS, o grupo CIV-J diferiu de todos os demais em relação à concentração de cálcio;

- d) após o desafio cariogênico *in situ*, concluiu-se que sob microscopia de luz polarizada, o grupo CIV-J apresentou menor lesão do que as resinas compostas, porém sem diferença estatística em relação ao grupo CIV-V. Sob análise de EDS, houve diferença estatística significativa entre os materiais resinosos e ionoméricos, porém não houve diferença entre os materiais da mesma categoria;
- e) o método *in situ* permitiu maior desmineralização dos espécimes quando comparada às metodologias *in vitro*, tanto sob microscopia de luz polarizada quanto sob EDS;
- f) a aderência de *S. mutans* foi maior na resina composta convencional Z250 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), porém sem diferença estatística entre os grupos RC-F, CIV-V e CIV-J.

8 REFERÊNCIAS *

- 1 Ahn S-J, Kho H-S, Lee S-W, Nahm D-S. Roles of salivary proteins in the adherence of oral Streptococci to various orthodontic brackets. J Dent Res. 2002 June; 81(6): 411-5, 2002.
- 2 Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. Caries Res. 2006; 40:28-32.
- 3 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Techniques for the production of dental eroded lesions *in vitro*. J Oral Rehabil. 1999 Feb.; 26(2):97-102.
- 4 Amaral MT, Guedes-Pinto AC, Chevitarese O. Effects of a glass-ionomer cement on the remineralization of occlusal caries – an *in situ* study. Braz Oral Res. 2006 Apr./June; 20(2):91-6.
- 5 Araújo RM, Araújo MAM, Pinto Silva RCS, Gonçalves SEP, Huhtala MFRL, Rodrigues JR. Influência de diferentes meios de armazenamento de dentes extraídos na infiltração marginal. J Bras Clin Estet Odontol. 1999; 3(14):31-5.

*De acordo com: Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.] Disponível em http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.

- 6 Arnold WH, Cerman M, Neuhaus K, Gaengler P. Volumetric assessment and quantitative element analysis of the effect of fluoridated milk on enamel demineralization. *Arch Oral Biol.* 2003; 48:467-473.
- 7 Arnold WH, Sonkol T, Zoellner A, Gaengler P. Comparative study of *in vitro* caries-like lesions and natural caries lesions at crown margins. *J Prosthodont.* 2007 Nov./Dec.; 16(6):1-7.
- 8 Asaka Y, Miyazaki M, Aboshi H, Yoshida T, Takamizawa T, Kurokawa H, et al. EDX fluorescence analysis and SEM observation of resin composites. *J Oral Sci.* 2004 Sept.; 46(3):143-8.
- 9 Asmussen E, Peutzfeldt A. Direction of shrinkage of light-curing resin composites. *Acta Odontol Scan.* 1999 Dec.; 57(6):310-5.
- 10 Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL. *BioEstat aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas Belém: Logistic; 2005, 324p.*
- 11 Benelli EM, Serra MC, Rodrigues Júnior AL, Cury JA. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Res.* 1993; 27(4):280-4.
- 12 Biswas S, Biswas I. Regulation of the glucosyltransferase (*gtfBC*) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2006; 188(3):988-98.
- 13 Borisevich VD, Morozov OE, Zaozerskiy YP, Shmelev GM, Shipilov YD. On the enrichment of low-abundant isotopes of light chemical elements by gas centrifuges *Nuc Instrum Meth Phys Res* 2000; 450:(2-3): 515-21.

