



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

**MARIA LUÍZA AUN DE BARROS LIMA ROCHA CAMPELLO DE
SOUZA**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS E BIOLÓGICAS DE
MATERIAIS RESTAURADORES BIOATIVOS**

2019

MARIA LUÍZA AUN DE BARROS LIMA ROCHA CAMPELLO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS E BIOLÓGICAS DE MATERIAIS
RESTAURADORES BIOATIVOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Dentística. Linha de pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial de alterações da estrutura dental, de materiais e de técnicas de prevenção e tratamento em dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala

Coorientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Campello de Souza, Maria Luíza Aun de Barros Lima Rocha
Avaliação das propriedades físicas e biológicas de materiais restauradores bioativos / Maria Luíza Aun de Barros Lima Rocha Campello de Souza. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
80 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.
Orientador: Maria Filomena Rocha Lima Huhtala
Coorientador: Juliana Campos Junqueira

1. Cárie dental. 2. Streptococcus mutans. 3. Materiais dentários. I. Huhtala, Maria Filomena Rocha Lima, orient. II. Junqueira, Juliana Campos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Tânia Mara da Silva

Instituto Nacional de Ensino Superior e pós-graduação Padre Gervásio (INAPÓS)
Curso de Odontologia
Campus de Pouso Alegre

São José dos Campos, 07 de janeiro de 2019.

DEDICATÓRIA

"Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos."
Provérbios 16:3

Dedico a minha dissertação de mestrado a **Deus**. Faço cumprir a minha parte, citada na passagem descrita inicialmente, acreditando que fazendo assim Deus irá abençoar todos os meus planos. Tenho fé de que Ele me colocou nesse mundo para cumprir um propósito já estabelecido desde o ventre da minha mãe, permaneço fiel aos Seus preceitos descritos mesmo antes de conhece-Lo. Mesmo que o mundo e tudo que nele existe vá contra aos Seus ensinamentos, permanecerei no centro da Sua vontade.

Dedico com todo o amor que há em mim, ao meu marido **Maurício Campello de Souza**, meus pais **Paulo José Lima Rocha** e **Desireé Adma Aun de Barros Lima Rocha**, meus irmãos e meu enteado, que não deixaram de me apoiar, e incentivaram quando me faltavam forças para seguir em frente. Vocês são o alicerce da minha vida !

Dedico ao meu avô **Coronel Euro Barbosa de Barros**, que hoje está sentado em uma mesa redonda lá no céu, tomando aquele café com leite bem quente, comendo alguns pedaços de queijo e conversando com Deus, durante longas horas, sobre as leituras e descobertas feitas durante as longas madrugadas. Provavelmente estará oferecendo uma injeção de insulina de graça para algum anjo. Vô, se eu pudesse voltaria no tempo hoje para desfrutar mais dos momentos da mesa de jantar, para aprender mais com o senhor.

Dedico em especial ao meu futuro filho e aos meus sobrinhos, que um dia quando estiverem grandes possam ver por meio dessa dissertação que devemos batalhar para sermos melhores. Que possam valorizar o tempo de estudo e se dediquem sempre, buscando se desenvolver.

AGRADECIMENTOS

"Os grandes fazem as coisas quando eles nem sempre querem fazer."

Michael Phelps

Agradeço a **Deus** por permitir e me capacitar a realizar um mestrado na Unesp, que por muito tempo achei que não seria capaz. Por me guardar de todo mal, nos 95km diários percorridos.

Ao meu marido que por muitas vezes durante esses dois anos não pode me ter por perto, devido ao tempo em que me dediquei na realização desse mestrado. Obrigada pelo suporte e incentivo que você me deu nesse tempo. Você cuidou de tudo quando eu não pude e não reclamou nenhuma vez se quer. Me acompanhou na maratona de finais de semana dentro do laboratório e nunca me deixou desistir. É por você que eu me dedico, que perco noites de sono se for preciso, que busco me aprimorar estudando e que me inspiro a ser melhor. Você é o amor da minha vida e juntos vamos trilhar e desfrutar de todo esse caminho. Te amo.

Aos meus pais que me fizeram valorizar o estudo e o conhecimento. Que se desdobraram para fornecer o melhor ensino para mim e meus irmãos. Hoje colhemos os frutos juntos, de sementes que os senhores plantaram e cultivaram há anos. O mérito é dos senhores também. Amo vocês.

À minha irmã Isabel, em quem me espelho. Te observo e aprendo tanto com você. Sei que Deus tem um propósito para o que estamos vivendo. Você é uma guerreira. Continuaremos assim, unidas para sempre. Te amo.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

À minha orientadora **Maria Filomena Rocha Lima Huhtala**, que até no nome nós combinamos. Gostaria que a senhora soubesse que as nossas conversas e os seus conselhos foram de grande valia. Obrigada por se dedicar e me orientar durante esses dois anos. Agradeço por ter compartilhado comigo a sua experiência profissional e pessoal. Sinto ter amadurecido durante essa nossa caminhada juntas.

À Profa. Dra. **Tânia Mara da Silva**, por todo apoio e suporte principalmente no primeiro ano de mestrado. Obrigada pela sua amizade e por dividir a sua experiência de pós-graduação comigo. Desejo que essa seja a primeira de inúmeras "bancas" que você fará parte ao longo de sua vida. Que essa "banca" seja tão especial para você quanto está sendo para mim.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Bresciani**, pela disposição em ajudar a qualquer momento e em qualquer circunstância. Você fez "o corredor da pós-graduação" ou esses dois anos de mestrado serem mais leve. Que o sorriso que você leva estampado no seu rosto, a bondade que carrega em seu coração e a disposição em ajudar o próximo, continuem sempre existindo. Sentirei falta das indicações de livros.

Ao Prof. Dr. **Carlos Rocha Gomes Torres** que se prontificou em ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por toda paciência que o senhor teve comigo, mesmo sabendo das minhas limitações. Obrigada por ter me ajudado a pensar e a desenvolver o pensamento crítico. Sua sede por conhecimento me motiva.

À Profa. Dra. **Juliana Campos Junqueira**, que ajudou em uma parte tão complexa do trabalho. Obrigada por todo auxílio e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia e Imunologia para a realização da nossa pesquisa.

À **Maíra Terra Garcia**, pela amizade que temos desde a faculdade e por ter me ajudado em uma parte tão importante deste trabalho. Agradeço pela sua

paciência e dedicação. Foi muito bom ter compartilhado esses momentos com você e ter aprendido uma parte da Odontologia que pouco tem coragem de encarar.

Ao Prof. Dr. Walter Miyakawa, pela ajuda com o Microscópio de Força Atômica do Instituto Tecnológico de Aeronáutica, e pelo conhecimento que você pode propagar durante as longas horas de leituras das amostras.

À Professora Márcia Carneiro Valera, por entender a necessidade que tínhamos e contribuir doando todos os materiais que foram necessários para a realização do teste microbiológico.

À Thaís Cachutê Paradella, por me receber todas as mil vezes em que fui tirar alguma dúvida sobre a metodologia e pela imensa disposição em ajudar com boa vontade.

Aos meus professores do Departamento de Odontologia Restauradora – Dentística, por todo conhecimento de puderam transmitir durante esses dois anos. Vejo em todos vocês o desejo de ensinar.

À minha turma de mestrado, Ana Paula, Adriele, Fabrícia, Erika, Danilo, Fernanda, Mateus, Carlos Ariel e Thaís, por termos compartilhado tantos momentos e sufocos. Agradeço pelo suporte e amizade de todos vocês. E as minhas amigas Débora, Lucélia e Stephany por todas conversas e desabafos. Foi Deus que nos aproximou e vocês três sabem do valor da nossa amizade. Obrigada pelo companheirismo!

Às funcionárias do Departamento de Odontologia Restauradora, Josi e Fernanda.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que contribuíram na execução desse trabalho.

"If you don't quit you win"

(Heidi Baker)

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Adesão bacteriana a materiais restauradores	18
2.2 Microdureza do esmalte adjacente a restauração após ciclos de des/remineralização	28
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Delineamento experimental	43
4.2 Aspectos éticos	44
4.3 Materiais empregados.....	44
4.4 Adesão bacteriana aos materiais restauradores	46
4.4.1 Ativação da cepa padrão de <i>S. mutans</i>	46
4.4.2 Adesão bacteriana aos materiais restauradores	46
4.4.3 Formação dos biofilmes de <i>S. mutans</i> sobre os espécimes	47
4.4.4 Microscopia de força atômica	49
4.5 Avaliação da microdureza do esmalte adjacente às restaurações	50
4.5.1 Preparo dos espécimes	50
4.5.2 Preparo cavitário e procedimento restaurador	51
4.5.3 Confecção das restaurações.....	52
4.5.4 Análise de microdureza Knoop (KHN)	55
4.5.5 Desafio Cariogênico	56
4.5.6 Microdureza final	57
4.6 Análise estatística	58
5 RESULTADOS.....	59
6 DISCUSSÃO	67
REFERÊNCIAS*	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Materiais utilizados.....	44
Figura 2 – Confecção dos espécimes.....	47
Figura 3 – Adesão do <i>Streptococcus mutans</i> sobre os espécimes.....	49
Figura 4 – Confecção dos espécimes de dente bovino.....	51
Figura 5 – Confecção da restauração.....	54
Figura 6 – Delimitação da área das leituras.....	55
Figura 7 – Microdurômetro.....	56
Figura 8 - Dados de UFC/mL obtidos no teste de adesão bacteriana.....	60
Figura 9 - Visualizações bidimensionais de <i>Streptococcus mutans</i> , obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 µm x 5 µm, no material Filtek Bulk.....	61
Figura 10 - Visualizações bidimensionais de <i>Streptococcus mutans</i> , obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 µm x 5 µm, no material Cention N.....	62
Figura 11 - Visualizações bidimensionais de <i>Streptococcus mutans</i> , obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 µm x 5 µm, no material Activa Bioactive.....	62

Figura 12 - Visualizações bidimensionais de *Streptococcus mutans*, obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 µm x 5 µm, no material Beaufil Bulk.....63

Figura 13 - Visualizações bidimensionais da superfície, obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 µm x 5 µm, no material Equia Forte.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apresenta os resultados da ANOVA.....	59
Tabela 2 – Resultados do teste de Tukey para adesão bacteriana.....	60
Tabela 3 – Valores de média $\pm$ desvio padrão do comprimento das células após o crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> e resultados do teste de Tukey.....	64
Tabela 4 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da largura das células após o crescimento de <i>Streptococcus mutans</i> e resultados do teste de Tukey.....	64
Tabela 5 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da microdureza de superfície (KHN) inicial e resultados do teste de Tukey.....	65
Tabela 6 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da microdureza de superfície (KHN) após o tratamento e resultados do teste de Tukey.....	66

Souza MLABLRC. Avaliação das propriedades físicas e biológicas de materiais restauradores bioativos [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Materiais restauradores denominados bioativos se propõem a auxiliar no equilíbrio biodinâmico entre os dentes e a saliva. O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar quatro desses materiais quanto à: adesão bacteriana e microdureza do esmalte adjacente a restaurações realizadas com esses materiais quando submetidos ao desafio cariogênico. Para a adesão bacteriana foram confeccionados 10 espécimes padronizados de cada material restaurador que foram expostos em uma cepa padrão de *Streptococcus mutans* (UA 159). Depois da incubação foi determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Para a avaliação da microdureza foram utilizados 91 incisivos bovinos distribuídos em 7 grupos (n=13): 2 grupos controle; ES, esmalte hígido sem ciclagem de pH e EC, esmalte com ciclagem de pH e 5 grupos com preparos padronizados de classe V na superfície do esmalte vestibular, restaurados com dos materiais selecionados: AB, ActivaBioactive (Pulpdent); BB, Beautifil Bulk (Shofu); CN, Cention N (Ivoclar Vivadent); EF, Equia Forte (GC) e FB, Filtek Bulk Fill (3M ESPE). A microdureza das superfícies do esmalte foi medida em um microdurômetro acoplado a um software para análise de imagem. Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey (5%). Para a adesão bacteriana os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre a resina composta convencional Filtek Bulk ($10,58 \pm 0,04$) e os materiais bioativos Activa Bioactive ($10,19 \pm 0,08$) e Cention N ($10,16 \pm 0,12$). No entanto, pôde ser observado que esses materiais apresentaram diferença significativa com relação aos materiais Beautifil Bulk ($9,66 \pm 0,09$) e Equia Forte ($7,75 \pm 1,27$); que apresentou a menor adesão bacteriana. A análise dos dados de microdureza mostrou diferença entre tratamento e tempo ($p < 0,001$) e na interação entre esses dois fatores. Os grupos: esmalte ciclado ($77,89 \pm 45,19$) e resina composta Filtek Bulk ($121,32 \pm 43,53$) apresentaram os menores valores de microdureza, seguido do grupo Beautifil Bulk ($155,33 \pm 57,35$), diferindo significativamente dos demais grupos. Os resultados permitiram concluir que os materiais bioativos apresentaram interferência na adesão bacteriana, com a menor adesão proporcionada pelo cimento de ionômero de vidro; e também que, materiais que apresentam em sua composição íons que interagem com a estrutura dental melhoram a microdureza do esmalte adjacente às restaurações.

Palavras-chave: Cárie dental. *Streptococcus mutans*. Materiais dentários.

Souza MLABLR. *Bioactive restorative materials: physical and biological evaluation [dissertation]*. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

*Bioactive restorative materials are intended to aid the biodynamic balance between teeth and saliva. The objective of this study was to evaluate four of these materials for bacterial adhesion and microhardness of the enamel adjacent to restorations with them, when submitted to cariogenic challenge. For bacterial adhesion, 10 standardized specimens of each restorative material were prepared and exposed in a standard strain of *Streptococcus mutans* (UA 159). After incubation, the number of colony forming units (CFU / mL) was determined. To evaluate the microhardness, 91 bovine incisors were distributed in 7 groups (n = 13): 2 control groups; ES, enamel without pH cycling and EC, enamel with pH cycling and 5 groups that received standardized class V preparations on the buccal enamel surface restored with one of the selected materials: AB, ActivaBioactive (Pulpdent); BB, Beautifil Bulk (Shofu); CN, Cention N (Ivoclar Vivadent); EF, Equia Forte (GC) and, FB, Filtek Bulk Fill (3M ESPE). Enamel surfaces microhardness was measured in a microdurometer coupled to software for image analysis. The results were submitted to ANOVA and Tukey tests (5%). For bacterial adhesion the results showed that there was no statistical difference between the composite resin Filtek Bulk ($10,58 \pm 0,04$) and the bioactive materials, Activa Bioactive ($10,19 \pm 0,08$) and Cention N ($10,16 \pm 0,12$). However, it was observed that these materials presented significant difference in relation to Beautifil Bulk ($9,66 \pm 0,09$) and Equia Forte ($7,75 \pm 1,27$); which presented the lowest bacterial adhesion. The analysis of microhardness data showed a difference between treatment and time ($p < 0.001$) and in the interaction of these two factors. The groups: pH cycled enamel ($77,89 \pm 45,19$) and Filtek Bulk resin ($121,32 \pm 43,53$) presented the lowest microhardness values, followed by the Beautifil Bulk group ($155,33 \pm 57,35$), differing significantly from the other groups. The results allowed to conclude that the bioactive materials interfered in the bacterial adhesion, with the lower adhesion provided by the glass ionomer cement; and also that, materials with ions that interact with the dental structure in their composition improve the microhardness of the enamel adjacent to the restorations.*

Keywords: Dental caries. Streptococcus mutans. Dental materials.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral humana é colonizada por uma comunidade de bactérias altamente diversificada (Vahabi et al., 2011). Algumas dessas bactérias têm sido implicadas na lesão de cárie, uma das doenças crônicas mais prevalentes nos seres humanos (Azevedo et al., 2011). A cárie dentária pode ser definida como a perda mineral localizada dos tecidos dentais (desmineralização) em consequência de subprodutos da fermentação bacteriana dos carboidratos da dieta.

O biofilme dentário consiste no acúmulo de uma variedade de microrganismos sobre os elementos dentários. Em condições normais, a composição microbiana do biofilme se apresenta estável; no entanto, esta homeostasia pode ser quebrada, ocasionando um desequilíbrio na composição dos microrganismos e predispondo a área à instalação de um estado de doença (Baratieri et al., 2015; Aas et al., 2005). A lesão de cárie ocorre através de uma dissolução química da estrutura dentária que é causada pelos eventos metabólicos que ocorrem no biofilme que cobre a área afetada (Clarke, 1924). É o resultado da mudança na ecologia e atividade metabólica do biofilme com a liberação de ácidos, estabelecendo um desequilíbrio entre o conteúdo mineral do dente e a cavidade bucal, gerando assim processos de desmineralização. A desmineralização pode afetar o esmalte, dentina e cemento (Kidd, Fejerskov, 2015). O resultado da desmineralização do esmalte consiste na alteração de suas propriedades dentre elas, a dureza (Zanet et al., 2011).

A superfície do esmalte apresenta um comportamento dinâmico com o meio bucal. Quando o pH bucal se mantiver maior que 5,5, a composição da saliva em cálcio e fosfato estará supersaturada em relação à solubilidade da hidroxiapatita. A tendência físico-química do dente é ganhar cálcio e fosfato do meio bucal. Entretanto, quando o pH se apresenta menor que 5,5, a composição da saliva se torna subsaturada em relação ao produto de solubilidade da hidroxiapatita, levando o dente a perder cálcio e fosfato para o meio bucal até atingir um novo estado de homeostasia; ocorrendo nessa situação a dissolução do esmalte; desmineralização (Jorge et al., 2007).

Diversos microrganismo podem ocasionar a lesão de cárie: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus sanguis*,

Streptococcus mutans, dentre outros. Existem 400 a 500 tipos de microrganismos que vivem em equilíbrio na cavidade oral. O *Streptococcus mutans* está associado com o início e a progressão da lesão de cárie, e pode constituir 70% das bactérias encontradas no biofilme dental (Jenkinson, 1994; Andrade et al., 2011; Soria Lozano et al., 2015).

Esse processo de formação de uma lesão inicial de cárie pode ocorrer tanto em esmalte hígido, quanto no esmalte adjacente em dentes com restaurações, como nas de resina composta. Um motivo pelo qual as restaurações necessitam ser substituídas é pelo fato de ocorrer a recorrência de cáries nas proximidades da restauração, na margem com a estrutura do dente (Hals, Nernaes, 1971; Silva, Maltz, 2004; Aponso et al., 2018). Por isso, a interação do material restaurador com o esmalte adjacente à restauração é de grande importância, uma vez que, a microinfiltração pode estar associada à lesão de cárie recorrente e a consequente falha na longevidade de uma restauração (Matos et al., 2008).

A introdução de materiais restauradores resinosos foi um dos maiores avanços da odontologia restauradora (Jandt, Sigusch, 2009). O principal objetivo dos materiais resinosos é restabelecer a estrutura e a função perdidas do dente. Têm como vantagem adicional a mimerização estética dos dentes por sua semelhança com a estrutura dental; passando assim a ser atualmente o material de eleição nas restaurações diretas de dentes. Porém, as resinas compostas apresentam com o passar do tempo alterações na interface com o substrato dental, possibilitando o aparecimento de lesões de cárie adjacentes à restauração (Ferracane, 2008).

É um desafio da ciência e da tecnologia moderna fornecer mecanismos capazes de melhorar a qualidade das restaurações e consequentemente de vida da população. Assim, alguns materiais restauradores denominados bioativos foram disponibilizados no mercado odontológico.

Na exposição da cavidade bucal aos constantes ciclos de pH; do qual, participam ativamente a saliva e a estrutura dental, em um ciclo contínuo de troca mineral, o decréscimo de pH leva ao processo de desmineralização. Nesse processo há a liberação de íons cálcio e fosfato da superfície dental, que com a elevação do pH ficam disponíveis para interagirem com o flúor presente na própria saliva. Os materiais bioativos interagem de forma semelhante a essa troca iônica biodinâmica. Eles possuem a capacidade de continuamente recarregar e liberar seus componentes

iônicos. São materiais que se apresentaram como estéticos e duradouros, oferecendo uma alternativa aos compósitos tradicionais; passivos e sem potencial bioativo; e, aos ionômeros de vidro; que apesar de liberarem uma quantidade significativa de flúor, apresentam baixa resolução estética e indesejáveis propriedades físicas (Bayrak et al., 2010; McCabe et al., 2011).