- 14 Borja F. Introdução à microscopia. [texto na internet, citado em 08 de março de 2007] Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Centro de Saúde e Tecnologia Rural – CSTR – Medicina Veterinária – Histologia e Embriologia. 1-4 Disponível em: <http://www.cstr.ufcg.edu.br/histologia/microscopia.htm>.
- 15 Busscher HJ, Van Der Mei HC. Physico-chemical interaction in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*. 1997 Apr.; 11(1):24-32.
- 16 Bynum AM, Donly KJ. Enamel de/remineralization on teeth adjacent to fluoride releasing materials without dentifrice exposure. *J Dent Child*. 1999 Mar./Apr.; 66(2):89-92.
- 17 Candido MSM, Pizzolitto AC, Bandeira MFCL, Santana IL, Bordin MM. Ação antibacteriana de diferentes materiais restauradores. *J Bras Clin Estet Odontol*. 2000 jul./ago.; 4(22):49-52.
- 18 Carreto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. *Rev Odontol UNESP* 2007; 36(3):281-6.
- 19 Carvalho AS, Cury JA. Liberação de flúor de materiais restauradores. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1998 out./dez.; 12(4):367-73.
- 20 Cassanho ACA, Fernandes AM, Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC, Koga-Ito CY. *In vitro* activity of zinc oxide-eugenol and glass ionomer cements on *Candida albicans*. *Braz Oral Res* 2005; 19(2):134-6.

- 21 Castro AM, Mochidome FI, Novaes MSP, Perez RLW. *Streptococcus mutans* na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária. Rev Cons Reg Odontol Minas Gerais 2001 jan./abr.; 6(1): 24-7.
- 22 Cury JA, Francisco SB, Simões GS, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM. Effect of calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization *in situ*. Caries Res. 2003 May/June; 39(3):194-9.
- 23 Daley TD, Gibson D. Practical applications of energy dispersive X-ray microanalysis in diagnostic oral pathology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod. 1990 Mar.; 69(3):339-44.
- 24 De Munck J, Van Landuy K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. J Dent Res. 2005 Feb.; 84(2):118-32.
- 25 Dionysopoulos P, Kotsanos N, Koliniotou-Koubia E, Tolidis K. Inhibition of demineralization *in vitro* around fluoride releasing materials. J Oral Rehabil. 2003 Dec.; 30(12):1216-22.
- 26 Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. J Oral Rehabil. 2004 Mar.; 31(3):278-285.
- 27 Featherstone JDB. Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. Dent Mater. 1996 May; 12(3):194-7.
- 28 Featherstone JDB, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. Caries Res. 1981; 15(5):377-85.

- 29 Fontana M, González-Cabezas C. Secondary caries and restoration replacement: an unresolved problem. *Compend Contin Educ Dent*. 2000. Jan; 21(1):15-27.
- 30 Francci C, Deaton TG, Arnold RR, Swift EJ Jr, Perdigão J, Bawden JW. Fluoride release from restorative materials and its effects on dentin demineralization. *J Dent Res*. 1999 Oct.; 78(10):1647-54.
- 31 Fu B, Yuan J, Qian W, Shen Q, Sun X, Hannig M. Evidence of chemisorption of maleic acid to enamel and hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci*. 2004 Aug.; 112(4):362-7.
- 32 Gaines S, James TC, Folan M, Baird AW, O'Farrelly C. A novel spectrofluorometric microassay for *Streptococcus mutans* adherence to hydroxylapatite. *J Microbiol Methods*. 2003 Sept.; 54(3):315-23.
- 33 Gybbons RJ, Nygaard M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. *Arch Oral Biol*. 1968; 13:1249-62.
- 34 Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *Eur J Oral Sci*. 2005 June; 113(3): 245-50.
- 35 Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. *Caries Res*. 2003; 37:339-44.

- 36 Herrera M, Castillo A, Baça P, Carrion P. Antibacterial activity of glass-ionomer restorative cements exposed to cavity-producing microorganisms. *Oper Dent.* 1999 Sept./Oct.; 24(5):286-91.
- 37 Higham SM, Pretty IA, Edgar WM, Smith PW. The use of *in situ* models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent.* 2005; 33:235-241.
- 38 Idone V, Brendiro S, Gillespie R, Kocaj S, Peterson E, Rendi M et al. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. *Infect Immunol* 2003 Aug.; 1(8):4351-60.
- 39 Itota T, Nakabo S, Narukami T, Tashiro Y, Torii Y, McCabe JF et al. Effect of two-step adhesive systems on inhibition of secondary caries around fluoride-releasing resin composite restoration in root dentin. *J Dent.* 2005 Feb.; 33(2):147-54.
- 40 Itthagarun A, King NM, Wefel JS, Tay FR, Pashley DH. The effect of fluoridated and non-fluoridated rewetting agents on *in vitro* recurrent caries. *J Dent.* 2001; 29:255-73.
- 41 Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3^a. ed. São Paulo: Santos, 2007. 122p.
- 42 Kotsanos N. An intraoral study of caries induced on enamel in contact with fluoride-releasing restorative materials. *Caries Res.* 2001;35:200-4.
- 43 Kühnisch J, Dietz W, Stösser L, Hickel R, Heinrich-Weltzien R. Effects of dental probing on occlusal surfaces – a scanning electron microscopy evaluation. *Caries Res.* 2007; 41:43-8.