Uma característica importante desses materiais referidos como de “comportamento inteligente” é de retornarem ao estado inicial depois que tais estímulos são removidos, auxiliando no equilíbrio biodinâmico dos dentes e da saliva e contribuindo para a manutenção da saúde bucal (McCabe et al., 2011).

Em um único material é possível a substituição do tecido dental perdido e a interação com as superfícies dentárias adjacente à restauração. Alguns desses materiais se propõem a diminuir a adesão bacteriana, enquanto que outros, a proteger o esmalte circundante dos efeitos da desmineralização promovida pela queda do pH. Com isso é possível uma proteção da interface restauradora. Um material bioativo ideal seria o que promovesse a formação do mineral hidroxiapatita e trouxesse benefícios como: a remineralização da estrutura dental adjacente, o selamento de fendas entre a restauração e o dente, e a melhora da durabilidade da resistência de união dente/restauração, através da diminuição da degradação da mesma. (Anusavice et al., 2013).

Estudos mostraram que alguns materiais denominados bioativos têm, de fato, capacidade de melhorar algumas propriedades do dente; provavelmente devido a troca iônica que ocorre entre o material utilizado e a superfície do dente (Pin et al., 2005; Perondi et al., 2014; Salas et al., 2011), além da eficácia da ação do flúor presente nesses materiais, capaz de induzir uma menor adesão bacteriana e uma menor incidência de cárie recorrente (Paradella et al., 2008; Kimyai 2011; Naoum et al., 2011).

Estão disponíveis para uso clínico, materiais restauradores com propriedades antimicrobianas e com capacidade de absorver e liberar íons de cálcio, fosfato e flúor, mas ainda não há relatos conclusivos na literatura científica sobre a ação desses novos materiais bioativos com relação à adesão bacteriana à superfície dos mesmos e a sua interação com o esmalte adjacente às restaurações.

Portanto, este estudo teve como principal objetivo analisar quatro materiais restauradores bioativos com diferentes composições químicas, comparando-os com

uma resina composta convencional, com relação à adesão bacteriana e ao potencial de proteção do esmalte adjacente às restaurações realizadas com os mesmos, após serem submetidos a desafio cariogênico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A elaboração desta revisão de literatura tem por objetivo abordar algumas pesquisas que precederam este estudo e facilitar o entendimento dos assuntos abordados. Para melhor entendimento do leitor, a revisão da literatura foi dividida em dois tópicos: adesão bacteriana, onde foram abordados estudos sobre adesão bacteriana a materiais restauradores; e, microdureza do esmalte adjacente a restaurações, no qual foram apresentados estudos relacionando com a microdureza do esmalte e processos de des e remineralização.

2.1 Adesão bacteriana a materiais restauradores

Palenik et al. (1992) observaram os efeitos *in vitro* dos cimentos de ionômero de vidro sobre o crescimento e a capacidade de formação de placa bacteriana. Espécimes de 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura foram confeccionados dos seguintes materiais: Fuji Cap II, Ketac Fil, Ketac Silver, Fuki Miracle-Mix, Vitrabond e XR-Glass Ionomer. Cinco bactérias envolvidas na formação de cárie foram obtidas: *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus sanguis*. Os estudos de inibição do crescimento foram realizados pelo espalhamento de 0,1 ml de inóculo padronizado sobre placas de ágar com meio seletivo, seguido da aplicação direta de discos de ionômero de vidro sobre o ágar. Em outras placas, os discos foram colocados em ágar não inoculada por 48 h, seguido de inoculação bacteriana. Todas as placas de ágar foram incubadas sob condições ideais de crescimento para cada espécie bacteriana. Os materiais restauradores também foram inseridos em incisivos bovinos esterilizados, colocados em meios contendo sacarose e inoculados com *S. mutans*, durante três dias. Um eletrodo de troca iônica foi usado para mensurar a liberação de flúor durante um período de sete dias, para todos os ionômeros de vidro. Com relação ao crescimento bacteriano, o material Miracle Mix exibiu a maior capacidade antibacteriana, produzindo as maiores zonas inibitórias em quatro das bactérias, após 48-72 h de exposição. Fuji Cap II, XR-Ionomer e Vitrabond exibiram habilidades inibitórias

semelhantes para todas as bactérias, porém para *S. sanguis* os materiais, Ketac Fil e Ketac Silver, demonstraram a menor inibição. O XR-Ionomer apresentou a liberação de íons mais rápida e produziu a maior quantidade de flúor. Ketac-Silver exibiu a menor quantidade de flúor. Os quatro materiais restauradores (Fuji Cap II, Ketac Fil, Ketac Silver e Fuji Miracle Mix), inibiram a aderência por *S. mutans* nos incisivos bovinos. Concluíram que os ionômeros de vidro testados demonstraram efeito inibitório no crescimento e adesão de bactérias orais. A inibição do crescimento bacteriano estaria relacionada com as quantidades de íons fluoretos liberados.

Pedrini et al. (2001), avaliaram, *in situ*, a retenção microbiana em cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificados por resina. Dois cimentos de ionômero de vidro convencionais, Chelon Fil (Espe GmbH, Alemanha) e Vidrion R (SS White, Brasil), e dois cimentos de ionômero de vidro modificados por resinas, Vitremer (3M Dental Products, Brasil) e Fuji II LC (GC, Japão), foram estudados. A resina composta Z100 (3M Dental Products, Brasil) foi utilizada como controle. Os espécimes foram preparados de acordo com as instruções de cada fabricante. Os materiais foram colocados em cavidades de 5 mm de diâmetro e 1 mm de profundidades, na superfície externa do palato de aparelhos Hawley. Doze espécimes foram preparados com cada material. Os espécimes de ionômero de vidro foram cobertos com a resina de colagem fotopolimerizável Probond (Dentsply, Brasil) e armazenados a 100% de umidade relativa após o preparo, a fim de evitar alterações superficiais. Após 24 h, todos os espécimes foram polidos. Utilizou-se uma rede de acrílico para cobrir os espécimes, de modo a evitar a autolimpeza produzida pelos movimentos da língua, simulando assim as condições das áreas interproximais e cervicais dos dentes. Doze voluntários entre 17 e 23 anos participaram deste estudo. Todos os alunos receberam instruções de higiene bucal antes do ensaio experimental. Os voluntários utilizaram os aparelhos Hawley por 7 dias. Durante o período experimental, os voluntários foram autorizados a escovar os dentes com os aparelhos Hawley retirados da boca, mas não foram autorizados a usar um creme dental ou qualquer composto químico com flúor ou outra substância com propriedades antimicrobianas. Durante as refeições, os aparelhos foram armazenados a 100 % de umidade. Os espécimes foram então removidos dos aparelhos e transferidos para tubos contendo 2,0 ml de Ringer-PRAS. Os microrganismos das amostras foram inoculados em ágar sangue e ágar Mitrissalivíce Bacitracina e incubados sob anaerobiose (90 % N₂, 10 % CO₂), a 37 °C, por 10 e 2

dias, respectivamente. A identificação dos *Streptococcus mutans* foi realizada através da análise da morfologia das células e colônias. As diferenças nos níveis de *Streptococcus mutans* no número total de células bacterianas viáveis no cimento de ionômero de vidro convencional, cimento de ionômero de vidro modificado por resina e resina composta, foram determinadas através do teste de Kruskal-Wallis. Puderam concluir que os cimentos de ionômero de vidro convencionais (Vidrion R (271,15) e Chelon-Fil (157,52), reteram um número maior de microrganismos do que a resina híbrida (Z100 (51,54)). Os níveis de microrganismos retidos na superfície de ionômeros de vidro modificados por resina (Vitremmer (69,83) e Fuji II LC (80,05)) foram semelhantes aos observados em amostras de resina composta (Z100). Os ionômeros de vidro modificados por resina (Vitremmer (1,81) e Fuji II LC (2,40)) retiveram menos *Streptococcus mutans* do que a resina (Z100 (16,62)) e os cimentos de ionômero de vidro convencionais (Vidrion R (6)) e Chelon-Fil (5,01)).

Montanaro et al. (2004) investigaram a adesão de *Streptococcus mutans* na superfície de diferentes materiais restauradores. Dez materiais restauradores foram selecionados para o estudo: Z250 (3M, St. Paul, MN, USA); Clearfil APX (Kuraray, Osaka, Japan); Solitaire 2 (Heraeus Kulzer, Dormagen, Germany); Tetric Flow (Ivoclar AG, Liechtenstein); Arabesk Flow (Voco, Cuxhaven, Germany); Filtek Flow (3M, St. Paul, MN, USA); Admira (Voco, Cuxhaven, Germany); F2000 (3M, St. Paul, MN, USA); Fuji IX (GC Corporation, Tokyo, Japan); Fuji IX fast (GC Corporation, Tokyo, Japan). Amostras cilíndricas de 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, foram confeccionadas. As amostras foram esterilizadas em autoclave antes de serem testadas com bactérias. Os materiais foram expostos a uma suspensão bacteriana. Após 4 h as células aderidas foram removidas para quantificação. Este tempo de exposição foi escolhido porque a formação completa de biofilme na cavidade oral normalmente ocorre em 2 a 4 h. Discos de poliestireno com a superfície trata com adesivo de 6 mm de diâmetro formaram o grupo controle. Os testes foram realizados em placas de 24 poços. Cada amostra foi colocada no fundo de um poço e exposta a uma suspensão bacteriana padrão. Dois ml de caldo fresco e 20 µl de suspensão de células foram adicionados a cada poço. Após incubação a 37 °C durante 4 h, os materiais foram lavados três vezes com 5 ml de uma solução estéril de NaCl a 0,9 %, de modo a remover as células fracamente aderidas. Cada disco foi colocado em um tubo de vidro contendo 1 ml de solução salina. Os tubos foram colocados em um

limpador ultrassônico (Branson DTH 2210) operando a 47 kHz, 234 W, e sonicados por 6 minutos, a fim de separar bactérias aderentes às superfícies dos materiais, trazendo-os em suspensão. Os discos foram removidos e 10 ml de caldo fresco foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 24 h. Após a incubação, a concentração de bactérias no caldo foi finalmente medida por um Turbidimeter 2100AN (HACH, Loveland, EUA). Com exceção do Admira e do Fuji IX fast, todos os materiais restauradores testados exibiram valores de adesão bacteriana, que não diferiram significativamente em relação aos encontrados para o controle de poliestireno. Admira e Fuji IX fast foram os dois materiais que apresentaram maior aderência bacteriana em relação ao controle. Baseando-se simplesmente na aderência média de todos os materiais de teste pertencentes ao mesmo grupo, as diferentes classes de materiais podem ser classificadas do menos ao mais adesivo como segue: compósitos fluidos, compósitos microhíbridos, ionômeros de vidro modificados por resina, o compômero F2000 e por último o ormocer. Compósitos fluidos exibiram consistentemente a menor suscetibilidade à adesão bacteriana. Mais suscetível que outros materiais à aderência microbiana, o material Admira exibiu um aumento na adesão bacteriana a mais de 67 % do que o controle, resultando significativamente mais adesivo ($p < 0,0001$). No caso do ionômero de vidro Fuji IX, o aumento foi moderado (34 %), embora ainda significativo ($p < 0,005$). O estudo demonstrou que, em estágio inicial e na ausência de proteínas fisiológicas, vários materiais induziram uma alta taxa de adesão bacteriana, comparável ou até maior do que o controle de poliestireno. Alguns materiais, como resinas fluidas, apresentaram uma adesividade relativamente baixa. Concluíram que a adesão de *S. mutans* em superfícies de materiais restauradores pode ocorrer na ausência de proteínas salivares e em um curto período de 4 h. As células bacterianas não necessitam de proteínas salivares para se ligarem às superfícies dos materiais.

Shashibhushan et al. (2008) avaliaram a atividade antibacteriana com cepas de *Streptococcus mutans* de três cimentos de ionômero de vidro comercialmente disponíveis, que liberam zinco e flúor. Os cimentos utilizados foram: Fuji II Convencional, Fuji II Light Cure e Fuji IX (GC Corporation, Tóquio, Japão). Os espécimes foram preparados usando um molde de acrílico contendo seis orifícios medindo 6 mm de diâmetro por 2 mm de altura e três orifícios medindo 3 mm de diâmetro e 2 mm de altura. O efeito antibacteriano dos cimentos de ionômero de vidro

em placas de ágar, foi estimado por *Streptococcus mutans* de crescimentos anaeróbico em meio seletivo por inoculação de saliva humana. Após obtido o crescimento, eles foram reinoculados em placas de ágar e os discos de ionômero foram colocados em áreas específicas. As placas de ágar foram incubadas num frasco anaeróbico. A zona de inibição foi registrada em milímetros usando uma lupa e uma escala de medição. A atividade antibacteriana foi determinada medindo o tamanho da zona de inibição do crescimento na placa de ágar. Para medir a liberação de flúor e zinco de cada cimento, sete discos medindo 6 x 2 mm e um discos de 3 x 2 mm de cada cimento foram confeccionados e colocados em um frasco contendo 30 ml de água destilada deionizada, e os frascos foram incubados a 37 °C durante 8 dias. Na manhã de cada dia, os espécimes eram lavados com água destilada e secos, antes de serem transferidos para um novo frasco contendo 30 ml de água destilada. O procedimento foi continuado até o oitavo dia e a liberação de flúor e zinco foi medida diariamente. A medição foi realizada utilizando um eletrodo específico de flúor (9609 Orion Research Inc, Boston, MI, EUA), e a liberação de zinco foi medida utilizando um espectrofotômetro (1800 Hitachi Model, Jap). O cimento Fuji II Light Cure exibiu a maior quantidade de atividade antibacteriana, produzindo as maiores zonas inibitórias. Estas zonas inibitórias para *Streptococcus mutans* variaram de 6 – 7.6 mm, com uma média de $6,87 \pm 0,81$ mm, após 48 h de exposição. Fuji II Convencional exibiu capacidade inibitória semelhante, variando de 2 - 3 mm com uma média de $2,30 \pm 0,58$ mm. A menor inibição de crescimento foi observada no caso de Fuji IX; a zona inibitória variou de 1,5, com média de $1,23 \pm 0,25$ mm. A máxima liberação de flúor foi observada no primeiro dia, para os três cimentos, reduzindo drasticamente no segundo dia. No sétimo e oitavo dia a liberação de flúor foi quase constante. Fuji II Light Cure apresentou a maior liberação de flúor. A menor quantidade de flúor foi liberada pelo Fuji IX. A liberação de zinco foi maior no primeiro dia para todos os cimentos. Fuji IX apresentou a maior quantidade de liberação de zinco. A menor quantidade foi observada no Fuji II Convencional. O maior grau de atividade antibacteriana foi exibido por Fuji II Light Cure. A atividade antibacteriana dos cimentos aparentou estar diretamente relacionada à quantidade de liberação de flúor. Concluíram que fluoreto e zinco foram liberados por todos os três cimentos em concentrações variadas. Existe uma correlação direta entre a liberação de flúor e a

atividade antibacteriana. Nenhuma correlação foi encontrada entre a liberação de zinco e atividade antibacteriana.

Paradella (2008) avaliou diferentes materiais restauradores após indução de cárie secundária *in vitro*, *in situ* e aderência de *Streptococcus mutans* sobre estes materiais. Oitenta e quatro molares humanos foram restaurados com diferentes materiais: Filtek Z250, Freedom, Vitremer e Fuji IX e subdivididos em: desafio cariogênico com *Streptococcus mutans* ou ciclagem de pH (n=12). Para a adesão bacteriana, os espécimes dos materiais foram imersos em cultura de *Streptococcus mutans* ATCC 35688 em caldo de sacarose. Após 48 h, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (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*, entretanto não apresentaram diferenças entre as metodologias *in vitro*. Em relação ao teste Kruskal-Wallis, seguido da Comparação de Dunn, em nível de significância de 5 %, houveram diferenças entre os grupos RC-Z e RC-F, bem como entre os grupos RC-Z e CIV-V e RC-Z e CIV-J. Concluiu 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 esses estatisticamente iguais. 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*. Os valores médios de aderência ($\pm$ 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. Conforme a metodologia de desafio cariogênico, os materiais restauradores apresentaram diferentes resultados e os materiais fluoretados apresentaram menor aderência de *S. mutans*.

Kimyai et al. (2011) avaliaram o efeito de dois métodos de profilaxia na aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de resina composta e giomer. Duas hipóteses nulas foram testadas: diferentes métodos de profilaxia não afetam a aderência de *S. mutans* à superfície da resina composta e giomer; e o *S. mutans* adere às superfícies do giomer e da resina composta de maneira semelhante. Sessenta amostras foram confeccionadas com um diâmetro de 6 mm e 2 mm de altura, de cada material: resina composta (HelioProgress) e um giomer (Beautifil II). Para cada

material, os espécimes foram divididos em três grupos (n=20). Grupo 1: sem tratamento profilático (controle); Grupo 2: profilaxia com pedra-pomes e taça de borracha; Grupo 3: profilaxia com aparelho de polimentos ar-pó (DAP). As superfícies dos espécimes foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura e a topografia de superfície formada pelos dois métodos de profilaxia foi determinada por microscopia de força atômica. Os espécimes foram imersos na suspensão bacteriana por 4 h. Em seguida, foram retirados da suspensão e lavados três vezes com 5 ml de solução salina para eliminar bactérias não aderidas. Cada espécime foi colocado em um tubo de 15 ml contendo 1 ml de solução salina normal. Os tubos foram transferidos para um limpador de banho ultrassônico, e sonicados por 6 min para soltar as bactérias que aderiram às superfícies dos espécimes. Os espécimes foram removidos dos tubos e 100 µL da suspensão contendo bactérias foi colocado em uma placa estéril para contagem bacteriana. Os resultados da aderência de *S. mutans* demonstraram que o grupo giomer apresentou uma adesão bacteriana significativamente menor que os grupos de resina composta. Em ambos materiais foi observada maior aderência bacteriana quando utilizada a profilaxia com DAP, em seguida a pedra-pomes e taça de borracha e por último o grupo controle. Imagens do microscópio de força atômica revelaram que os espécimes dos grupos controle apresentaram superfícies lisas, enquanto os espécimes dos outros grupos apresentaram superfícies ásperas com macro e micro irregularidades. Os resultados do teste de rugosidade não revelaram diferenças significativas na rugosidade superficial em relação ao tipo de material, no entanto, houve diferenças significativas na rugosidade em relação ao método de profilaxia utilizado, independentemente do tipo de material. Com base nos resultados, os autores concluíram que a reduzida adesão bacteriana no grupo giomer foi devido à propriedade de liberação de flúor presente nesse material. Ambos os métodos de profilaxia resultaram em um aumento na adesão bacteriana.

Jalalian et al. (2015) avaliaram o nível de adesão de *S. mutans* ao ionômero de vidro (GC América Inc., Alsip, ILL, EUA), BisCem Cement (Bisco Inc., Schaumburg, IL, EUA) e ao esmalte dental. Foram preparados 10 blocos com 2 mm de diâmetro e 5 mm de altura, sendo cinco blocos de ionômero de vidro, e cinco blocos de cimento BisCem. Dois blocos de esmalte foram removidos de pré-molares usando disco diamantado. Os blocos de esmalte foram retirados de dois pré-molares que não

apresentavam cáries, restaurações ou manchamentos. Todos os espécimes foram lavados com água destilada e esterilizados em autoclave. Em seguida, foram expostos à suspensão bacteriana. Foram despejados em um tubo de ensaio 500 ml de saliva humana. A saliva foi coletada de uma pessoa saudável que não apresentava doença periodontal ou cárie ativa. Os espécimes foram incubados juntamente com um controle para cada grupo (o controle era um bloco de esmalte em 500 ml de solução salina mais 500 ml de saliva humana) a 37°C por 1 h. Após o tempo determinado, os espécimes foram lavados por imersão em solução salina por 20 s, e cada amostra foi agitada durante 1 minuto em uma solução salina fresca. Em seguida, foram coletadas amostras de *swab* de cada um dos espécimes de ionômero de vidro, BisCem e esmalte. Uma quantidade de 0,1 ml da solução salina final foi cultivada em ágar sangue. Todas as placas de cultura foram incubadas a 37 °C durante 48 h. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Tukey. Os níveis médios de adesão bacteriana aos blocos de esmalte, cimento de ionômero de vidro e BisCem foram; 24 ± 2 , $24,2 \pm 2,7$ e $14,8 \pm 1,7$ colônias / mm², respectivamente. O teste post hoc de Tukey revelou que não houve diferença significativa em termos do nível de aderência bacteriana entre o cimento de ionômero de vidro e o esmalte ($P=0,08$), no entanto, houve diferença entre esses dois grupos em relação ao BisCem. Concluíram que dentro das limitações deste estudo, é preferível utilizar o cimento BisCem ao invés do cimento de ionômero de vidro, uma vez que o nível de adesão de *S. mutans* a BisCem é menor que ao ionômero de vidro. Aplicando um cimento com menos afinidade bacteriana, a durabilidade das restaurações aumentaria.