- 44 Lennon AM, Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Approximal caries development in surfaces in contact in fluoride-releasing and non-fluoride releasing restorative materials: an *in situ* study. Eur J Oral Sci. 2007; 115:497-501.
- 45 Liporoni P, Paulilo LAMS, Cury JA, Santos Dias CT, Paradella TC. Surface finishing of resin-modified glass ionomer. Gen Dent. 2003 Nov./Dec.; 51(6):541-3.
- 46 Lobo MM, Gonçalves RB, Ambrosano GMB, Pimenta LAF. Chemical or microbiological models of secondary caries development around different dental restorative materials. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005 Aug.;74(2):725-31.
- 47 Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. Acta Odontol Scand. 1963, 21(43):533-51.
- 48 Mahoney EK, Rohanizadeh R, Ismail FSM, Kilpatrick NM, Swain MV. Mechanical properties and microstructure of hypomineralised enamel of permanent teeth. Biomaterials Sept.; 25(20): 5091-100.
- 49 Massara MLA, Alves JB, Brandão PRG. Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. Caries Res. 2002 Nov./Dec.; 36(6): 430-6.
- 50 Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, Arciola CR. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. Biomaterials 2004, 25: 4457-63.

- 51 Moshonov J, Stabholz A, Bar-Hilel R, Peretz B. Chemical analysis and surface morphology of enamel and dentin following 9.6 μ CO₂ laser irradiation versus high speed drilling. J Dent. 2005 May; 33(5): 427-32.
- 52 Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Caries Res. 2005 Jul./Aug.; 39(4):262-8.
- 53 Napimoga MH, Hofling JF, Klein MI, Kamiya Ru, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Sci. 2005 June; 47(2):59-64.
- 54 Nogueira EC, Serra MC, Morais PMR, Marchi GM. Avaliação *in vitro* da ação cariostática de híbridos de ionômero de vidro/resina composta. Rev Paul Odontol. 2001 maio/jun.; 23(3): 30-3.
- 55 Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. J Med Microbiol. 2005 Jul.; 54(7): 661-5.
- 56 Okazaki M. Chrystallographic morphology of heterogenous fluoridated carbonate apatites. J Dent Res. 1993 Sept.; 72(9): 1285-90.
- 57 Oliveira JR, Paradella TC, Rego MA, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Avaliação da aderência microbiana e rugosidade superficial de resina acrílica quimicamente ativada após ciclagem com diferentes soluções desinfetantes. Cienc Odontol Bras 2007 abr./jun.; 10(2):54-60.

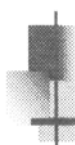
- 58 Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res.* 1991; 25:438-43.
- 59 Paradella TC. Cimentos de ionômero de vidro na odontologia moderna. *Rev Odontol UNESP* 2004; 33(4):157-61.
- 60 Paradella TC, Fava M. Bond strength of adhesive systems to human tooth enamel. *Braz Oral Res* 2007 Jan./Mar.;21(1):4-9.
- 61 Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev Odontol UNESP* 2007; 36(2):163-8.
- 62 Pelino JEP, Mello JB, Eduardo CP, Jorge AOC. *In vitro* study of the Nd:YAG laser effect on human dental enamel: optical and scanning electron microscope analysis. *J Clin Laser Med Surg.* 1999; 17(4):171-7.
- 63 Pereira PNR, Inokoshi S, Yamada T, Tagami J. Microhardness of *in vitro* caries inhibition zone adjacent to conventional and resin-modified glass ionomer cements. *Dent Mater.* 1998; 14:179-85.
- 64 Pin MLG, Abdo RCC, Machado MAAM, Silva SMB, Pavarini A, Marta RN. *In vitro* evaluation of cariostatic action of esthetic restorative materials in bovine teeth under severe cariogenic challenge. *Oper Dent.* 2005 May/June; 30(3): 368-75.
- 65 Pinelli C, Serra MC. Diagnóstico de cárie. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1999 mar./abr.; 53(2): 127-31.