Naik et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos de ionômero em *S. mutans* e *L. acidophilus*. Um teste de difusão em placa de ágar foi utilizado para avaliar o efeito antimicrobiano de três diferentes cimentos de ionômero de vidro (Fuji IX, Ketac Molar e D-tech) em *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*. Trinta placas foram preparadas e divididas em dois grupos. O primeiro grupo foi inoculado com *Streptococcus mutans* e o segundo grupo foi inoculado em *Lactobacillus acidophilus*. Estas placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Zonas de inibição de crescimento bacteriano que se formaram ao redor de cada poço foram registradas em milímetros (mm). As zonas de inibição para Fuji IX, Ketac Molar, e D-tech em *S. mutans* foram encontrados para ser $10,84 \pm 0,22$ milímetros, $10,23 \pm 0,15$ mm e $15,65 \pm 0,31$ mm, respectivamente, enquanto que aqueles para *L.*

acidophilus foram encontrados para $10,43 \pm 0,12$ mm, $10,16 \pm 0,11$ mm e $15,57 \pm 0,13$ mm, respectivamente. Puderam concluir que o cimento D-tech apresentou melhor desempenho em termos da zona de inibição bacteriana contra as duas bactérias teste, do que os outros dois ionômeros de vidro testados.

Gautam et al. (2017) realizaram um estudo com objetivo de comparar e avaliar a degradação de materiais restauradores baseados em resina por *Streptococcus mutans*. Trinta pré-molares foram obtidos, os dentes foram limpos, autoclavados e colocados em solução salina para o estudo. Uma cavidade classe I foi preparada em todas as amostras. As amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos e restaurados usando materiais restauradores de acordo com as instruções do fabricante: Grupo I- compósito convencional – Filtek Z250, Grupo II – resina modificada por cimento de ionômero de vidro – Hybond Resi Glass e Grupo III – Giomer Beautifill II. As amostras de cada grupo foram divididas em dois subgrupos A (experimental) e B (controle). Amostras de IB, IIB e IIIB foram incubadas em frascos estéreis contendo 2 ml de infusão de cérebro e amostras de IA, IIA, IIIA foram incubadas em 2 ml de BHI com 1:10 de diluição de *mutans*, crescido durante a noite em BHI até a contagem de células. As soluções de incubação foram coletadas a cada 48 h de cada grupo e substituída por soluções novas e este procedimento foi repetido durante 30 dias. A solução individual coletada foi centrifugada a 5000 rpm por 20 min para separar as células presentes na solução e, em seguida, a análise para isolamento e quantificação do produto de degradação de Bis HPPP (bis-hidroxi-propoxi-fenil-propano) foi realizada por cromatografia líquida. Puderam observar que a formação de subprodutos de Bis-HPPP também foi observada nos grupos de controle, isto pode ser devido às ligações de éster presentes no monômero de resina que são clivadas e sofrem hidrólise na presença de água. A produção de Bis-HPPP foi significativamente maior no grupo experimental, sugerindo que essa degradação hidrolítica é amplificada ainda mais na presença de *S. mutans*. Concluíram que o *S. mutans* degrada materiais restauradores à base de resina e entre os três materiais restauradores baseados em resina, o cimento de ionômero de vidro modificado por resina parece ser mais bioestável. Evidenciando a necessidade dos materiais restauradores apresentarem bio-estabilidade, como principal preocupação.

Poggio et al. (2018) realizaram uma pesquisa com intuito de avaliar e comparar a adesão bacteriana em cinco materiais restauradores estéticos (Filtek

Supreme XTE; Ceram X Universal; Essentia; Admira Fusion; Estelite), cinco cimentos de ionômeros de vidro (ChemFil Rock; Equia Forte Fil; IonoStar Plus; Equia Forte Fil + Equia Forte Coat; IonoStar Plus + Easy Glaze), após exposição ácida. A hipótese de nulidade do estudo foi a de que não existiria diferença significativa nos valores de adesão bacteriana entre os diferentes materiais restauradores após a exposição à bebida ácida. Cada material foi representado por 30 espécimes. Os 30 espécimes de cada material restaurador foram aleatoriamente atribuídos a três grupos (n=10): Grupo 1 foram utilizados como controle, Grupo 2 foram imersos em 50 ml em Coca Cola por 1 dia, e Grupo 3 foram imersos em 50 ml de Coca Cola por 7 dias. Após extensa lavagem de cada material, 100 µL de cultura contendo *Streptococcus mutans* foram semeados em cada amostra colocada no fundo de uma placa de 24 poços e incubados a 37 °C por 4 h. As amostras com as células bacterianas foram dispersas em 1 ml de solução de Ringer por vortex durante 3 minutos. Diluições seriadas das suspensões de células bacterianas foram preparadas e 0,1 µL de cada diluição foram depositados em placas de ágar BHI. As placas foram incubadas por 24 - 48 h a 37 °C e o número de colônias foram contadas. Os resultados do estudo sugerem que a morfologia da superfície e a rugosidade dos materiais restauradores são críticos para a adesão bacteriana e uma correlação pode ser estabelecida. No Grupo 1, diferenças entre os materiais foram registradas. Os valores mais altos foram registrados para o cimento de ionômero de vidro que parecem ser mais ásperos que os compostos. O uso de revestimento reduz os valores de aderência no grupo controle, mas a ação dos ácidos altera sua superfície muito rapidamente, elevando os valores de adesão à quantidade de outros materiais nos Grupos 2 e 3. Todos os materiais demonstraram um aumento estatisticamente significativo. Em termos de adesão bacteriana após a exposição à bebida ácida, que na maioria dos casos aumenta com a exposição ao fator prejudicial. Dentro dos limites do estudo *in vitro*, a adesão bacteriana parece estar relacionada à erosão de materiais restauradores causados por ácidos.

2.2 Microdureza do esmalte adjacente a restauração após ciclos de des/remineralização

Ten Cate (1990) revisou na literatura o papel do flúor na remineralização e desmineralização. O termo remineralização era utilizado para descrever a reparação completa de uma região desmineralizada do dente. Afirmou que a remineralização ocorre não só durante o período em que o pH se apresenta neutro, quando os minerais precipitam dos fluidos orais nos defeitos do esmalte, mas também durante o desenvolvimento da lesão de cárie. *In vivo*, as condições de remineralização são menos favoráveis devido à composição química dos fluidos orais, ou seja, a relação entre cálcio e fosfato diferente da apatita, a presença de inibidores de precipitação, o teor relativamente alto de carbonato e o pequeno volume de líquido de remineralização disponível durante a noite. Verificou que o flúor acelera as taxas iniciais de acúmulo mineral das lesões de cárie. Verificou que o flúor é altamente efetivo na mudança do equilíbrio mineral para uma condição menos cariogênica, e isso pode ser devido a um aperfeiçoamento da remineralização ou a uma inibição da desmineralização. Em alguns estudos, a diminuição da perda mineral foi referida ao aumento da remineralização, enquanto que isso poderia igualmente ser ocasionado por uma inibição da desmineralização. Concluiu que a cárie pode ser inibida pelo fornecimento frequente de flúor que interage direta ou indiretamente com componentes da desmineralização e remineralização do processo de cárie. O flúor em baixa concentração é eficaz na promoção da deposição mineral e na inibição da dissolução mineral, e também pode induzir a paralização das lesões do esmalte. Para analisar o efeito das substâncias preventivas de cárie, a ciclagem de pH pode ser utilizada para simular o que ocorre na cavidade oral.

Serra e Cury (1992) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar as diferenças na iniciação e progressão de lesões semelhantes à cárie ao redor de restaurações em esmalte. Um modelo de ciclagem de remineralização e desmineralização foi utilizado para induzir cáries secundárias experimentais ao redor de cavidades restauradas com cimento de ionômero de vidro e resina composta. Foram utilizados 21 pré-molares. Após a extração, os dentes foram limpos com pedra-pomes e água e armazenados em soro fisiológico. Duas cavidades circulares, medindo 2 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade foram preparadas no terço médio de cada dente, utilizando uma broca

cilíndrica. Após esse procedimento, a coroa foi separada da raiz e cortada longitudinalmente entre as duas preparações, e cada metade da coroa foi aleatoriamente restaurada com resina composta (Herculite) ou cimento de ionômero de vidro (Ceram-Fil). Ambos materiais restauradores foram mantidos em posição com uma tira de matriz por 10 minutos e foram cobertos com vaselina imediatamente após a remoção da matriz. As restaurações foram concluídas, todas as metades das coroas foram armazenadas a 37 °C e 100 % de umidade relativa por 24 h antes de serem finalizadas com o polimento. Cada metade da coroa foi então coberta com cera nº 7, exceto pela própria restauração e 1 mm de esmalte adjacente, uma superfície de exposição total de aproximadamente 7 mm². Lesões de cárie foram induzidas por um modelo dinâmico de desmineralização e remineralização, simulando condições *in vivo* de pacientes com alto risco de cárie. Após o ciclo de desmineralização e remineralização, cada metade da coroa foi ressecada por um corte longitudinal através do centro da restauração. Dois espécimes foram obtidos de cada metade da coroa: um da porção central do dente, e outro da porção mesial ou distal. Os espécimes obtidos a partir da porção média foram embebidos em resina acrílica, de modo que a seção de corte da restauração e a lesão fossem expostas. Esta superfície foi polida em diferentes granulações. As medidas de microdureza Knoop foram realizadas utilizando uma carga de 20 g, durante 30 segundos. Doze indentações foram realizadas. A primeira indentação (A1), foi localizada a 100 µm da parede oclusal da cavidade e a 30 µm da superfície do esmalte, as endentações B1 e C1 foram localizadas a 100 µm da parede oclusal, porém a 130 µm e 230 µm, respectivamente, da superfície do esmalte. Com base nesses recuos iniciais, nove outras indentações (3 paralelas a A1, 3 paralelas a B1 e 3 paralelas a C1) foram realizadas. No terço médio da superfície lingual, foram obtidas três indentações, denominadas (A, B e C), situados a 30, 130 e 230 µm, respectivamente, da superfície do esmalte. Estas indentações de controle foram realizadas em 21 amostras escolhidas aleatoriamente entre os grupos experimentais. Os valores da microdureza foram obtidos a partir da relação entre dureza Knoop, a carga aplicada em gramas, o comprimento da indentação. Para avaliar diferenças significativas, foi aplicado o teste de Tukey. Concluíram que a presença de restaurações de cimento de ionômero de vidro interferiu na formação e progressão de lesões cariosas no esmalte, mesmo em uma situação que simulou um alto desafio cariogênico. O uso de resina composta não

impediu o desenvolvimento de cáries artificiais no esmalte adjacente às restaurações, sugerindo a necessidade de adotar medidas preventivas adicionais sempre que materiais restauradores não cariostáticos forem utilizados. A indicação do cimento de ionômero de vidro como material restaurador adquire particular importância na prevenção de cáries secundárias, sobretudo para indivíduos com alto risco de cárie.

Hara et al. (2000) compararam a eficácia de dois materiais restauradores, um ionômero de vidro convencional e uma resina composta, na inibição do desenvolvimento de lesões de cárie radicular artificial, adjacentes às restaurações. Para realizar este estudo, vinte raízes de terceiros molares humanos foram utilizadas, embutidas em resinas de poliestireno e planificadas utilizando lixas de óxido de alumínio de granulações 600 e 1000. Cavidades padronizadas de 2 mm de diâmetro por 1 mm de profundidade, foram realizadas e restauradas aleatoriamente com Chelon-Fil (Espe, GmbH Seefeld, Germany) ou Z100 (3M Dental Products, St. Paul, MN, USA). Em seguida, as restaurações foram polidas com lixas de óxido de alumínio de granulação 1000. Os corpos-de-prova foram armazenados de acordo com cada grupo, em umidade relativa a 37 °C, por 24 h. A indução de cárie artificial foi efetuada por meio de um modelo de desmineralização e remineralização, simulando condições *in vivo* de um paciente que apresenta alto risco de cárie. Os corpos-de-prova foram submetidos a três ciclos. Os corpos-de-prova foram imersos em solução remineralizante (pH 7,0) por 23 h e em solução desmineralizante (pH 4,3) por 1 h. O desenvolvimento das lesões de cárie foi quantificado através de ensaios de microdureza Knoop na superfície dentária adjacente à restauração. Três indentações paralelas entre si (100, 200 e 300 µm), foram realizadas, utilizando uma carga de 10 g por 15 s. Os valores de dureza foram obtidos antes e depois da indução de cárie. Uma diferença significativa entre os tratamentos restauradores foi observada, na distância de 100 µm da restauração. Nas distâncias de 200 e 300 µm não foram observadas diferenças significativas. Concluíram que o cimento de ionômero de vidro convencional (Chelon-Fil) demonstrou um maior potencial cariostático quando comparado à resina composta (Z100), em dentina radicular. Sugerindo para pacientes que apresentam alto risco/atividade de cárie a indicação do cimento de ionômero de vidro convencional.

Pin et al. (2005) avaliaram quatro materiais restauradores e sua capacidade de reduzir a desmineralização do esmalte bovino adjacente a restaurações. Cento e

quarenta e quatro blocos foram selecionados e padronizados de acordo com a microdureza inicial. Em seguida, os blocos foram divididos e metade foi submetido ao processo de desmineralização $\text{pH}=5,0$ / 16 h, sendo assim, foram obtidos dois grupos: esmalte intacto ($n=72$) e grupo esmalte desmineralizado ($n=72$). Cada grupo foi subdividido de acordo com o material restaurador e desafio cariogênico, obtendo assim, 12 subgrupos: Grupo Controle I (WO/D): esmalte intacto, não submetido ao desafio cariogênico; Grupo Controle I (W/D): esmalte intacto, submetido ao desafio cariogênico; Grupo Z250: esmalte intacto restaurado com resina composta (Filtek Z250, 3M Dental Products, St Paul, MN, EUA); Grupo Dyract AP I: esmalte intacto restaurado com poliácido modificado por resina composta (Dyract AP, Dentsply, Industria e Comercio Ltda, Petropolis, RJ, Brazil); Grupo Vitremer I: esmalte intacto restaurado com resina modificada por cimento de ionômero de vidro (Vitremer, 3M Produtos Odontológicos, St. Paul, MN, EUA); Grupo Ketac Molar I: esmalte intacto restaurado com cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Ketac Molar, ESPE Dental AG, Seefeld, Alemanha); Grupo Controle DE (WO/D): esmalte desmineralizado, não submetido a desafio cariogênico; Grupo Controle DE (W/O): esmalte desmineralizado submetido ao desafio cariogênico; Grupo Z250: esmalte desmineralizado restaurado com resina composta Filtek Z250; Grupo Dyract AP: esmalte desmineralizado restaurado com poliácido modificado por resina composta Dyract AP; Grupo Vitremer: esmalte desmineralizado restaurado com cimento de ionômero modificado por resina; Grupo Ketac Molar: esmalte desmineralizado restaurado com ionômero de vidro de alta viscosidade Ketac Molar. Os espécimes foram armazenados em umidade relativa com água deionizada $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 48 h prévio ao polimento. Para simular o desafio cariogênico foram submetidos a ciclos de desmineralização e remineralização durante 14 dias, sendo $\text{pH}=4,3$ / 6 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para solução desmineralizante e $\text{pH}=7,0$ / 18 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a solução remineralizante. Após a ciclagem de pH, os espécimes foram seccionados longitudinalmente. A perda mineral foi avaliada através da microdureza Knoop em dois aspectos: a profundidade em relação à superfície externa do esmalte e a distância das paredes da cavidade e margens da restauração. Os resultados demonstraram que, embora nenhum material pudesse impedir completamente o estabelecimento da lesão cariosa, os cimentos de ionômero de vidro dificultaram a progressão da lesão tanto no esmalte intacto quanto nas lesões de cárie incipientes, demonstrando suas propriedades cariostáticas. Os

autores concluíram que no esmalte intacto, o cimento de ionômero de vidro modificado por resina demonstrou a melhor ação cariostática; e no esmalte desmineralizado, o ionômero de vidro de alta viscosidade e o cimento de ionômero de vidro modificado por resina apresentaram potencial cariostático intermediário; e a resina composta convencional e modificada com poliácidos não demonstraram nenhum efeito cariostático em nenhuma das condições de estudo. Para pacientes que apresentam alto risco e atividade de cárie, o material de escolha deve ser curado quimicamente ou um cimento de ionômero de vidro modificado por resina, uma vez que suas propriedades cariostáticas lhes permitem interferir na progressão e reduzir a gravidade da cárie secundária.

Silva et al. (2007) avaliaram o efeito da ciclagem de diversas soluções desmineralizadoras de pH na dureza superficial, liberação de flúor e nas propriedades superficiais de materiais restauradores (Ketac-Fil Plus, Vitremer, Fuji II LC, Freedom e Fluorofil). Trinta espécimes de cada material foram confeccionadas e a dureza da superfície foi medida. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de acordo com o pH (4,3; 4,6; 5,0; 5,5 e 6,2) da solução desmineralizante estabelecida por Featherstone et al. (1986). Os espécimes foram submetidos a ciclagem de pH durante 15 dias, permaneceram na solução desmineralizadora por 6 horas e na solução remineralizadora por 18 h. Em seguida, a dureza superficial foi medida novamente e as propriedades da superfície foram avaliadas. Os menores valores de dureza superficial (final) foram encontrados no menor pH, com exceção de Freedom e Fluorofil, que não apresentaram diferenças na dureza superficial (final) com a variação do pH. Nos compósitos resinosos modificados com poliácidos, a variação da dureza superficial não foi influenciada pela variação do pH, no entanto a variação da dureza superficial aumentou para Freedom, enquanto que para o Fluorofil diminuiu. Os ionômeros de vidro modificados por resina e convencionais revelaram uma variação nos valores de dureza superficial, com a mudança no pH. Entre os cimentos modificados por resina, o Fuji II LC apresentou um aumento na variação da dureza superficial em comparação com o Vitremer. Os materiais investigados apresentaram os maiores valores de liberação de flúor nos níveis de pH 4,3 e 4,6. Nesses níveis de pH, o Vitremer revelou a maior liberação de flúor, seguido pelo Ketac-Fil Plus e Fuji II LC, Fluorofil e Freedom. Nos níveis de pH 5,5 e 6,2, o Vitremer e o Fuji II LC apresentaram resultados semelhantes, assim como o Ketac-Fil Plus e

Freedom. A interação pH e liberação de flúor apresentou correlação negativa para todos os materiais. O Ketac-Fil Plus, o Fuji II LC e o Vitremer foram influenciados pela variação do pH da solução desmineralizante, uma vez que suas características superficiais foram mais evidentes em níveis mais baixos de pH. Isso não foi observado nos compósitos de resina modificados com poli-ácidos Freedom e Fluorofil. Quando a dureza foi comparada, a variação no pH levou a uma correlação positiva para os cimentos de ionômero de vidro e uma correlação negativa para a liberação de flúor. Para resinas compostas modificadas com poliácidos, foi encontrada correlação negativa com relação à liberação de flúor e nenhuma correlação significativa foi observada para a dureza. A liberação de flúor se mostrou dependente do pH; uma maior quantidade de flúor foi liberada pelos materiais restauradores quando a solução estava em um pH baixo, apresentando assim uma correlação negativa. As propriedades de superfície foram influenciadas: um pH ácido levou a uma alteração maior, exceto para resinas compostas modificadas com poliácidos. O pH da solução de desmineralização influenciou a liberação de flúor dos materiais testados. A variação do pH alterou a dureza e as propriedades superficiais dos cimentos de ionômero de vidro, mas não influenciou os compósitos de resina modificada com poliácidos. Os resultados do estudo demonstraram que as propriedades dos materiais restauradores foram influenciadas pela variação do pH, destacando a importância da realização de experimentos *in vitro* que simulem o desafio cariogênico com características comparáveis com as observadas *in vivo*.

Francisconi et al. (2008) avaliaram o efeito da ciclagem erosiva do pH em diferentes materiais restauradores e o efeito destes materiais sobre o esmalte circundante submetido a este desafio erosivo, avaliando a porcentagem de mudança de microdureza superficial. Os fatores estudados foram materiais restauradores em quatro níveis, meios de imersão em dois níveis e distância do esmalte da restauração em três níveis. Oitenta espécimes de esmalte de dentes bovinos foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em oito grupos de acordo com os materiais restauradores e meios de imersão utilizados: GI e GV – ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer), GII e GVI – ionômero de vidro convencional (Ketac Molar); GIII e GVII – resina composta (Filtek z250) e GIV e GVIII – amálgama (Dispersalloy). Espécimes de esmalte (4 x 4 x 2,5) foram preparados a partir de incisivos bovinos. Os dentes foram cortados usando uma máquina de corte e dois discos de diamante,

separando por um espaçador de 4 mm de diâmetro. A superfície do esmalte dos corpos de prova foi retificada com discos de carborundum e polida com papel feltro, resultando na remoção de cerca de 100 µm de profundidade de esmalte. Cavidades foram preparadas no centro da superfície do esmalte, utilizando uma broca nº 2292, padronizando uma profundidade de 1,5 mm. As cavidades foram restauradas e cada material foi utilizado conforme a descrição de cada fabricante. A microdureza superficial inicial dos materiais restauradores e esmalte, foi realizada. Os grupos I a IV, os espécimes foram submetidos a um modelo de ciclagem de pH por sete dias. Três ciclos de pH foram realizados todos os dias às 8, 14 e 20 h. Os espécimes foram imersos em uma bebida de cola durante cinco minutos, e em saliva artificial entre os ciclos erosivos, sob agitação e à temperatura ambiente. Durante o tempo restante, os espécimes foram mantidos em saliva artificial. Os espécimes dos grupos V a VIII foram mantidos em saliva artificial durante todo o período experimental como controle de erosão e para simular alterações produzidas em materiais restauradores em ambiente úmido *in vivo*. Após o ciclo de pH, o teste de microdureza final foi realizado no meio da área exposta dos materiais restauradores e esmalte. Os testes ANOVA e Tukey foram realizados para comparações estatísticas e o limite de significância foi estabelecido em 5 %. Puderam concluir que considerando os materiais restauradores, não foram detectadas diferenças significativas entre os materiais e meios de imersão. Não foram observadas diferenças significativas na microdureza do esmalte em torno dos diferentes materiais restauradores, independentemente da distância da indentação.

Rehder Neto (2008) avaliou a progressão de lesões artificiais de cárie em esmalte e dentina, comparando substrato humano e bovino. Sessenta fragmentos de esmalte (30 humanos e 30 bovinos) e 60 fragmentos de dentina (30 humanos e 30 bovinos) medindo 4 x 4 x 2 foram embutidos, planificados e polidos. Na superfície, foi isolada uma área de 7 mm² e foi avaliada a microdureza superficial, utilizando uma carga estática e tempo de aplicação de 25 g, por 5 s para esmalte e 10 g por 10 s para dentina. Lesões incipientes de cárie foram induzidas através de um modelo de ciclos de pH. Os espécimes foram imersos por 1 h em solução desmineralizante e por 22 h em solução remineralizante, o que correspondia a um ciclo de pH. Novas medidas de microdureza foram realizadas ao final de cada ciclo de pH, sendo que para dentina foram realizados 3 ciclos e para esmalte 8 ciclos. A análise de variância (ANOVA)

demonstrou diferenças altamente significativas para o fator substrato ($p < 0,01$) e para o fator ciclo ($p < 0,01$) para ambos os substratos testados. Para o fator ciclo, a análise de regressão revelou que as funções que regem o comportamento da microdureza ao longo do desafio cariogênico apresentaram como melhor ajuste, funções exponenciais, para todos os substratos. Apesar de uma desmineralização mais rápida no substrato bovino em relação ao humano, tanto para esmalte quanto para dentina, conclui-se o substrato bovino pode ser utilizado substituindo a dentes humanos em estudos de cárie dental.

Ribeiro et al. (2009) avaliaram a desmineralização do esmalte adjacente que ocorreu pela indução de lesões artificiais de cárie adjacentes a materiais restauradores com capacidade de liberação de flúor. Foram utilizados 160 dentes incisivos extraídos de bovinos. Após serem extraídos e limpos, os incisivos foram esterilizados em solução de timos a 0,5 %, pH 7, onde ficaram imersos durante todo o período de preparo dos blocos de esmalte. Os dentes foram seccionados na porção cervical e do centro da face vestibular de cada elemento foi obtido um bloco de esmalte com dimensões de 4 x 4 mm através do uso de discos diamantados dupla face. A dentina dos blocos de esmalte foi planificada com lixas d'água, até atingirem a espessura de 2 mm. O esmalte também foi planificado e polido, para a obtenção de uma superfície paralela à base de resina acrílica na qual foram embutidos. No centro dos blocos de esmalte foram confeccionadas cavidades circulares padronizadas (1,5 x 1,5 mm) com auxílio de uma ponta diamantada. Para cada material, foram distribuídos aleatoriamente 40 blocos com cavidades prontas para receber a restauração. As cavidades foram então restauradas com os materiais: Z250, Maxxion R, Vidrion R e Vitremer, seguindo as recomendações dos respectivos fabricantes. Depois de restaurados, os blocos foram mantidos em recipientes fechados, com umidade relativa a 37 °C por 24 h. Após este período, foi realizado o polimento das restaurações com discos de lixa de óxido de alumínio. Na superfície dos blocos de esmalte, a 200 µm de distância da margem do bloco, foram realizadas cinco indentações paralelas utilizando um penetrador tipo Vickers, carga estática de 100 g por 15 s. Essas indentações determinavam os valores da microdureza inicial das amostras. Foi utilizado um modelo dinâmico adaptado proposto inicialmente por Featherstone et al., para a indução das lesões de cárie *in vitro*. Os blocos de esmalte restaurados foram submetidos manualmente a 500 ciclos térmicos, banhados em

temperaturas de 5 ± 2 e 55 ± 2 °C, com tempo de permanência de 1 min em cada banho. Após a ciclagem térmica, os blocos de esmalte restaurados foram cobertos com cera 7 deixando livre a restauração e área de 1 mm de esmalte ao redor desta para padronizar a área de atuação das soluções demineralizante e remineralizante, durante a ciclagem de pH. Iniciando o ciclo, cada amostra foi imersa em solução desmineralizando por 6 h, lavada em água destilada e deionizada, seca e imersa em solução remineralizante, completando o ciclo de 24 h. Foram realizadas 10 ciclagens para cada grupo experimental conduzidas por 14 dias. Após o desafio cariogênico, os blocos de esmalte foram novamente submetidos ao ensaio de microdureza, sob as mesmas condições do ensaio inicial. A variação da microdureza Vickers (inicial x final) dentro de cada grupo de material restaurador foi analisada por teste t de Student para amostras pareadas. A perda de dureza superficial do esmalte entre os grupos experimentais foi comparada através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Puderam observar que não houve diferença significativa de perda de dureza superficial entre os materiais resinosos. Os materiais com maior perda de dureza superficial do esmalte adjacente, em ordem decrescente, foram Z-250 (331 ± 30) = Vitremer (305 ± 27) > Vidrion R (196 ± 13) > Maxxion R (108 ± 10). Concluíram que a desmineralização presumida pela perda de dureza superficial foi menor para o esmalte adjacente aos cimentos de ionômero de vidro convencionais (Maxxion R e Vidrion R) do que para o esmalte adjacente aos materiais resinosos (Vitremer e Z250). A utilização de materiais restauradores que liberam flúor pode ser considerada uma alternativa para a prevenção de lesões secundárias de cárie, principalmente em pacientes com alto risco.

Bayrak et al. (2010) realizaram um estudo *in vitro* com objetivo de investigar a liberação de flúor de cinco selantes diferentes e sua recarga após a exposição ao gel de fluoreto de fosfato acidulado. Os espécimes foram preparados a partir de cinco materiais selantes diferentes: Fissurit F, uma resina convencional; Fuji VII, um cimento de ionômero de vidro; Fuji II LC, um cimento de ionômero de vidro modificado por resina; Ionosit, uma resina composta modificada por poliácidos; e Aelite Flo, uma resina composta fluida. As amostras foram armazenadas em um tubo de ensaio de polietileno contendo 5,0 ml de água ultrapura. No vigésimo primeiro dia, os espécimes foram expostos a 1,23 % de gel de fluoreto de fosfato acidulado. A liberação de flúor foi medida usando um eletrodo de íon específico para flúor a 1-7, 14, 21, 22, 28, 35 e

42 dias. Os selantes à base de ionômero de vidro Fuji VII e Fuji II LC tiveram liberação de flúor significativamente maior do que os outros materiais testados em todos os momentos. A liberação de flúor de todos os materiais testados aumentou após a exposição ao gel de fluoreto de fosfato acidulado. Concluíram que, os selantes à base de ionômero de vidro mostraram ter maior liberação inicial de fluoreto, bem como maior capacidade de recarga de flúor do que outros selantes. Devido ao seu alto grau de liberação de flúor e a capacidade de atuar como dispositivo recarregável para a liberação lenta de flúor, os selantes à base de ionômero de vidro podem ser recomendados para o tratamento de crianças com alto risco de cárie.

Rodrigues et al. (2010) propuseram um modelo de ciclagem de pH para verificar a relação dose resposta em materiais liberadores de flúor na remineralização do esmalte. Sessenta blocos de esmalte bovino foram selecionados para o teste de microdureza superficial sob uma carga de 25 g por 10 s. As lesões de cárie artificial foram induzidas através de uma solução desmineralizante (1.3 mmol / L Ca, 0.78 mmol / L P 0.05 mol / L tampão de acetato, 0.03 µg F / ml, pH 5.0) durante 16 horas, descrita por Queiroz et al. (2008). Este método produz um esmalte subsuperficial desmineralizado sem erosão superficial. A microdureza superficial foi medida novamente. Doze amostras foram preparadas para cada grupo envolvendo os seguintes materiais: resina composta Z100 (3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA); selante de fóssulas e fissuras Fluoroshield (Dentsply Ind. E Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil); cimento de ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M/ESPE); cimento de ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (diluído numa relação pó/líquido 1:4); e 12 sem tratamento (controle). O efeito do flúor na remineralização das lesões de cárie artificiais foi avaliado. O ciclo era composto por uma solução de desmineralização com pH 4,7 e por uma solução de remineralização com pH 7,0, durante 6 dias. As 8 horas da manhã todos os espécimes foram imersos na solução remineralizante; 12 h, os espécimes foram lavados com água deionizada e imersos em solução desmineralizante; 2 h da tarde, os espécimes foram lavados e imersos na mesma solução remineralizante usada às 8 h da manhã; 4 h da tarde, os espécimes foram lavados e imersos em uma nova solução de remineralização, no qual foram mantidos até às 8 h do dia seguinte, quando a solução remineralizadora foi substituída novamente como um novo ciclo iniciado. Após o ciclo de pH de 6 dias, o material anexado a cada bloco de esmalte foi removido e descartado. Os blocos foram então

submetidos a microdureza final. Após, avaliou-se a microdureza de superfície final, para cálculo da porcentagem de recuperação da microdureza de superfície. Determinou-se o flúor presente no esmalte e nas soluções de ciclagem. O teste de microdureza em secção longitudinal foi realizada para cálculo do conteúdo mineral. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para a microdureza em relação às distâncias. Os materiais demonstraram maior eficácia de remineralização em áreas mais próximas das margens da restauração. Diferenças significativas foram encontradas entre os materiais liberadores de flúor, um maior ganho mineral foi observado para distâncias de 150 e 300 μm , provavelmente devido ao fato de que elas se encontravam mais próximas do material. Em conclusão, o modelo de ciclagem de pH proposto mostrou uma dose-resposta satisfatória, uma vez que os materiais liberadores de flúor se mostraram eficazes na remineralização do esmalte.

Salas et al. (2011) realizaram um estudo afim de avaliar o efeito de desafios erosivo e cariogênico na perda de minerais do esmalte em circundantes de restauração com cimento de ionômero de vidro. Cento e trinta e um blocos de esmalte foram obtidos a partir de incisivos bovinos. Cavidades padrão, com 1 mm de diâmetro por 1,8 mm de profundidade, foram confeccionadas no centro da superfície de cada dente. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, de acordo com os materiais restauradores utilizados: Grupo 1 – resina composta universal (Filtek Z350, 3M ESPE, EUA), Grupo 2 – cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade (Fuji IX, GC America, EUA), Grupo 3 – cimento de ionômero de vidro modificado por resina com nanopartícula (Ketac Nano, 3M ESPE, EUA), Grupo 4 – cimento de ionômero de vidro encapsulado modificado por resina (Riva Light Cure, Southern Dental Industries-SDI, Austrália), Grupo 5 – cimento de ionômero de vidro de alta viscosidade encapsulado (Riva Self Cure, Southern Dental Industries-SDI, Austrália) e Grupo 6 – ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer, 3M ESPE, EUA). As medidas de microdureza da superfície do esmalte adjacente foram realizadas. Três linhas de indentações foram realizadas na superfície do esmalte nas distâncias de 100, 200, 300, 400 e 500 μm da margem externa da restauração. A carga de indentação foi de 25 g com 15 s. Após as medidas de microdureza, as amostras de cada grupo foram divididas aleatoriamente em dois subgrupos, de acordo com o tipo de desafio. Os espécimes do desafio de cárie artificial foram submetidos a um modelo de ciclos de pH durante 5 dias à 6 h em 10 ml de solução (2,2 desmineralizantes mM

CaCl₂ 2,2 mM de NaH₂PO₄, e 50 mM de ácido acético, ajustada para um pH de 4,7). Após esse período, os espécimes foram lavados em água deionizada, secos com toalhas de papel e imersos em 10 ml de solução remineralizadora (1,5 mM CaCl₂, 0,9 NaH₂PO₄ e 0,15 M KCl, ajustado para pH 7,0), onde eles foram deixados por 18 h. Os espécimes que foram submetidos ao desafio erosivo artificial foram imerso em 10 ml de ácido cítrico a 1 % por 10 min, sob agitação mecânica. Após esse período, eles foram removidos e lavados em água corrente por 15 a 20 s. A avaliação final da microdureza, após os desafios cariogênico e erosivo, foi realizada, e a alteração da microdureza superficial para o esmalte foi calculada. Em relação ao desafio cariogênico, os resultados deste estudo demonstram que a perda mineral no esmalte adjacente foi maior para os espécimes restaurados com resina composta do que a observada para os espécimes restaurados com os demais materiais, em todas as distâncias avaliadas. O efeito protetor do cimento de ionômero de vidro foi observado apenas em relação ao desafio cariogênico. Para o desafio erosivo, apesar da ocorrência de perda mineral entre 60 e 80 %, não foram observadas diferenças significativas da microdureza superficial total do esmalte ao redor dos diferentes materiais restauradores nas distintas distâncias testadas. Concluíram que as restaurações de ionômero de vidro são capazes de prevenir a perda mineral do desafio cariogênico, mas não para o desafio erosivo. O efeito protetor do ionômero de vidro de alta viscosidade contra o processo de cárie tende a ser superior ao proporcionado pelo ionômero de vidro modificado por resina.

A presença de biofilme sobre a superfície de materiais restauradores, pode acarretar em uma degradação em sua superfície. Barbosa et al. (2012) avaliaram *in situ*, as alterações na microdureza superficial de dois materiais restauradores. Dez voluntários utilizaram um dispositivo intraoral palatino contendo placas de esmalte bovino restauradas com resina composta ou ionômero de vidro modificado por resinas. Os fatores avaliados foram: presença de biofilme em dois níveis (sem acúmulo de biofilme e com acúmulo de biofilme); e materiais em dois níveis: resina composta Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) e ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE, St. Paul, MN, USA). Duas fases de 14 dias foram realizadas uma para cada material. A dureza superficial Knoop foi realizada, utilizando uma carga de 25 g por 10 s. Foram realizadas três marcações na superfície dos materiais, a 25, 50 e 100 µm das margens das restaurações. A microdureza foi

repetida após a fase clínica. Constataram que houve uma diminuição na microdureza da superfície em todos os materiais testados, em comparação com os valores iniciais. A resina composta apresentou a maior dureza, antes e após o ensaio. O acúmulo de biofilme promoveu redução nos valores de dureza, apenas para o ionômero de vidro modificado por resina. Um aumento da microdureza foi observada no ionômero de vidro modificado por resina, promovido pelo acúmulo de biofilme, entretanto esse aumento da microdureza não ocorreu na resina composta. A biodegradação dos espécimes foi observada visualmente durante as análises de microdureza, a presença de rachadura e depressões na superfície dos materiais, especialmente no ionômero de vidro modificado por resina. Por meio dos resultados obtidos, os autores concluíram que o acúmulo de biofilme e a presença de um alto desafio cariogênico promoveram degradação e perda da dureza superficial para o material ionomérico, mas não para a resina composta. Ambos os materiais apresentaram perda de microdureza superficial, por meio do envelhecimento no meio bucal. Estas alterações superficiais dos materiais restauradores podem contribuir para o acúmulo do biofilme e comprometer nas características.

Perondi et al. (2014) avaliaram a microdureza de materiais: ionoméricos, convencionais e híbrido de ionômero de vidro modificado por resina. Oito materiais foram utilizados: Ionomaster (Wilcos, Petrópolis, RJ, Brazil), Maxxion R (FGM, Joinville, SC, Brazil), Vidrion R (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), Vitrofil R (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), ChemFil Rock (Dentsply Caulk, Kontanz, Germany), Resiglass (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brazil), Vitremer (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) e Ionoseal (Voco, Cuxhaven, Germany). Com auxílio de um molde de silicone, doze amostras por grupo foram confeccionadas, seguindo a instrução de cada fabricante e em seguida fotopolimerizadas. Após 24 h de armazenamento, as amostras foram submetidas ao teste de microdureza Knoop. Cinco marcações foram feitas, com carga de 10 g por 5 s, e distância de 30 μ m uma da outra. O valor da microdureza de cada amostra, foi determinado a partir da média das cinco marcações da microdureza. Os resultados demonstraram que os materiais ionoméricos convencionais Vitrofil R 16.5 ($\pm$ 5.1) A e Maxxion R 17.7 ($\pm$ 4.7) A não apresentaram diferença estatística dos materiais híbridos de ionômero de vidro modificados por resina, Ionoseal 13.1 ($\pm$ 8.5) A, Vitremer 20.3 ($\pm$ 3.3) A e Resiglass 21.6 ($\pm$ 5.2) A. Os materiais ionoméricos convencionais Ionomaster 24.3 ($\pm$ 6.6) B, ChemFil Rock 31.1 ($\pm$ 8.5) B e Vidrion R 31.0

(± 9.4) B, apresentaram as maiores durezas. Os autores concluíram que os ionômeros modificados por resina geralmente apresentam menor microdureza, quando comparados com os ionômeros convencionais.

Dasgupta et al. (2018) avaliaram e compararam a liberação e recarga de íons flúor de cinco diferentes materiais restauradores posteriores: GP IX Extra (GE), EQUIA® Forte Fil (EF), Beautifil Bulk (BB), Dyract® XP (DXP), Tetric N-Ceram® (TNC). Os materiais restauradores foram divididos em cinco grupos (n=12), sendo eles G1 – GE, G2 – EF, G3 – BB, G4 – DXP, G5 – TNC. A liberação de flúor foi verificada usando eletrodo seletivo de íons fluoreto, em intervalos de tempo de 1 dia e depois 3, 7, 14, 21 e 28 dias. A recarga de flúor foi feita com 1,23% de flúor fosfato acidulado (12300 ppm) após 28 dias e cada amostra foi novamente verificada quanto à liberação de flúor nos mesmos intervalos de tempo. Na análise entre os grupos, o grupo 2 apresentou altos valores de liberação de flúor e recarga em intervalos de tempo que foram significativamente maiores do que os grupos 1, 3, 4 e 5. Na análise intragrupo mostrou liberação de flúor significativamente maior no final do dia 1, que diminuiu progressivamente com o tempo para todos os materiais testados. Resultados semelhantes foram obtidos para estimativa de recarga de flúor, onde G2 apresentou a maior captação de flúor e re-lançamento seguido por G1, G4, G3 e G5 na ordem descendente. Puderam concluir que o EF mostrou o maior potencial de liberação e recarga de flúor em todos os intervalos de tempo em comparação com outros materiais restauradores testados e a maior liberação de flúor foi observada no dia 1.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo foi avaliar a microdureza do esmalte adjacente a restaurações com materiais restauradores bioativos após desafio cariogênico, e a adesão bacteriana por *Streptococcus mutans* à superfície desses materiais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Unidade experimental:

- 91 espécimes bovinos
- 50 espécimes dos materiais restauradores utilizados

Substratos:

- Esmalte
- Materiais restauradores

Fatores em estudo:

- Adesão bacteriana às superfícies dos materiais restauradores
- Avaliação da microdureza da superfície do esmalte adjacente às restaurações

Desenho do estudo: foi dividido em duas partes;

- a) Adesão bacteriana aos materiais restauradores através da contagem UFC/ml, e microscopia de força atômica como análise complementar dos resultados;
- b) Microdureza do esmalte adjacente às restaurações, após os espécimes terem sido submetidos a desafio cariogênico.