- 66 Quirynem M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man: a review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(1): 1-14.
- 67 Rodrigues LK, Cury JA, Santos MN. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization *in vitro*. *J Oral Sci*. 2004 Dec.; 46(4): 215-20.
- 68 Sá LT, González-Cabezas C, Cochran MA, Fontana M, Matis BA, Moore BK. Fluoride releasing materials: their anticariogenic properties tested in *in vitro* caries model. *Oper Dent*. 2004 Sept./Oct.; 29(5): 524-31.
- 69 Samarawickrama DYD. Saliva substitutes: how effective and safe are they? *Oral Dis*. 2002; 8:177-9.
- 70 Seeman R, Bizhang M, Klück I, Loth J, Roulet JF. A novel *in vitro* microbial-based model for studying caries formation – development and initial testing. *Caries Res*. 2005; 39:185-90.
- 71 Serra MC, Cury JA. The *in vitro* effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. *Quintessence Int*. 1992; 23(2): 1430-7.
- 72 Serra MC, Rodrigues Júnior AL. Potencial cariostático de materiais restauradores contendo flúor. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1998 set./out.; 52(5): 359-63.
- 73 Silness J, Löe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; 22(9):122-35.

- 74 Silva RC, Zuanon ACC. Surface roughness of glass ionomer cements indicated for atraumatic restorative treatment (ART). *Braz Dent J*. 2006; 17(2):106-9.
- 75 Sousa FB, Vianna SS, Santos-Magalhães NS. A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel mineral content using polarizing microscopy. *J Microscopy*. 2006; 221:79-83.
- 76 Stanley HR. Guest editorial: an urgent plea for standardized bonding adhesion test. *J Dent Res*. 1993 Oct.; 72(10): 1362-3.
- 77 Statham PJ. A check total for validating standardless and normalized EDX analysis at low kv. *Microchim Acta*. 2004; 145:229-35.
- 78 Takagi S, Liao H, Chow LC. Effect of a low-fluoride content, two-component rinse on fluoride uptake and on de- and remineralization of enamel lesions: an *in vitro* study. *Caries Res*. 2001; 35(3): 223-8.
- 79 Takatsuka T, Tanaka K, Iijima Y. Inhibition of dentine demineralization by zinc oxide: *in vitro* and *in situ* studies. *Dent Mater*. 2005; 21:1170-7.
- 80 Ten Cate JM, Mundoff-Shrestha AS. Working group report 1: laboratory models for caries (*in vitro* and animal models). *Adv Dent Res*. 1995 Nov; 9(3):323-4.
- 81 Tenuta LMA, Lima JEO, Cardoso CL, Tabchoury COM, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. *Pesq Odontol Bras*. 2003; 17(4): 326-31.

- 82 Thylstrup A, Fejersköv O. Cariologia clínica. São Paulo: Santos, 2001. 3ª. ed. 421p.
- 83 Trebbia P. CLEDX: a stand-alone program for quantitative X-Ray analysis using the Cliff-Lorimer procedure. Ultramicroscopy 1989, 27:343-348.
- 84 Valença AMG, Sousa ROA, Pessoa CN, Soares Filho PJ. Avaliação em microscopia de luz polarizada do efeito remineralizador de materiais restauradores fluoretados. Pesq Bras Odontoped Clin Intgr, João Pessoa 2004 set./dez.; 4(3): 221-34.
- 85 Yaman SD, Er Ö, Yetmez M, Karabay GA. *In vitro* inhibition of caries-like lesions with fluoride-releasing materials. J Oral Sci. 2004 Mar.; 46(1):45-50.
- 86 Yip HK, Guo JH, Wong WHS. Incipient caries lesions on cementum by mono- and co-culture oral bacteria. J Dent. 2007; 277-82.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



CERTIFICADO

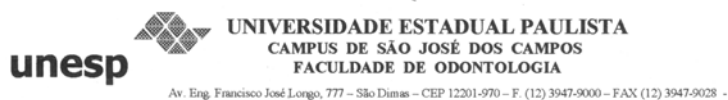
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 069/2005-PH/CEP, sobre “Desafio criogênico com *Streptococcus Mutans* e Ciclagem de PH em materiais restauradores: Análise por microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de Raios-X (EDS)”, sob a responsabilidade de **THAÍS CACHUTÉ PARADELLA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 11 de outubro de 2005.

Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em Pesquisa-Local

São José dos Campos, 08 de maio de 2006

Ofício nº 021/06-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	THAÍS CACHUTÉ PARADELLA
Projeto	Desafio criogênico com Streptococcus Mutans e Ciclagem de PH em materiais restauradores: Análise por microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de Raios-X (EDS)
PARECER	
Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a ALTERAÇÃO DO TÍTULO, passando para "ADERÊNCIA, DESAFIO CARIOGÊNICO COM STREPTOCOCCUS MUTANS E CICLAGEM DE pH EM MATERIAIS RESTAURADORES: ESTUDO IN VITRO E IN SITU POR MEIO DE MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA E ESPECTROSCOPIA POR DISPERSÃO DE RAIOS-X (EDS)". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 069/2005-PH/CEP de 11/10/2005	

Atenciosamente,

Profa. Dra. **SUELY CARVALHO MUTTI NARESSI**

Coordenadora do CEP/FOSJC

Anexo C – Publicação do artigo com parte da tese de doutorado na revista internacional Qualis A *European Journal of Oral Science*



Primary caries levels in the world have declined since the early 1980s; however, secondary caries remain as an unsolved issue in restorative dentistry (1, 2). Laboratory models for studying secondary caries have become common since the late 1990s because the study of caries formation and caries development, under various conditions, is vital in caries prevention and treatment (3-5). These models are easy to reproduce; however, they do not include the many variables related to caries development, such as salivary flow. Although *in vivo* caries models are considered to be the most reliable, they are expensive and time-consuming. *In situ* models show that they are particularly valuable for monitoring demineralization and remineralization of artificial lesions in relation to product testing as alternatives to clinical trials, and present significant advances over *in vitro* methods (6). *In situ* models are considered intermediate between *in vitro* and *in vivo* models because clinical conditions related to caries development may be controlled (7-9).

Sá *et al.* (10), when comparing different restorative materials under an *in vitro* pH-cycling caries-like lesion model and an *in vitro* microbial model, stated that glass-

ionomer cements under pH-cycling showed significant anticariogenic properties, which were absent in the microbial model. Although the behavior of fluoride-releasing restorative materials under *in vitro* cariogenic challenge has been investigated and confirmed by several authors, the properties of these materials under different caries-like models needs to be further investigated, as a result of the numerous open questions regarding the pathogenesis and progression of secondary caries (2, 11, 12).

Caries lesions can be evaluated under different methodologies, such as scanning electron microscopy (SEM) and polarized light microscopy (PLM). Scanning electron microscopy enables the study of enamel micromorphology, while PLM allows the visualization of areas with different porosities and birefringences. On the other hand, energy-dispersive X-ray analysis (EDS) provides a specific method to determine the concentration of chemical elements on substratum surfaces, being largely used in Engineering and Chemistry, but in not many studies in Dentistry (13-17). Thus, a study of fluoride-releasing materials after *in situ* cariogenic challenge comparing different methodologies has not yet been carried out.

Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Prezado (a) paciente,

Eu, Thaís Cachuté Paradella, RG 298886650, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal da FOSJC-UNESP, juntamente com o meu orientador, professor Antonio Olavo Cardoso Jorge, vamos realizar uma pesquisa cujo título é “Aderência, desafio cariogênico com *Streptococcus mutans* e ciclagem de pH em materiais restauradores: estudo *in vitro* e *in situ* por meio de microscopia de luz polarizada e EDS”.