4.2 Aspectos éticos

O presente estudo utilizou espécimes de dente bovino. Por determinação da Lei nº 11.794 de 08/10/2018 – Lei “Arouca”, não foi necessária a submissão do projeto para análise do comitê de ética em pesquisa com animais, por se tratar de uma pesquisa que envolve o uso de dentes bovinos como substrato comercialmente viável.

4.3 Materiais empregados

Foram avaliados quatro materiais restauradores bioativos e uma resina convencional, ilustrados na figura 1 e descritos no quadro 1.

Figura 1 – Materiais utilizados



Legenda: a) Filtek Bulk Fill (3M); b) Beautifil Bulk (Shofu); c) Equia Forte (GC); d) Activa Bioactive Restorative (Pulpdent); e) Cention N (Ivoclar Vivadent).

Fonte: Fabricantes.

Quadro1 – Materiais utilizados

MATERIAL	COMPOSIÇÃO	FABRICANTE
Activa Bioactive Restorative	Matriz de resina iônica bioativa, Componente de resina, reagentes de ionômero de vidro	PULPDENT™ Corporation, USA
Beautifil Bulk	Bis-GMA, TEGDMA, BisMPEPP, Partículas flúor-boro-alumínio-silicato.	Shofu Inc., Kyoto, Japan
Equia Forte	Líquido: ácido carboxílico polibásico 5-10%, pH a 20°C= 1,9 12% de água, ácido poliacrílico Pó: Óxido de ferro <0,5%	GC America Inc., Illinois, EUA
Filtek Bulk Fill	Cerâmica tratada com silano, Diuretano Dimetacrilado (UDMA), Uretano Dimetacrilato aromático, Silica tratada com silano, Fluoreto de itérbio, 1-12-dodecano dimetacrilato (DDMA), Zircônia tratada com silano, Água, Monômero AFM-1, Etil 4-dimetil aminobenzoato (EDMAB), Benzotriazol, Dióxido de titânio.	3M ESPE, Saint Paul, Minnesota, USA
Cention N	UDMA, DCP, PEG-400 DMA	Ivoclar Vivadent Ltda., Schaan, Liechtenstein

Legenda: Bisfenol glicidil metacrilato (Bis-GMA), Dimetacrilato de trietilenoglicol. (TEGDMA), Uretano dimetacrilato (UDMA), Dicloropropanol (DCP), Dodecano Dimetacrilato (DDMA), Etil 4-dimetil aminobenzoato (EDMAB).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Adesão bacteriana aos materiais restauradores

4.4.1 Ativação da cepa padrão de *S. mutans*

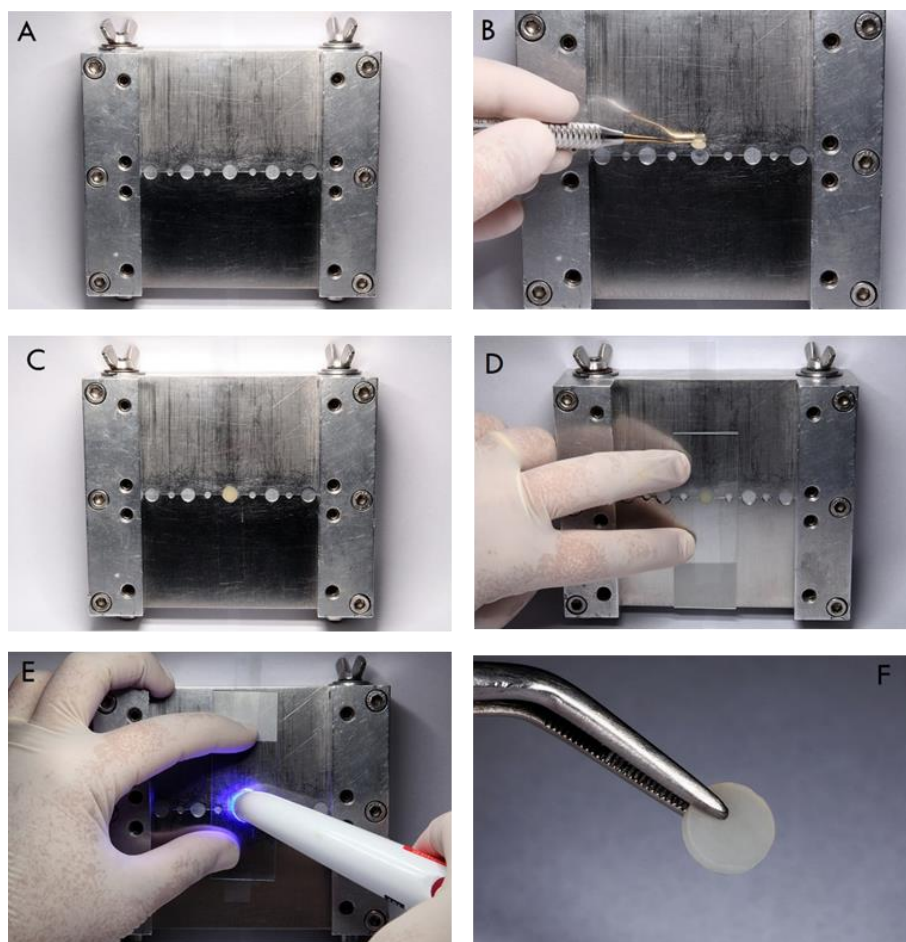
Foi utilizada cepa padrão de *Streptococcus mutans* (UA159), mantida em freezer a -80 °C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP. Para a ativação desse micro-organismo, a cepa foi cultivada em ágar Infuso Cérebro Coração (BHI, Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37 °C em estufa Heal force, HF 212 UV (5 % de CO₂).

4.4.2 Adesão bacteriana aos materiais restauradores

Foram confeccionados 10 discos de cada um dos materiais restauradores, com o auxílio de uma matriz de aço polida bipartida, com orifício de 6 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade (Figura 2A). O emprego da matriz metálica rígida proporcionou a confecção de discos de tamanho padronizado.

A inserção do material restaurador foi realizada em incremento único de 1 mm (Figura 2B/1C). Uma tira matriz de poliéster descartável foi colocada na parte superior da matriz e pressionada com uma lâmina de vidro, para proporcionar compactação, lisura e padronização da superfície dos espécimes (Figura 2D), antes da polimerização (Radii-cal, SDI), por 40 s (1200 mW / cm²), (Figura 2E/1F). Os espécimes foram armazenados em umidade relativa 100 % a 37 °C por 24 h, em seguida foram autoclavados, para então serem expostos ao *S. mutans* para subsequente avaliação da aderência bacteriana às superfícies dos materiais.

Figura 2 – Confeccção dos espécimes



Legenda: a) matriz metálica bipartida; b) inserção do material; c) tira de poliéster sobre o material; d) lâmina de vidro compactando o material; e) fotopolimerização; f) espécime confeccionado.
 Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.3 Formação dos biofilmes de *S. mutans* sobre os espécimes

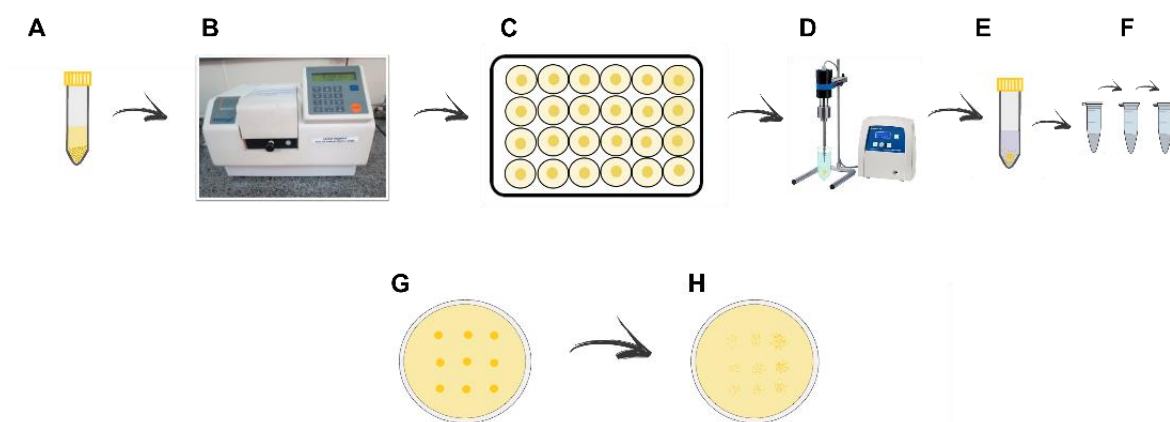
Após a ativação das cepas (Figura 3A), colônias isoladas do microorganismos foram transferidas para tubos Falcon contendo caldo BHI, foram incubadas 37 °C por 24 h, sob condições de microaerofilia (5 % de CO₂). As células microbianas foram centrifugadas a 1300 x g durante 10 min. O sobrenadante de cada grupo foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 10 ml de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células das suspensões foi realizada através de espectrofotômetro (B582,

Micronal, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 398 nm e densidade óptica de 0,620, estabelecidos previamente no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP, obtendo-se uma concentração de 10^6 microrganismos/ml de *S. mutans* (Figura 3B).

O teste de aderência foi realizado em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar). Os espécimes foram armazenados em placas de 24 poços contendo 2.0 mL de BHI caldo com 5 % de sacarose (Figura 3C). Foram acrescentados em cada poço, 225 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* que foi incubado em microaerofilia a 37 °C por 24 h para adesão inicial de *S. mutans* aos espécimes. Após este período de incubação, os espécimes foram lavados três vezes com 2 mL de PBS, para remoção das células fracamente aderidas. Após um período de 48 h do início da formação do biofilme, os espécimes foram removidos com auxílio de uma pinça clínica estéril, e transferidos para um tubo Falcon contendo 4 ml de PBS para que o biofilme aderido nos espécimes fossem removidos utilizando um homogeneizador ultrassônico (sonopuls HD2200, Bandelin Eletronic) com potência de 7 W por 30 segundos para remover as células bacterianas aderidas ao material restaurador (Figura 3D).

A partir da solução obtida (Figura 3E), foram realizadas diluições seriadas da suspensão do biofilme (Figura 3F), das quais três gotas de 10 µL de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI e incubadas durante 24 h a 37 °C sob condições microaerofilia (Figura 3G). Depois da incubação, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) para cada espécime (Figura 3H).

Figura 3 – Adesão do *Streptococcus mutans* sobre os espécimes



Legenda: a) ativação das cepas; b) contagem do número de células (espectrofotômetro); c) armazenamento em placa de 24 poços; d) homogeneizador ultrassônico; e) solução obtida; f) diluições seriadas da suspensão do biofilme; g) diluições semeadas em placas de petri; h) determinação do número de unidades formadoras de colônias.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.4 Microscopia de força atômica

Dois espécimes representativos de cada grupo estudado foram confeccionados e avaliados no microscópio de força atômica modelo SPM 9500 J3 (Shimadzu Corp. Inc., Japan) do Laboratório de Caracterização Materiais, do Depto de Física do ITA, em modo de contato intermitente. Utilizando os recursos de análise de perfil, as dimensões das células presentes na superfície dos espécimes de cada grupo foram medidas. São apresentadas imagens características da cepa-padrão de *Streptococcus mutans*, obtidas por microscopia de força atômica com áreas de varredura de 5 μm x 5 μm . A partir dessas imagens, são medidas as dimensões das células presentes na superfície de cada material.

4.5 Avaliação da microdureza do esmalte adjacente às restaurações

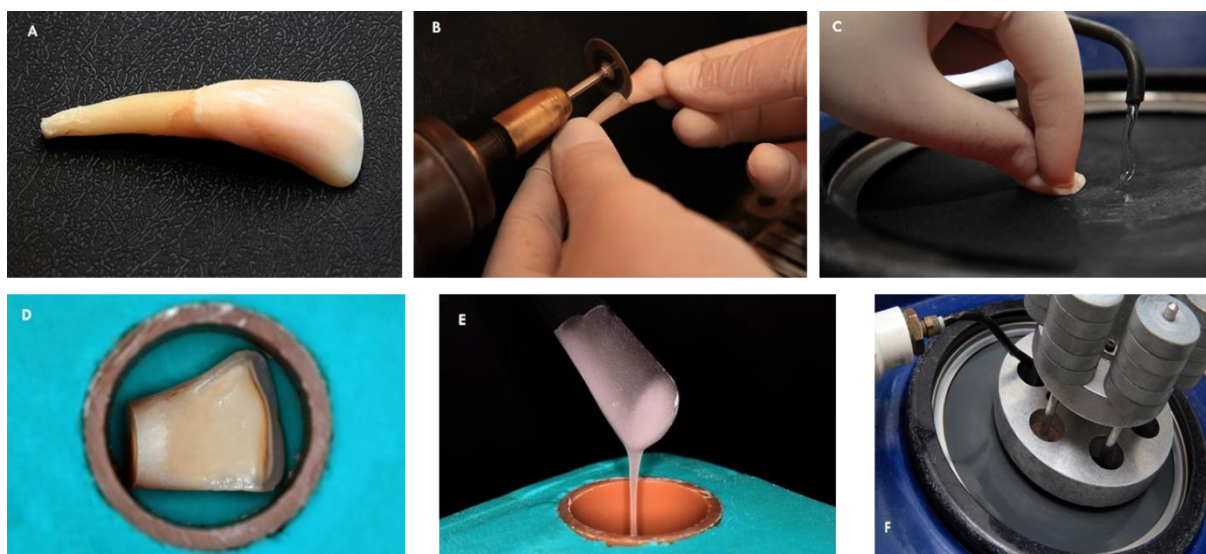
Para o desenvolvimento dessa parte do estudo foram selecionados noventa e um incisivos bovinos hígidos recém-extraídos, com superfície vestibular íntegra (Figura 4A). Os dentes foram mantidos em solução de timol a 0,1%, até o preparo dos espécimes.

4.5.1 Preparo dos espécimes

Os dentes bovinos foram cortados transversalmente ao seu longo eixo, abaixo da junção amelocementária, para remoção da raiz (Figura 4B), com disco diamantado de dupla face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil). Após a remoção da porção radicular (Figura 4B), os espécimes tiveram o esmalte da face vestibular planificada, empregando uma lixa d'água de granulação P400 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), acoplado a uma politriz circular (DP-10, Panambra, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4C).

Em seguida, os espécimes foram embutidos em um cano de PVC de 25 mm em resina acrílica transparente ativada quimicamente (Jet-Clássico, São Paulo, SP, Brasil) em um molde de silicone de formato cilíndrico (Figura 4E). As coroas bovinas foram posicionadas no interior do molde com a superfície do esmalte voltada para o fundo do molde (Figura 4D). Após a presa final da resina, os cilindros obtidos foram polidos na politriz circular, utilizando o dispositivo de polimento automático Autopol – 2 (Panambra, São Paulo, SP, Brasil), que garantiu a superfície polida fosse exatamente perpendicular ao longo eixo do cilindro. A parte superior do bloco onde está exposto o esmalte foi lixada por 1 min com a lixa P600 (Fepa-P, Panambra, São Paulo, SP, Brasil), para planificar e padronizar a textura da superfície. As superfícies vestibulares dos espécimes foram polidas com lixas de carbetto de silício de granulação P1200 – 30 s, P2400 – 60 s e P4000 – 2 min, para obtenção de uma superfície de esmalte lisa, homogênea e polida, a semelhança da superfície natural do esmalte (Figura 4F).

Figura 4 - Confeccção dos espécimes de dente bovino



Legenda: a) incisivo bovino; b) remoção da raiz; c) planificação da face vestibular; d) posicionamento do espécime no interior do molde de silicone; e) embutimento dos espécimes; f) polimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.2 Preparo cavitário e procedimento restaurador

O preparo cavitário foi realizado na região central do incisivo bovino (Figura 5B), com uma ponta diamantada cilíndrica de 4 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade (PM85G, KG, Sorensen, Barueri, SP, Brasil). Essa ponta diamantada foi acoplada a uma máquina de preparos circulares padronizados (MicroMill), que trabalhou sob irrigação (Figura 5A). Um relógio comparador digital “absolute” ID-S (Mitutoyo, Kawasaki, Japão) foi acoplado à máquina de preparos circulares para controlar a profundidade do preparo. Os espécimes foram estabilizados de modo que a superfície do esmalte ficasse paralela à base da ponta diamantada, obtendo assim preparos padronizados. Em seguida, foram levados ao ultrassom (Ultrasonic Cleaner 1440D), para que fosse removido os grãos abrasivos e detritos na superfície do esmalte. Os espécimes foram restaurados conforme as recomendações de cada fabricante. Uma etiqueta adesiva de 12 mm de diâmetro foi colocada sobre a superfície do esmalte. Na área periférica foi aplicada uma camada de esmalte de unha resistente à degradação pela solução desmineralizadora, de modo que sempre uma

área de 11,3 mm² ficasse exposta aos tratamentos. Foram armazenados em recipiente fechado com 100 % de umidade relativa a 37 °C durante 48 h, para que ocorresse a polimerização dos materiais, antes de serem submetidos aos ciclos de des/remineralização.

Os espécimes foram divididos em sete grupos (n=13):

- Grupo AB: ActivaBioactive Restorative (Pulpdent) / n=13
- Grupo BB: Beautifil Bulk (Shofu) / n=13
- Grupo CN: Cention N (Ivoclar Vivadent) / n=13
- Grupo EF: Equia Forte (GC) / n=13
- Grupo FB: Filtek Bulk Fill (3M) / n=13
- Grupo ES: Esmalte Hígido sem ciclagem de pH / n=13
- Grupo EC: Esmalte com ciclagem de pH / n=13.

4.5.3 Confeção das restaurações

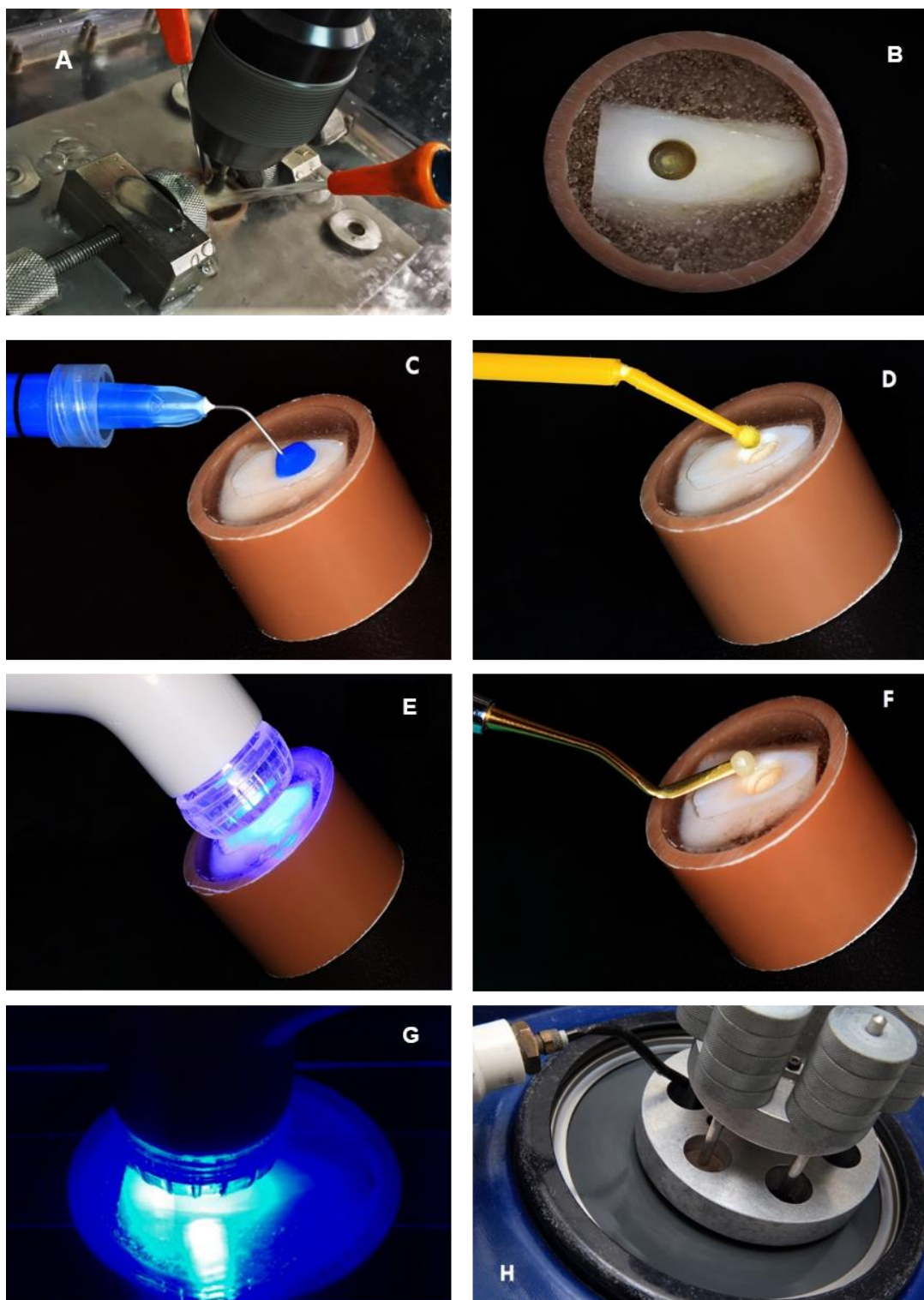
Os preparos de cada grupo foram restaurados conforme as recomendações de cada fabricante:

- a) Activa BioActive-Restorative – O dente foi condicionado com ácido fosfórico 37% (Condac – FGM) por 30 s (Figura 5C). Seguido de lavagem e secagem. Foi aplicado o sistema adesivo (Figura 5D) (3M ESPE Single Bond Universal), seguido da polimerização (Ratii-cal, SDI), por 20 segundos (Figura 5E) e da inserção da resina composta na cavidade, em incremento único (Figura 5F). A polimerização foi realizada com uma luz LED com intensidade de 1200 mW/cm² na faixa de 440-480 nm (Figura 5G) durante, 40 s;
- b) Beautifil Bulk – Foi realizado o condicionamento ácido com ácido fosfórico a 37 % (Condac – FGM) por 30 s. Seguido de lavagem e secagem. Foi aplicado o sistema adesivo (3M ESPE Single Bond Universal), seguido da polimerização (Ratii-cal, SDI), por 20 s e da inserção da resina composta

na cavidade, em incremento único. A polimerização foi realizada com uma luz LED com intensidade de 1200 mW/cm² na faixa de 440-480 nm, durante 40 s;

- c) Cention N – Foi realizada a espatulação do material com a proporção 1pó + 1líquido, durante 45 a 60 s. O material foi inserido na cavidade em incremento único. Aguardou-se até que a sua polimerização química ocorresse para o prosseguimento dos testes;
- d) Equia Forte - A superfície foi previamente condicionada usando o condicionador cavitário (GC, EUA) por 10 s. Em seguida, foi lavada com água abundante e secada por 10 s com jatos de ar a aproximadamente 10 cm de distância. A cápsula foi agitada para soltar o pó e para a sua ativação o êmbolo foi empurrado para o seu interior, antes de ser levada ao aplicador de cápsulas GC metálico. Em seguida, a cápsula foi levada ao amalgamador por 10 s. Para então ser imediatamente adaptada ao aplicador de cápsulas GC, possibilitando a inserção do material na cavidade preparada;
- e) Filtek Bulk Fill – Foi realizado o condicionamento ácido com ácido fosfórico a 37 % (Condac – FGM) por 30 s. Seguido de lavagem e secagem. Foi aplicado o sistema adesivo (3M ESPE Single Bond Universal), seguido da polimerização (Radii-cal, SDI), por 20 s e da inserção da resina composta na cavidade, em incremento único. A polimerização foi realizada com uma luz LED com intensidade de 1200 mW/cm² na faixa de 440-480 nm, durante 40 s.

Figura 5 – Confeccção da restauração



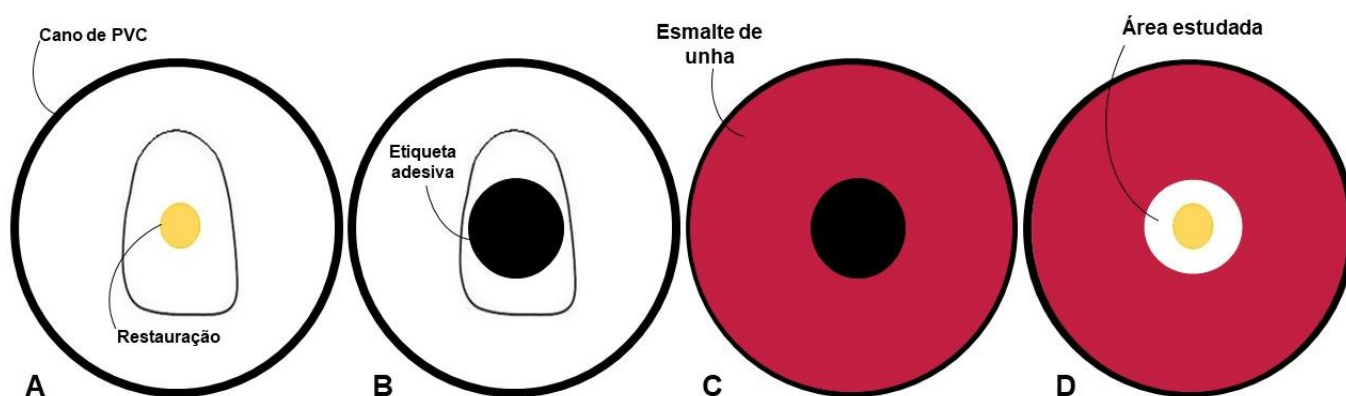
Legenda: a) confecção da cavidade; b) dente com a cavidade preparada; c) condicionamento ácido; d) aplicação do sistema adesivo; e) fotopolimerização do sistema adesivo; f) inserção do material restaurador; g) fotopolimerização do material restaurador; h) polimento do espécime.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.4 Análise de microdureza Knoop (KHN)

As análises de microdureza superficial foram realizadas por meio de um microdurômetro (FM 700, Future Tech Company, Tóquio, Japão), acoplado ao software para análise de imagem (FT-ARS 900 HDPS-ARS, versão 1.31.4). Por meio de uma ponta diamantada piramidal tipo Knoop e aplicação de carga estática de 50 g por 10 s, foram realizadas três indentações na superfície de cada espécime, com 100 μm de distância entre si (Figura 7). Médias dos valores das três leituras foram obtidas e submetidas à análise estatística. A microdureza do esmalte adjacente às restaurações foi medida antes e após o desafio cariogênico. Foram selecionadas e pré-demarcadas as áreas de mensuração, próximas à interface (Figura 6).

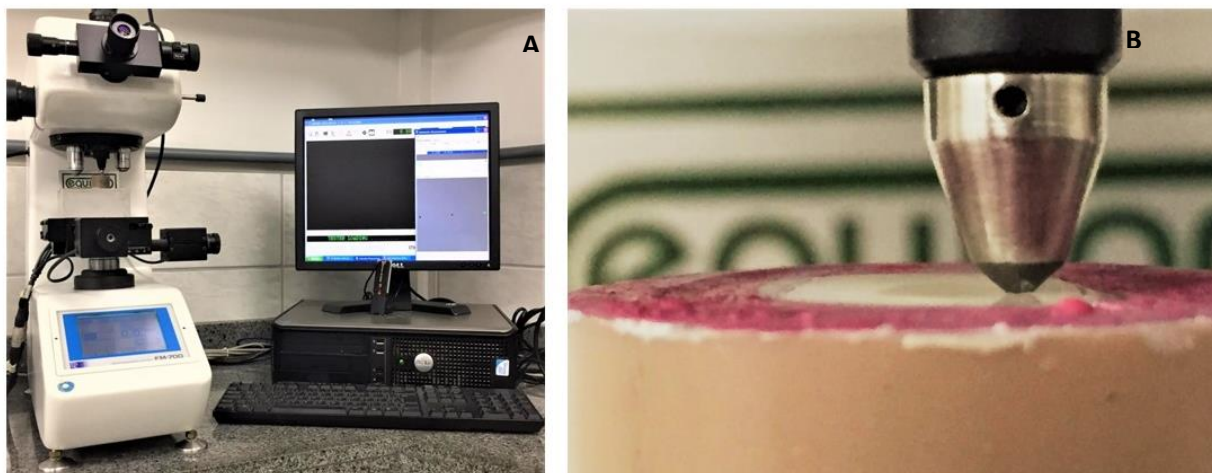
Figura 6 – Delimitação da área das leituras



Legenda: a) dente bovino embutido; b) etiqueta adesiva protegendo a área escolhida; c) esmalte de unha delimitando a área do experimento; d) área do esmalte onde foram realizadas as indentações

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 – Microdurômetro



Legenda: a) microdurômetro; b) ponta diamantada piramidal tipo Knoop.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.5 Desafio Cariogênico

Foi realizado através de um modelo dinâmico *in vitro*, a simulação de condições de desmineralização e remineralização *in vivo* que ocorrem em pacientes com alto índice de cárie. Todos os espécimes permaneceram por 6 h em solução desmineralizante e 18 h em solução remineralizante, simulando ciclagens de pH de alto risco de cárie durante 7 dias (Buskes et al., 1985; Gohring et al., 2004; Pin et al., 2005). A proporção das soluções desmineralizante e remineralizante por área foi de 70,62 ml/mm² e 35,25 ml/mm², respectivamente (Queiroz et al., 2008).

Durante o intervalo de trocas das soluções, os espécimes foram lavados em água deionizada antes da imersão em uma nova solução. As soluções foram trocadas a cada ciclo, a fim de prevenir a exaustão ou saturação das soluções, e estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 – Soluções utilizadas para a simulação das condições de desafio cariogênico

SOLUÇÃO	COMPOSIÇÃO
Solução Desmineralizante (pH 4,7)	CaCl ₂ H ₂ O KH ₂ PO ₄ CH ₃ COOH
Solução Remineralizante (pH 7,0)	KCl NaCl MgCl ₂ 6H ₂ O CaCl ₂ 2H ₂ O KSCN H ₂ KPO ₄ H ₃ BO ₃

Legenda: Cloreto de Cálcio (CaCl₂); Cálcio (Ca); H₂O (Água); Flúor (F), Cloreto de Potássio (KCl); Fosfato (PO₄); Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄), Ácido etanoico (CH₃COOH); Cloreto de sódio (NaCl); Cloreto de Magnésio (MgCl₂); Cloreto de Cálcio (CaCl₂); Tiocianato de Potássio (KSCN); Ácido Bórico (H₃BO₃).

Fonte: Buskes et al., 1985 e Gohring et al., 2004.

4.5.6 Microdureza final

Para obtenção dos dados relativos ao desafio cariogênico, a microdureza foi medida em 2 momentos:

- a) KHN_{inicial}: valor mensurado antes do desafio cariogênico;
- b) KHN_{final}: valor mensurado após o desafio cariogênico.

Todos os parâmetros de dureza utilizados nas mensurações finais foram os mesmos utilizados na mensuração da dureza inicial. As indentações finais foram feitas ao lado das iniciais.

4.6 Análise estatística

Para os dados do teste de adesão bacteriana aos espécimes, os resultados de UFC/mL foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, utilizando o programa GraphPad 6.0, e a comparação entre os materiais para a avaliação das diferenças estatísticas foi realizada pelo Teste post-hoc de Tukey, com nível de significância de 5 %.

Para os dados de microdureza de superfície, uma média foi obtida a partir das três leituras realizadas em cada espécime. A análise descritiva consistiu nos valores de média e desvio-padrão e, a análise inferencial, compreendeu o teste de análise de variância sob dois fatores (tratamento/tempo), seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, com nível de significância de 5 % ($\alpha=0,05$).

4.7 Hipóteses de nulidade

As seguintes hipóteses de nulidade foram formuladas:

- a) H01: Os materiais bioativos não interferem na adesão bacteriana por *Streptococcus mutans*;
- b) H02: Os materiais bioativos não interferem na microdureza do esmalte adjacente a restaurações com esses materiais.

5 RESULTADOS

A análise estatística dos resultados obtidos será apresentada em três tópicos: adesão bacteriana, microscopia de força de atômica e microdureza superficial.

5.1 Adesão bacteriana a materiais restauradores

Podemos observar pela Tabela 1 que os materiais apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 1 - Resultados do teste (ANOVA)

	DF	SS	MS	F	p
Material	4	40.04	10.01	30.30	<0.0001*

Fonte: * - $p < 0,05$ - Diferenças Estatísticas.

A comparação entre os materiais para a avaliação das diferenças estatísticas foi realizada pelo Teste post-hoc de Tukey. Todos os testes empregados admitiram como nível de significância estatística de 5 %.

A Tabela 2 e a Figura 8 apresentam os valores de média, desvio-padrão e os resultados do teste de Tukey dos 5 grupos analisados.

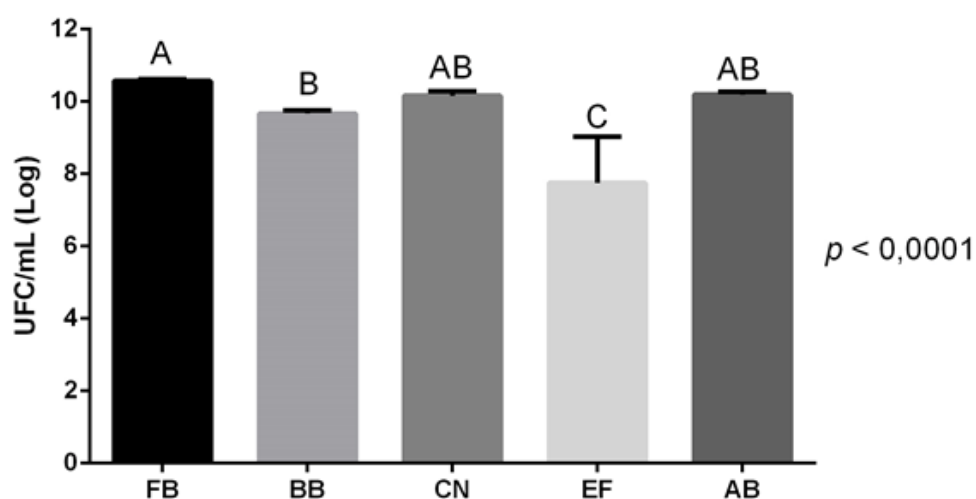
Tabela 2 - Resultado do teste de Tukey para adesão bacteriana

GRUPOS	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	Conjuntos Homogêneos*	
Filtek Bulk (FB)	10,58	0,04	A	
Activa Bioactive (AB)	10,19	0,08	A	B
Cention N (CN)	10,16	0,12	A	B
Beautifil Bulk (BB)	9,66	0,09		B
Equia Forte (EF)	7,75	1,27		C

Legenda: FB (Filtek Bulk Fill), AB (Activa Bioactive), CN (Cention N), BB (Beautifil Bulk), EF (Equia Forte), * Conjuntos com a mesma letra não apresentam diferenças significativas.

A Tabela 2 demonstra que não houve diferença estatística entre a resina composta convencional Filtek Bulk (FB) e os materiais bioativos Activa Bioactive (AB) e Cention N (CN); diferindo estatisticamente, com significância, dos materiais Beautifil Bulk (BB) e Equia Forte (EF); sendo que o material bioativo ionômérico Equia Forte (EF) apresentou os menores valores de adesão bacteriana quando comparado aos demais grupos.

Figura 8 – Dados de UFC/mL obtidos no teste de adesão bacteriana



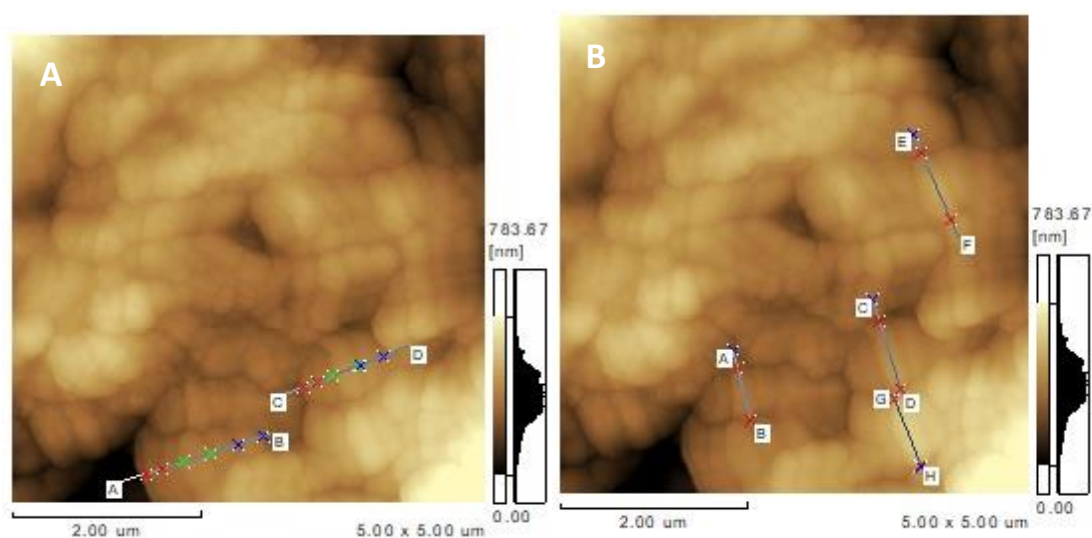
Legenda: FB (Filtek Bulk Fill), AB (Activa Bioactive), CN (Cention N), BB (Beautifil Bulk), EF (Equia Forte).

Fonte: GraphPad 6.0.

5.2 Microscopia de força atômica

Nas figuras 9 à 13, são apresentadas imagens características da cepa-padrão de *Streptococcus mutans*, obtidas por microscopia de força atômica com áreas de varredura de 5 μm x 5 μm . A partir dessas imagens, foram medidas as dimensões das células presentes na superfície de cada material. Os valores obtidos foram comparados por análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey.

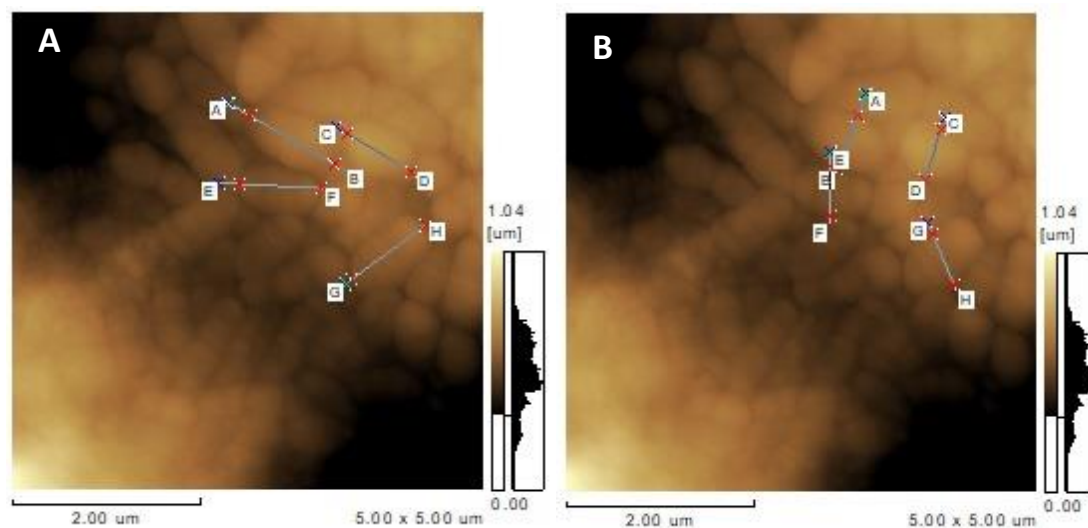
Figura 9 - Visualizações bidimensionais de *Streptococcus mutans*, obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 μm x 5 μm , no material Filtek Bulk



Legenda: a) comprimento das células presentes na amostra; b) largura das células presentes na amostra.