O objetivo deste estudo é dispormos de base científica para indicar materiais restauradores que acumulem menor número de bactérias, favorecendo a saúde bucal. Para isso, precisamos realizar uma moldagem para que possamos confeccionar uma placa removível específica para sua arcada superior. Esta placa deverá ser usada dia e noite, durante 2 semanas, sendo retirada durante os períodos de alimentação e higiene bucal, quando esta placa deverá ser guardada em um recipiente apropriado, que será fornecido ao Sr.(a), juntamente com a placa. Também iremos fornecer ao Sr. escova de dente e dentifrício. O uso da placa não trará nenhum prejuízo a sua saúde e, a qualquer momento, o Sr. (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Caso houver algum desconforto, o Sr.(a) poderá nos informar através do telefone (12) 3947-9033. Será mantido total sigilo sobre sua identidade. Não haverá qualquer despesa pessoal para sua participação no estudo. Contudo, também não haverá qualquer forma de remuneração.

Em caso de dúvida, o Sr.(a) poderá se dirigir ao Comitê de Ética em Pesquisa-Local (CEP) na FOSJC-UNESP.

Nome completo e assinatura

Data: ____/____/____

Apêndice 2 – Anamnese de voluntário

Anamnese de voluntário

1. SIGLA: _____ 2. NÚMERO: _____

3. DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

4. COMO CONSIDERA SEU ESTADO DE SAÚDE GERAL: _____

5. APRESENTA ALGUMA DAS SEGUINTE DOENÇAS:

diabetes

problemas renais

depressão

anorexia

problemas hepáticos

outros _____

6. FAZ OU FEZ USO DE ALGUM DOS SEGUINTE MEDICAMENTOS
ABAIXO NOS ÚLTIMOS TRÊS MESES:

antibiótico

remédios para dieta

antidepressivo

antifúngico

ansiolítico

outros _____

7. JÁ SOFREU RADIOTERAPIA? _____

8. POSSUI DOENÇA PERIODONTAL? _____

9. POSSUI XEROSTOMIA? _____

10. POSSUI AFTAS RECORRENTES OU OUTRAS PATOLOGIAS
BUCAIS? _____11. HÁ MAIS ALGUM DADO QUE GOSTARIA DE RELATAR OU QUE
NÃO FOI PERGUNTADO? _____

ASSINATURA: _____

DATA: ____/____/____.

Apêndice 3 – Resultados dos exames pré-*in situ* nos voluntários incluídos no estudo (continua)

Determinação do fluxo salivar

Capacidade tampão

**Contagem de
estreptococos do grupo
mutans**

Sigla	Coleta não-estimulada	Coleta estimulada	Avaliação	pH	Avaliação	UFC/mL	Avaliação
FACGS	1,02 mL/min	2,2 mL/min	normal	6,23	normal	110 x 10 ⁴	normal
TCP	1,2 mL/min	1 mL/min	normal	5,70	normal	10,5 x 10 ³	normal
MAR	1 mL/min	1 mL/min	normal	5,21	normal	7 x 10 ⁴	normal
JOB	1 mL/min	1 mL/min	normal	5,38	normal	4,5 x 10 ⁴	normal
RSS	1 mL/min	1 mL/min	normal	6,78	normal	18 x 10 ⁴	normal
GMM	1 mL/min	1 mL/min	normal	6,65	normal	33 x 10 ³	normal
GFF	2 mL/min	2,2 mL/min	normal	6,07	normal	6 x 10 ⁴	normal
AC	1,1 mL/min	1,4 mL/min	normal	6,24	normal	15 x 10 ³	normal
PH	1,01 mL/min	1,2 mL/min	normal	5,79	normal	27 x 10 ⁴	normal
FESP	1,4 mL/min	1,7 mL/min	normal	6,04	normal	5,9 x 10 ⁴	normal
MASP	2 mL/min	1,9 mL/min	normal	5,82	normal	2 x 10 ³	normal
CNP	2 mL/min	2,1 mL/min	normal	6,01	normal	32 x 10 ⁴	normal

Apêndice 3 – Resultados dos exames pré-*in situ* nos voluntários incluídos no estudo (conclusão)

Índice de biofilme (IB) Silness & Løe (1964)/ Índice de sangramento (IS) Løe & Silness (1963)