Fonte: Walter Miyakawa.

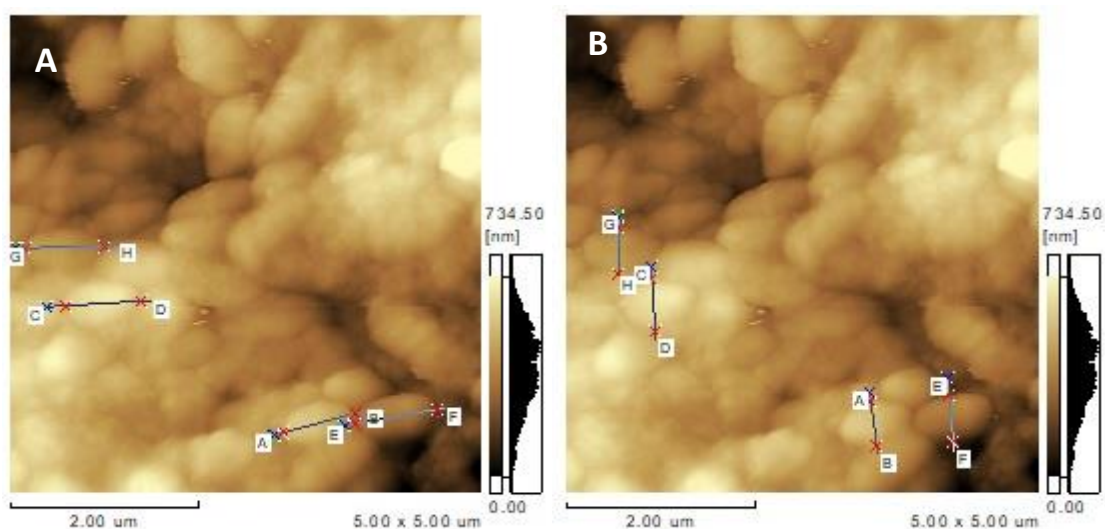
Figura 10 - Visualizações bidimensionais de *Streptococcus mutans*, obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 μm x 5 μm , no material Cention N



Legenda: a) comprimento das células presentes na amostra; b) largura das células presentes na amostra.

Fonte: Walter Miyakawa.

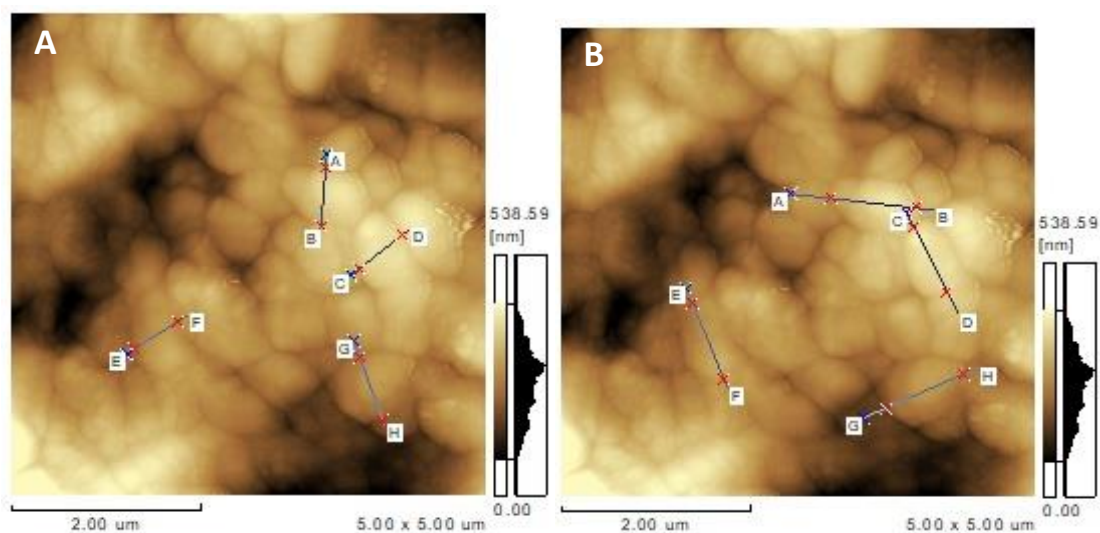
Figura 11 - Visualizações bidimensionais de *Streptococcus mutans*, obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 μm x 5 μm , no material Activa Bioactive



Legenda: a) comprimento das células presentes na amostra; b) largura das células presentes na amostra.

Fonte: Walter Miyakawa.

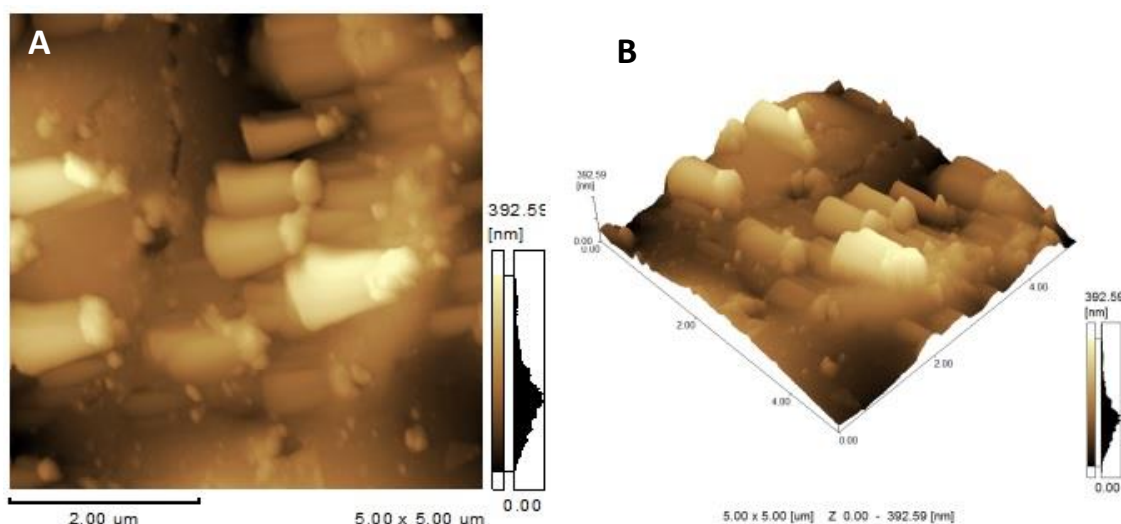
Figura 12 - Visualizações bidimensionais de *Streptococcus mutans*, obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 μm x 5 μm , no material Beautifil Bulk



Legenda: a) comprimento das células presentes na amostra; b) largura das células presentes na amostra.

Fonte: Walter Miyakawa.

Figura 13 - Visualizações bidimensionais da superfície, obtidas por microscopia de força atômica, com áreas de varredura de 5 μm x 5 μm , no material Equia Forte



Legenda: a) visualização de partículas de vidro presentes na superfície; b) superfície sem a presença de *Streptococcus mutans*

Fonte: Walter Miyakawa.

Utilizando a análise de variância com o teste de Tukey, presentes na Tabela 3, a análise de variância demonstrou que os comprimentos das células crescidas na resina Filtek Bulk possuem diferença estatística significativa somente quando comparadas com as células crescidas no material Cention N, que foi o material que gerou células com maiores comprimentos, em relação aos grupos analisados. Comparando os demais grupos (Beautifil Bulk e Activa Bioactive) com a resina Filtek Bulk, foi observado que não houve diferença estatística significativa no comprimento das células.

Tabela 3 – Valores de média $\pm$ desvio padrão do comprimento das células após o crescimento de *Streptococcus mutans* e resultados do teste de Tukey

Grupos	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*
Filtek Bulk	0,75 $\pm$ 0,005	A
Cention N	0,92 $\pm$ 0,10	B
Beautifil Bulk	0,86 $\pm$ 0,05	A
Activa Bioactive	0,83 $\pm$ 0,04	A

Fonte: OriginLab 8.5.

Comparando os valores das larguras das células, verificou-se que o material Filtek Bulk apresentou diferença estatística em relação às larguras das células crescidas nos demais grupos (Tabela 4). Porém da resina Filtek Bulk, não há diferença estatística das larguras das células crescidas nos materiais: Cention N, Beautifil Bulk e Activa Bioactive.

Tabela 4 - Valores de média $\pm$ desvio padrão da largura das células após o crescimento de *Streptococcus mutans* e resultados do teste de Tukey

Grupos	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*
Filtek Bulk	0,24 $\pm$ 0,05	A
Cention N	0,56 $\pm$ 0,03	B
Beautifil Bulk	0,61 $\pm$ 0,07	B
Activa Bioactive	0,50 $\pm$ 0,03	B

Fonte: OriginLab 8.5.

5.3 Análise da microdureza superficial (KHN)

Para a análise dos dados de microdureza entre os grupos antes e após o tratamento, foi realizada a análise de variância (ANOVA) dois fatores. De acordo com as médias, em KHN, obtidas a partir de três leituras, do esmalte, na superfície de cada espécime, observa-se que inicialmente os grupos apresentaram médias semelhantes na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da microdureza de superfície de esmalte (KHN) inicial e resultados do teste de Tukey

Grupos	Média $\pm$ DP	Grupos Homogêneos*
Esmalte ciclado	293,60 $\pm$ 39,30	A
Esmalte sem ciclar	275,86 $\pm$ 42,51	A
Filtek Bulk	291,38 $\pm$ 33,51	A
Cention N	294,12 $\pm$ 30,69	A
Equia Forte	296,92 $\pm$ 34,26	A
Activa Bioactive	305,73 $\pm$ 29,26	A
Beautifill Bulk	299,09 $\pm$ 35,53	A

Legenda: *As médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Fonte: GraphPad Prism.

De acordo com (ANOVA) de dois fatores de medidas repetidas houve diferença para tipo de tratamento ($p < 0,001$), para o tempo ($p < 0,001$) e para a interação entre esses dois fatores ($p < 0,001$). Na Tabela 6, são apresentadas as médias, em KHN, e pode se observar que o grupo do esmalte que passou pelo ciclo de desmineralização, descrito na tabela como esmalte ciclado (77,89 $\pm$ 45,19) junto com o adjacente à resina composta Filtek Bulk (121,32 $\pm$ 43,53) apresentaram os menores valores de microdureza, seguido do esmalte adjacente à restaurações com o material Beautifil Bulk (155,33 $\pm$ 57,35), diferindo significativamente dos demais grupos.

Tabela 6 – Valores de média $\pm$ desvio padrão da microdureza de superfície de esmalte (KHN) após o tratamento e resultados do teste de Tukey

Grupos	Média$\pm$DP	Grupos Homogêneos*		
Esmalte ciclado	77,89 $\pm$ 45,19	A		
Esmalte sem ciclar	266,26 $\pm$ 31,92			C
Filtek Bulk	121,32 $\pm$ 43,53	A	B	
Cention N	229,84 $\pm$ 32,75			C
Equia Forte	227,48 $\pm$ 39,77			C
Activa Bioactive	228,22 $\pm$ 38,31			C
Beautifill Bulk	155,33 $\pm$ 57,35		B	

Legenda: *As médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças estatisticamente significante.

Fonte: GraphPad Prism.

6 DISCUSSÃO

6.1 Metodologia

Atualmente novos materiais denominados bioativos têm sido introduzidos no mercado odontológico. A liberação de flúor desses materiais pode exibir um efeito antimicrobiano, inibindo a desmineralização e potencializando a remineralização dental (Hara et al., 2000). Podem apresentar efeitos na estrutura dentária, como aumento da resistência ao ataque ácido e prevenção da cárie secundária através da inibição da adesão bacteriana nas suas superfícies (Malik et al., 2018). Tornam-se, portanto, uma opção preventiva muito interessante, sendo uma alternativa na utilização em populações com alto índice de cáries.

Dentre os materiais selecionados, a resina convencional Filtek Bulk representa um material restaurador passivo, que não apresenta nenhuma propriedade bioativa; sendo utilizada no estudo como o controle negativo com relação aos materiais empregados.

Os demais materiais do estudo apresentavam um componente bioativo. A resina composta Beautifil Bulk, segundo as especificações do fabricante, apresenta o “efeito antiplaca” que age na redução da adesão do biofilme e inibe a colonização das bactérias. Na sua constituição estão presentes partículas de vidro com superfícies pré-ativadas (S-PRG), obtidas através da reação do vidro ácido reativo contendo fluoreto com poliácidos. O fabricante sugere que essa resina na presença de água é capaz de liberar e recarregar flúor; reduzindo a solubilidade do esmalte dental, estimulando a remineralização do esmalte e diminuindo a produção de ácidos pelas bactérias cariogênicas.

O outro material empregado, Cention N, é descrito como um novo material de preenchimento que pertence ao grupo de materiais “Alkasites”. Essa partícula alcalina patenteada se propõe a aumentar a liberação de íons de hidróxido para íons de cálcio e flúor, auxiliando na remineralização do esmalte dental, com baixa liberação de íons flúor em pH neutro, mas que, em pH ácido leva ao da liberação de íons.

Já o Activa Bioactive-Restorative é um material bioativo estético que promete interagir quimicamente com os dentes, liberando grande quantidade de fosfato e possuindo a capacidade de recarregar íons flúor. Contém um monômero ácido que potencializa a interação com a estrutura dentária, estimulando a formação da apatita e a remineralização natural. Este processo deveria unir a restauração e dente, preenchendo micro-lacunas, reduzindo a sensibilidade e, protegendo a estrutura dental contra cáries secundárias, microinfiltrações e falhas.

O último material avaliado o Equia Forte, que é um ionômero de vidro. Segundo o fabricante, esse material possui menor estresse de contração, além de proporcionar uma boa adaptação às paredes da cavidade, apresentar uma ótima estética e ter a capacidade de liberar flúor.

A seleção desses materiais, descrito como materiais bioativos, se deu pelo fato de serem materiais restauradores recém-lançados no mercado com a proposta de apresentarem em sua composição partículas capazes de interagir diretamente com a estrutura dental, liberar e recarregar íons flúor, possibilitando assim a remineralização do esmalte dental e aumento na resistência à colonização bacteriana.

6.2 Adesão bacteriana por *Streptococcus mutans*

A primeira hipótese de nulidade, que os materiais bioativos não interfeririam na adesão bacteriana por *Streptococcus mutans*, foi rejeitada.

O presente estudo demonstrou que não houve diferença estatística entre a resina composta convencional Filtek Bulk ($10,58 \pm 0,04$) e os materiais bioativos Activa Bioactive ($10,19 \pm 0,08$) e Cention N ($10,16 \pm 0,12$). No entanto, pode ser observado que a resina Filtek Bulk apresentou diferença significativa com relação aos materiais Beautifil Bulk e Equia Forte. O menor valor de adesão bacteriana foi apresentado pelo material ionômérico Equia Forte ($7,75 \pm 1,27$).

O crescimento e o desenvolvimento dos microrganismos bucais podem ser realizados *in vivo* e *in vitro*. O modelo *in vitro* tem a intenção de contribuir para o entendimento do comportamento do microrganismo no biofilme dental. A literatura apresenta o modelo *in vitro* como uma alternativa para simular situações clínicas que

ocorrem *in vivo* (Jalalian et al., 2015). A avaliação desse estudo em relação à adesão bacteriana aos materiais restauradores foi realizada *in vitro*, utilizando apenas o *Streptococcus mutans*. Alguns estudos empregaram uma metodologia semelhante à utilizada neste estudo (Paradella, 2008; Kimyai et al., 2011; Gautam et al., 2017), avaliando o crescimento do *Streptococcus mutans*. A escolha desse microrganismo para a realização dessa metodologia se deve ao fato dele estar relacionado diretamente ao início e à progressão da lesão de cárie (Andrade et al., 2011; Soria-Lozano et al., 2015).

O biofilme dental pode ser caracterizado como um agregado de microrganismos que se ligam entre si e com as superfícies dentais. Uma desvantagem presente nos materiais restauradores odontológico é a sua suscetibilidade ao acúmulo de biofilme (Derchi et al., 2016). No entanto, atualmente os materiais restauradores propõem uma menor ligação ao biofilme, consequentemente reduzindo e retardando a formação do mesmo sobre os dentes (Poggio et al., 2018). No entanto não observamos esse comportamento para todos os materiais que foram avaliados nesse estudo. Isso pôde ser observado nos materiais: Filtek Bulk, que apresentou o maior valor; e Activa Bioactive; que apesar de apresentar propriedades bioativas, não apresentou uma inibição da adesão bacteriana sobre sua superfície.

Um dos problemas relativos aos procedimentos restauradores é representado pela infiltração, que pode ocasionar lesões de cárie secundária. Isto é devido à presença de uma lacuna na interface adesiva, presente entre o material restaurador e o dente (Paradella, 2008; Poggio et al., 2018). O acúmulo de bactérias em materiais restauradores é capaz de degradar o material e tornar a sua superfície rugosa, e também pode causar a reinfecção bacteriana da interface entre a restauração e o dente (Fúcio et al., 2016). Com isso, torna-se extremamente desejável que o material restaurador apresente a propriedade de inibir a adesão de microrganismos sobre a sua superfície.

Acredita-se que os materiais denominado bioativos; que apresentam como principal característica à liberação de flúor podem exibir um efeito antimicrobiano, com consequência inibição da desmineralização e potencialização da remineralização dental (Hara et al., 2000). No entanto, o único material que apresentou uma menor adesão bacteriana à sua superfície foi o cimento de ionômero de vidro, Equia Forte.

Estudos já têm demonstrado que a liberação de flúor dos cimentos de ionômero de vidro tem efeitos na estrutura dentária, pois aumenta a resistência do dente a ácidos e previne a cárie secundária por inibição de bactérias (Malik et al., 2018). Outros estudos demonstram que a presença de fluoreto, alumínio e estrôncio, tem sido associado à redução da acidogenicidade do biofilme de *Streptotoccus mutans* (Fúcio et al., 2016; Naik et al., 2016). Pode ser que os materiais avaliados apresentem essa característica; mas não foi objeto do nosso estudo, devendo ser considerada em avaliações futuras.

Entretanto, estudos relatam que a rugosidade da superfície dos materiais é considerada um fato importante para a colonização inicial de bactérias e formação de biofilme, pois superfícies ásperas ou porosas resultam em um aumento da adesão bacteriana (Montanaro et al., 2004; Kimyai et al., 2011; Fúcio et al., 2016; Derchi et al., 2016; Poggio et al., 2018). O que explicaria o fato de todos os materiais analisados neste estudo apresentarem uma adesão bacteriana do *Streptotoccus mutans*, que pode estar relacionada à porosidade das suas superfícies.

A eficácia antibacteriana dos materiais bioativos considerados no presente estudo pode ser devido a composição química desses materiais e a propriedade de liberação de flúor. Ao relacionar os resultados da adesão bacteriana com a análise do microscópio de força atômica, foi constatado que a resina composta convencional Filtek Bulk ($0,75 \pm 0,005$) apresentou o menor valor em relação ao comprimento dos microrganismos presentes em sua superfície, quando comparada com os demais materiais bioativos; entretanto, apresentou diferença estatística apenas quando comparado com o material bioativo Cention N ($0,92 \pm 0,10$).

Quando analisada a largura dos microrganismos presentes na superfície dos materiais, foi verificado que a resina Filtek Bulk ($0,24 \pm 0,05$) também obteve o menor valor, exibindo uma diferença estatística quando comparada com os demais materiais bioativos. O material que apresentou o maior valor na largura dos microrganismos foi o material bioativo Beautifil Bulk ($0,61 \pm 0,07$), seguido do material Cention N ($0,56 \pm 0,03$) e por último do material restaurador Activa Bioactive ($0,50 \pm 0,03$).

A superfície do material Equia Forte foi analisada duas vezes em regiões distintas, sendo que, em ambas as regiões não foi constatada a presença de *Streptotoccus mutans*, podendo assim, observar a eficácia antibacteriana do material.

O microscópio de força atômica tem sido de muito interesse nos últimos anos devido a sua capacidade de sondar a estrutura, função e nanomecânica celular inerente a células biológicas específicas (Cross et al., 2006). Analisando os resultados podemos observar que as dimensões das células apresentadas neste estudo se equivalem as dimensões obtidas por Cross et al. (2006), onde as células de *Streptococcus mutans* possuíam um comprimento de 0,95 μm e altura de 0,57 μm .