IB/ IS médio* (soma dos scores médios divididos por 6)		
Sigla	IS médio	IB médio
FACGS	0,70	1,7
TCP	0,66	0,87
MAR	0,45	0,87
JOB	0,45	0,29
RSS	0,62	0,79
GMM	0,62	0,90
GFF	0,70	1,5
AC	0,45	0,29
PH	0,70	1,7
FESP	0,70	0,68
MASP	0,45	0,87
CNP	0,89	1,7

*Valores normais: abaixo de 2,0

Apêndice 4 – Resultados individuais dos ensaios de aderência por material restaurador

Tabela 14 - Resultados da aderência de *S. mutans* no grupo RC-Z (resina composta Z250)

Amostra	Média UFC/mL	Log10
1	2730000	6,44
2	2240000	6,35
3	2180000	6,34
4	2460000	6,39
5	2750000	6,44
6	4960000	6,70
7	2380000	6,38
8	2020000	6,31
9	3950000	6,60
10	1370000	6,14

Tabela 15 - Resultados da aderência de *S. mutans* no grupo RC-F (resina composta modificada por poliácidos Freedom)

Amostra	Média UFC/mL	Log10
1	270000	5,43
2	530000	5,72
3	2990000	6,48
4	1140000	6,06
5	60000	4,78
6	12000	4,08
7	15000	4,18
8	10000	4,00
9	26500	4,42
10	7000	3,85

Tabela 16 - Resultados de aderência de *S. mutans* no grupo CIV-V (ionômero de vidro modificado por resina Vitremer)

Amostra	Média UFC/mL	Log10
1	128000	5,11
2	102000	5,01
3	464000	5,67
4	196000	5,29
5	58000	4,76
6	68000	4,83
7	200000	5,30
8	140000	5,15
9	204000	5,31
10	76000	4,88

Tabela 17 - Resultados de aderência de *S. mutans* no grupo CIV-J (cimento de ionômero de vidro Fuji IX)

Amostra	Média UFC/mL	Log10
1	180000	5,26
2	240000	5,38
3	10320	4,01
4	41000	4,61
5	36000	4,56
6	120000	5,08
7	270000	5,43
8	58000	4,76
9	9680	3,99
10	700000	5,85

Paradella TC. Adherence of *Streptococcus mutans* on restorative materials and its effects on *in vitro* and *in situ* secondary caries evaluated by polarized light microscopy and X-ray diffraction spectroscopy (EDS) [doctorate thesis]. São José dos Campos: São Paulo State University, 2007.

ABSTRACT

The purpose of this study was to different restorative materials under *in vitro* and *in situ* secondary caries-inducing methodologies and the adherence of *S. mutans* to restorative materials. Eighty-four extracted human third molars were restored with different materials (Z250, Freedom, Vitremer and Fuji IX) and divided into: *S. mutans* cariogenic challenge or pH-cycling cariogenic challenge (n=12). For the *in situ* study, removable appliances having enamel specimens restored with each material were used by 12 volunteers for 14 days (day and night). One drop of 20% sucrose solution was dripped on the specimens 8X/day. Control group had restored specimens that were not submitted to any cariogenic challenge. Specimens were submitted to polarized light microscopy, SEM and EDS. For the adherence testing, specimens of each restorative material were immersed in *S. mutans* ATCC 35688 culture in sucrose broth. After 48h (37°C/ 5% CO₂), the countage of colony forming units was performed (log cfu/mL). Results were submitted to Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls or Dunn Comparison statistical analysis and showed differences between *in vitro* and *in situ* methodologies (p<0.05), however no differences were found between *in vitro* methodologies. Enamel adjacent to Fuji IX showed higher calcium concentration and less demineralization, differing from the other materials. Mean adherence values (±standard deviation) were: Z250 6.41 (0.15)a; Freedom 4.90 (0.95)b; Vitremer 5.13 (0.27)b; Fuji IX 4.89 (0.62)b. Different letters indicate significant statistical difference. It was concluded that according to secondary-caries inducing methodology, restorative materials presented different results and fluoridated materials presented less *S. mutans* adherence.

KEY-WORDS: *Streptococcus mutans*; caries, glass-ionomer cements, composite resins, tooth enamel, spectral analysis by X-ray diffraction.