Em relação aos resultados obtidos através do microscópio de força atômica, ficou constatado que, quanto maior a quantidade de microrganismos aderidos, menor foi o tamanho das células, porque elas competem entre si pelo espaço. Quando a superfície apresenta uma menor adesão de microrganismos, o tamanho das células é maior, pois elas não competem por espaço. Isso ficou evidente na avaliação das células presentes na superfície do material restaurador Filtek Bulk (comprimento de 0,75 μm e altura de 0,24 μm), que apresentaram as menores dimensões e maior adesão; o que confirma a relação entre: (quantidade de células x dimensões x espaço).

6.3 Microdureza do esmalte adjacente

A segunda hipótese de nulidade afirmada, que os materiais bioativos não interfeririam na microdureza do esmalte adjacente às restaurações realizadas com esses materiais, foi rejeitada. Os materiais empregados nesse estudo interferiram no processo de desmineralização da superfície do esmalte adjacente.

Para que esses dados pudessem ser coletados, o estudo desenvolvido utilizou um modelo de ciclagem de pH *in vitro*, com intuito de simular os processos de desmineralização e remineralização que ocorrem em condições *in vivo*. Essa metodologia consiste na imersão dos espécimes em soluções desmineralizantes (ácidas) e remineralizantes (saliva – pH 7), em diferentes tempos e concentrações. Essas soluções seguem um padrão de formulação sendo compostas por soluções ácidas, à base de ácido láctico ou acético com a inclusão de cálcio, fosfato e atualmente a inclusão do flúor (Rehder-Neto, 2008). Nesse estudo optamos pelo emprego da solução de Buskes et al. (1985) como solução desmineralizante, que possui um pH

4,7 capaz de simular um ambiente que apresenta alta índice de cárie; e utilizamos a saliva proposta no estudo de Gohring et al. (2004) como solução remineralizante por exibir um pH 7,0; que pode ser considerado um pH saudável para a cavidade oral.

Foi realizado um estudo piloto com o objetivo de verificar o tempo necessário para o armazenamento dos espécimes nas soluções de des-remineralização. Após oito dias de ciclagem, foi constatado que os espécimes apresentavam erosão em suas superfícies, impossibilitando a medida da microdureza. Sendo assim, o tempo estipulado para a duração da ciclagem de pH foi de 7 dias. A literatura descreve que as lesões de cárie artificiais são produzidas por imersão dos substratos em géis ou soluções, com um pH variando entre 4,4 e 5, por 16 h, e um período de até 28 dias (Buzalaf et al., 2010). Nesse estudo os espécimes ficaram imersos durante 6 h em solução desmineralizante, pois o intuito do estudo não foi de gerar uma cavidade no esmalte, mas sim apenas de simular condições de uma cavidade bucal com alto risco de cárie. Em seguida, os espécimes ficaram imersos durante 18 h em solução remineralizante, completando um total de 7 dias (ciclos). Esse ciclo foi capaz de simular uma condição de alto risco de cárie, sem, no entanto, formar nenhum tipo de erosão.

Com intuito de comparar a capacidade de diferentes materiais restauradores bioativos de protegerem o esmalte adjacente após desafios cariogênicos, foi utilizado um microdurômetro para avaliar a microdureza da superfície do esmalte. Através do penetrador de diamante do tipo Knoop é medida a resistência do esmalte. Quanto maior é o seu conteúdo mineral, maiores são os valores de microdureza (Cury et al., 2017). No presente estudo, a solução desmineralizante foi capaz de diminuir a microdureza do esmalte em torno das restaurações com os materiais Filtek Bulk ($121,32 \pm 43,53$) e Beautifil Bulk ($155,33 \pm 57,35$). Os espécimes de esmalte que não apresentaram nenhuma restauração ($77,89 \pm 45,19$) e foram ciclados nas soluções, obtiveram valores semelhantes aos da resina Filtek Bulk ($121,32 \pm 43,53$). Percebendo que os valores atingidos se devem ao fato da resina Filtek não possuir em sua composição nenhum íon capaz de interagir positivamente com o esmalte adjacente; sendo assim, incapaz de alterar o conteúdo mineral do esmalte durante o desafio cariogênico. Entretanto, a resina Beautifil Bulk ($155,33 \pm 57,35$), que possui em sua constituição partículas de cimento de ionômero de vidro com superfície pré-ativada (S-PRG), capazes de liberar e recarregar flúor e reduzir a solubilidade do

mineral dentário, não demonstrou um resultado favorável nesta metodologia; apesar de propor apresentar essas propriedades relevantes. Dasgupta et al. (2018), em um estudo para a verificação da liberação de flúor de materiais restauradores, constataram que o material Beautifil Bulk apresentou uma menor liberação de flúor quando comparado com outros materiais, podendo então explicar o porquê dos resultados negativos do material Beautifil Bulk no presente estudo.

Por outro lado, os materiais restauradores Equia Forte ($227,48 \pm 39,77$), Cention N ($229,84 \pm 32,75$) e Activa Bioactive ($228,22 \pm 38,31$), exibiram valores positivos, similares aos dos espécimes de esmalte que não sofreram ação das soluções des/remineralizantes ($266,26 \pm 31,92$). Pôde-se observar que esses materiais foram capazes de suportar a ação da solução desmineralizante, não ocorrendo uma diminuição acentuada da microdureza do esmalte circundante. Esse resultado se deve ao fato de todos os três materiais apresentarem propriedades bioativas, como a liberação e recarga de íons cálcio e flúor, que auxiliam na remineralização do esmalte dental (Serra, Cury, 1992).

Estes resultados confirmam a ação dos materiais bioativos descritos neste estudo, em relação aos efeitos preventivos da desmineralização, quando comparados a resina convencional. O flúor presente nesses materiais, apresenta um resultado relevante nos processos de desmineralização e remineralização do esmalte dental. A presença de íons de flúor na cavidade oral induz a precipitação mineral na estrutura do dente na forma de fluorapatita (Cury, Tenuta, 2008; Byeon et al., 2016). A fluorapatita apresenta menor solubilidade quando comparada a hidroxiapatita, resultando em uma maior resistência ácida do esmalte, sendo altamente eficaz em converter o equilíbrio mineral para uma condição menos cariogênica. Isso se deve a capacidade que o flúor tem em remineralizar o dente e/ou inibir a desmineralização (Ten Cate, 1990; Tenuta, Cury, 2010).

Sabemos que uma análise da profundidade de desmineralização e remineralização irão trazer mais dados para que possamos interpretar de forma mais completa a ação dos materiais bioativos sobre a estrutura dental; no entanto o conhecimento da microdureza superficial pode nos dar a informação sobre a possível influência desses materiais nos processos des/re que ocorrem na cavidade oral. Sendo assim, a partir desse estudo pudemos constatar que materiais restauradores que possuem flúor em sua composição auxiliam na manutenção e proteção da

interface dente/restauração. Sabendo que alguns materiais possuem a capacidade de liberar e recarregar flúor, seria importante o desenvolvimento de novos estudos científicos que utilizassem metodologias propondo maiores desafios em consonância com os que ocorrem na cavidade bucal, para assim analisar a resposta dos materiais restauradores bioativos com profundidade e determinar as situações clínicas onde o seu emprego tem um papel efetivo e desejável. Sem, no entanto, comprometermos o conceito de que a melhor condição clínica é a do dente íntegro.

7 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados nas condições experimentais deste trabalho, baseado nas hipóteses nulas consideradas, pode-se concluir que:

- a) Os materiais denominados bioativos (Beautifil Bulk e Equia Forte) apresentaram interferência na adesão bacteriana por *Streptococcus mutans*, sendo o cimento de ionômero de vidro o que apresentou menor de adesão bacteriana;
- b) Os materiais que apresentam em sua composição íons capazes de interagir com o dente, interferiram na microdureza do esmalte adjacente às restaurações com esses materiais, quando comparados com a resina convencional.

REFERÊNCIAS*

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5721-32. PubMed PMID: 16272510. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
- Anusavice KJ. *Phillips Materiais Dentários*. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. 592 p.
- Aponso S, Ummadi JG, Davis H, Ferracane J, Koley D. A Chemical Approach to Optimizing Bioactive Glass Dental Composites. *J Dent Res.* 2018 Nov 21:22034518809086. doi: 10.1177/0022034518809086. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30461335.
- Azevedo CS, Trung LC, Simionato MR, Freitas AZ, Matos AB. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. *Braz Oral Res.* 2011 Sep-Oct;25(5):407-13. PubMed PMID: 22031053.
- Baratieri L, Monteiro S, Edelhoff D, Maia EV, Alvim H, Tunas I, et al. *Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades*. 2. ed. São Paulo: Santos; 2015. 852 p.
- Barbosa RP, Pereira-Cenci T, Silva WM, Coelho-de-Souza FH, Demarco FF, Cenci MS. Effect of cariogenic biofilm challenge on the surface hardness of direct restorative materials in situ. *J Dent.* 2012 May;40(5):359-63. doi: 10.1016/j.jdent.2012.01.012. Epub 2012 Feb 2. PubMed PMID: 22326721.
- Bayrak S, Tunc ES, Aksoy A, Ertas E, Guvenc D, Ozer S. Fluoride release and recharge from different materials used as fissure sealants. *Eur J Dent.* 2010 Jul;4(3):245-50. PubMed PMID: 20613911; PubMed Central PMCID: PMC2897856.
- Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res.* 1985;19(6):490-6. doi: 10.1159/000260887. PubMed PMID: 3865704.
- Buzalaf MA, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010 Jul-Aug;18(4):316-34. Review. PubMed PMID: 20835565; PubMed Central PMCID: PMC5349073.
- Byeon SM, Lee MH, Bae TS. The effect of different fluoride application methods on the remineralization of initial carious lesions. *Restor Dent Endod.* 2016 May;41(2):121-9. doi: 10.5395/rde.2016.41.2.121. Epub 2016 May 10. PubMed PMID: 27200280; PubMed Central PMCID: PMC4868875.
- Clarke JK. On the Bacterial Factor in the Ætiology of Dental Caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;5(3):141-147. PMCID: PMC2047899.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cross SE, Kreth J, Zhu L, Qi F, Pelling AE, Shi W, et al. Atomic force microscopy study of the structure-function relationships of the biofilm-forming bacterium *Streptococcus mutans*. *Nanotechnology*. 2006 Feb 28;17(4):S1-7. doi: 10.1088/0957-4484/17/4/001. Epub 2006 Jan 25. PubMed PMID: 21727347.

Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res*. 2008 Jul 1;20(1):13-6. PubMed PMID: 18694871.

Dasgupta S, Saraswathi MV, Somayaji K, Pentapati KC, Shetty P. Comparative evaluation of fluoride release and recharge potential of novel and traditional fluoride-releasing restorative materials: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2018 Nov-Dec;21(6):622-626. doi: 10.4103/JCD.JCD_338_18. PubMed PMID: 30546207; PubMed Central PMCID: PMC6249945.

de Andrade IM, Cruz PC, da Silva CH, de Souza RF, Paranhos Hde F, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and *mutans streptococci* in denture biofilm. *Gerodontology*. 2011 Dec;28(4):264-70. doi: 10.1111/j.1741-2358.2010.00378.x. PubMed PMID: 20518813.

Derchi G, Vano M, Barone A, Covani U, Diaspro A, Salerno M. Bacterial adhesion on direct and indirect dental restorative composite resins: An in vitro study on a natural biofilm. *J Prosthet Dent*. 2017;117(5):669–76. doi:10.1016/j.prosdent.2016.08.022

Ferracane JL. Buonocore Lecture. Placing dental composites--a stressful experience. *Oper Dent*. 2008 May-Jun;33(3):247-57. doi: 10.2341/07-BL2. Review. PubMed PMID: 18505214. doi:10.2341/07-BL2

Francisconi LF, Honório HM, Rios D, Magalhães AC, Machado MA, Buzalaf MA. Effect of erosive pH cycling on different restorative materials and on enamel restored with these materials. *Oper Dent*. 2008 Mar-Apr;33(2):203-8. doi: 10.2341/07-77. PubMed PMID: 18435196.

Fúcio SB, Paula AB, Sardi JC, Duque C, Correr-Sobrinho L, Puppim-Rontani RM. *Streptococcus Mutans* Biofilm Influences on the Antimicrobial Properties of Glass Ionomer Cements. *Braz Dent J*. 2016 Nov-Dec;27(6):681-7. doi: 10.1590/0103-6440201600655. PubMed PMID: 27982179.

Gautam AK, Thakur R, Shashikiran ND, Shilpy S, Agarwal N, Tiwari S. Degradation of Resin Restorative Materials by *Streptococcus Mutans*: A Pilot Study. *J Clin Pediatr Dent*. 2017;41(3):225-7. doi: 10.17796/1053-4628-41.3.225. PubMed PMID: 28422601.

Göhring TN, Zehnder M, Sener B, Schmidlin PR. In vitro microleakage of adhesive-sealed dentin with lactic acid and saliva exposure: a radio-isotope analysis. *J Dent*. 2004 Mar;32(3):235-40. doi: 10.1016/j.jdent.2003.11.003. PubMed PMID: 15001289.

Hals E, Nernaes A. Histopathology of in vitro caries developing around silver amalgam fillings. *Caries Res.* 1971;5(1):58-77. doi:10.1159/000259733 PubMed PMID: 5277150.

Hara, A, Magalhães C, Rodrigues Jr A, Serra M. Efeito cariostático de restaurações adesivas em superfícies radiculares: estudo in vitro. *Pesq Odont Bras.* 2000 Abr/Jun;14(2): 113-118. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-74912000000200004>.

Jalalian E, Mofrad G, Ahmadpour S. Adhesion of Streptococcus Mutans to GlassIonomer, BisCem Cement and Enamel: An in Vitro Study. *J Dent (Tehran).* 2015 Sep;12(9):678-85. PubMed PMID: 27148379; PubMed Central PMCID: PMC4854747.

Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater.* 2009 Aug;25(8):1001-6. doi: 10.1016/j.dental.2009.02.009. Epub 2009 Mar 29. Review. PubMed PMID: 19332352.

Jenkinson HF. Adherence and accumulation of oral streptococci. *Trends Microbiol.* 1994 Jun;2(6):209-12. PubMed PMID: 8087454.

Jorge AOC. Microbiologia bucal. 3 ed. São Paulo: Santos; 2007. 198 p.

Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C35-8. Review. PubMed PMID: 15286119.

Kimyai S, Lotfipour F, Pourabbas R, Sadr A, Nikazar S, Milani M. Effect of two prophylaxis methods on adherence of Streptococcus mutans to microfilled composite resin and giomer surfaces. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Jul 1;16(4):e561-7. PubMed PMID: 20711117.

Malik S, Ahmed MA, Choudhry Z, Mughal N, Amin M, Lone MA. Fluoride Release From Glass Ionomer Cement Containing Fluoroapatite And Hydroxyapatite. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2018 Apr-Jun;30(2):198-202. PubMed PMID: 29938418.

Matos I, Sab T, Juliboni N, Guerra R, Miranda M. Utilização de dentes bovinos como possível substituto aos dentes humanos nos testes in vitro: revisão de literatura. *UFES Rev Odontol.* 2008;10(2):58-63. doi: <https://doi.org/10.21722/rbps.v0i0.481>.

McCabe JF, Yan Z, Al Naimi OT, Mahmoud G, Rolland SL. Smart materials in dentistry. *Aust Dent J.* 2011 Jun;56 Suppl 1:3-10. doi: 10.1111/j.1834 7819.2010.01291.x. Review. PubMed PMID: 21564111.

Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, et al. Evaluation of bacterial adhesion of Streptococcus mutans on dental restorative materials. *Biomaterials.* 2004 Aug;25(18):4457-4463. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.11.031 PubMed PMID: 15046936.

Miyakawa W, Pizzo AM, Rodrigues N, Zezell D. Atomic force microscopy of laser irradiated dental enamel. *Acta Microscopica*. 2001;10(1):129-33.

Naik RG, Dodamani AS, Khairnar MR, Jadhav HC, Deshmukh MA. Comparative assessment of antibacterial activity of different glass ionomer cements on cariogenic bacteria. *Restor Dent Endod*. 2016 Nov;41(4):278-282. Epub 2016 Sep 20. PubMed PMID: 27847749

Naoum S, Ellakwa A, Martin F, Swain M. Fluoride release, recharge and mechanical property stability of various fluoride-containing resin composites. *Oper Dent*. 2011 Jul-Aug;36(4):422-32. doi: 10.2341/10-414-L. Epub 2011 Aug 5. PubMed PMID: 21819201.

Palenik CJ, Behnen MJ, Setcos JC, Miller CH. Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers in vitro. *Dent Mater*. 1992 Jan;8(1):16-20. PubMed PMID: 1521678.

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]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de São José dos Campos; 2008.

Pedrini D, Junior EGJ, Vasconcelos AC. Retention of oral microorganisms on conventional and resin-modified glass-ionomer cements. *Pesqui Odontol Bras*. 2001 Jul/Set;15(3):196-200. ISSN 1517-7491. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-74912001000300004>.

Perondi P, Oliveira P, Cassoni A, Reis A, Rodrigues J. Resistência coesiva e microdureza de materiais ionoméricos. *Braz Dent Sci*. 2014 Jan/Mar;17(1):16-22.

Pin ML, Abdo RC, Machado MA, da Silva SM, Pavarini A, Marta SN. In vitro evaluation of the cariostatic action of esthetic restorative materials in bovine teeth under severe cariogenic challenge. *Oper Dent*. 2005 May Jun;30(3):368-75. PubMed PMID: 15986958.

Poggio C, Vialba L, Marchioni R, Colombo M, Pietrocola G. Esthetic restorative materials and glass ionomer cements: Influence of acidic drink exposure on bacterial adhesion. *Eur J Dent*. 2018;12(2):204-9.

Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J*. 2008;19(1):21-7. PubMed PMID: 18438555.

Rehder-Neto FC. Progressão de lesões artificiais de cárie em substrato humano e bovino [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2008.

Ribeiro TR, Duarte RM, Silva FDSCM, Forte FDS, Sampaio FC, Barbosa JKG. Avaliação *in vitro* da microdureza do esmalte adjacente a restaurações após desafio cariogênico. Rev Odonto Ciênc. 2009;24(1):49-53.

Rodrigues E, Delbem AC, Pedrini D, Cavassan L. Enamel remineralization by fluoride-releasing materials: proposal of a pH-cycling model. Braz Dent J. 2010;21(5):446-51. PubMed PMID: 21180802.

Salas CF, Guglielmi CA, Raggio DP, Mendes FM. Mineral loss on adjacent enamel glass ionomer cements restorations after cariogenic and erosive challenges. Arch Oral Biol. 2011 Oct;56(10):1014-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.03.005. Epub 2011 Apr 13. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.03.005. PubMed PMID: 21489401.

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 Feb;23(2):143-7. PubMed PMID: 1641453.

Shashibhushan KK, Basappa N, Subba Reddy VV. Comparison of antibacterial activity of three fluorides- and zinc-releasing commercial glass ionomer cements on strains of mutans streptococci: an in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2008;26 Suppl 2:S56-61. PubMed PMID: 19075449.

Silva B, Maltz M. Cárie Secundária- Uma revisão de literatura. Rev da Faculdade de Odontol. de Porto Alegre. 2004 Jul;45(1):29-33.

Silva KG, Pedrini D, Delbem AC, Cannon M. Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials. Oper Dent. 2007 Jul-Aug;32(4):328-35. doi:10.2341/06-89 PubMed PMID: 17695604.

Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, Pérez-Laguna V, et al. In vitro effect photodynamic therapy with different photosensitizers on cariogenic microorganisms. BMC Microbiology. 2015;15:187. doi:10.1186/s12866-015-0524-3.

Ten Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. J Dent Res. 1990 Feb;69 Spec No:614-9; discussion 634-6. Review. doi:10.1177/00220345900690S120. PubMed PMID: 2179322.

Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. Braz Oral Res. 2010;24 Suppl 1:9-17. PubMed PMID: 20857070.

Vahabi S, Fekrazad R, Ayremlou S, Taheri S, Zangeneh N. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on Streptococcus mutans: an in vitro study. J. Dent. 2011 Oct 2;8(2):48-54. PubMed PMID: 21998808

Zanet CG, Fava M, Alves LA. In vitro evaluation of the microhardness of bovine enamel exposed to acid solutions after bleaching. Braz Oral Res. 2011 Nov-Dec;25(6):562-7. PubMed PMID: 22147239.