

Larissa Ferreira Pacheco

**Estudo da Microdureza e Profundidade de Lesões de Cárie
Artificiais Produzidas por Diferentes Métodos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Mestre em Odontologia –
Área de Odontopediatria.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Maria Puppim-Rontani

Piracicaba

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

P115e	Pacheco, Larissa Ferreira. Estudo da microdureza e profundidade de lesões de cárie artificiais produzidas por diferentes métodos / Larissa Ferreira Pacheco. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Regina Maria Puppini-Rontani. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Dentina. 2. Cárie dentária. 3. Microscopia eletrônica de varredura. I. Puppini-Rontani, Regina Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Evaluation of dentin caries like-lesions produced by different models

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dentin. 2. Dental caries. 3. Scanning electron microscope

Área de Concentração: Odontopediatria

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Regina Maria Puppini-Rontani, Eliana Rodrigues, Angela Scarpato Caldo-Teixeira

Data da Defesa: 26-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata LARISSA FERREIRA PACHECO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, reading "Regina Maria Puppin Rontani".

Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

A handwritten signature in blue ink, reading "Angela Scarparo Caldo Teixeira".

Profa. Dra. ANGELA SCARPARO CALDO TEIXEIRA

A handwritten signature in blue ink, reading "Eliana Rodrigues".

Profa. Dra. ELIANA RODRIGUES

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade de Campinas, nas pessoas do Diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**. E Diretor associado, **Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim**.

À **Profª. Drª. Maria Beatriz Duarte Gavião**, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Odontologia.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado.

À **Profª. Drª. Maria Beatriz Duarte Gavião**, pelo profissionalismo e dedicação com que conduz seus trabalhos e orientações.

À **Profª. Drª. Marinês Nobre dos Santos Uchôa**, que nos ajudou e orientou sempre da melhor maneira possível.

Ao **Prof. Dr. Antônio José Nogueira**, que mesmo à distância sempre incentivou e contribuiu para o meu amor à Odontopediatria.

Ao **Prof. Dr. Érico Barbosa Lima** e **Profª. Drª. Regina Célia Rocha Peres**, pelas trocas de experiência na Clínica e exemplo de dedicação à Odontopediatria.

Aos **Profs. Drs. Flávio Henrique Baggio Aguiar, Érico Barbosa Lima, Fernanda Miori Pascon** pela imensa e significativa contribuição apresentada no exame de qualificação desta dissertação.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora, **Área de Materiais Dentários**, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao engenheiro **Marcos Blanco Cangiani (Marcão)**, por todo o apoio e disponibilidade em ajudar nos experimentos laboratoriais. Obrigada pela paciência.

Ao **Adriano**, do Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da FOP/UNICAMP, pela disposição e incentivo a pesquisa. Obrigada pela compreensão durante a realização das fotomicrografias deste trabalho.

Ao **Marcelo Corrêa Maistro, e Maria de Lourdes Gaspar Correa Campos (Tuka)**, da Área de Odontopediatria, pela amizade e disposição em ajudar.

À **Érica A. Pinho Sinhoreti, Raquel Q. Marcondes César Sacchi e Roberta Clares Morales dos Santos**, pelo profissionalismo e carinho com que tratam os alunos de pós-graduação.

À **Maria Elisa dos Santos e Eliane Melo Franco de Souza** por estarem sempre prontas a ajudar.

A todos os **funcionários** da FOP – UNICAMP, que nos recebem sempre com sorriso e fazem com que seja possível o andamento de todos os trabalhos realizados nesta faculdade.

A **todos** os alunos e professores da graduação que guardaram e doaram os dentes permanentes extraídos. Sem eles a pesquisa não teria sido realizada.

Às amigas do Doutorado (1ª e 2ª turma) da Área de Odontopediatria, **Renata Rocha Flávia, Annicele, Thais Parisotto e Patrícia**. Obrigada pela oportunidade da troca de experiência e pelos conselhos recebidos. Em especial quero agradecer a **Fê, Carol, Kamila e Karllinha** pela amizade, pelo carinho e atenção recebida, sem a ajuda de vocês com certeza tudo teria sido muito mais difícil, vou guardar vocês sempre no meu coração.

Às amigas do Mestrado da Área de Odontopediatria, **Marina, Marcela, Fernanda**. Obrigada pelo crescimento pessoal que vocês me proporcionaram e pelos bons momentos compartilhados. Vocês foram muito importantes nesta caminhada.

À **Eliana**, voz da minha consciência. Obrigada pela ajuda fundamental neste projeto e por me orientar nos caminhos certos a seguir.

À **Éfani**, minha “dupla dinâmica”. Obrigada por ser sempre amiga e companheira, você com certeza fez a minha vida aqui em Piracicaba ser mais alegre.

À **Renata Jaime**, exemplo dedicação e amor pelo trabalho realizado, força de vontade e garra para continuar lutando pelos seus objetivos. Mesmo de longe sempre me incentivou e participou da minha vida profissional e pessoal.

À **Izabel, Carlos e Ivanilde** pelo carinho com que me acolheram e pela boa vontade em ajudar nos pequenos detalhes do dia-a-dia.

À **Darlle, Natalia, Lígia e Marina**, pela amizade e companheirismo.

À **Larissa, Márcia, Karen, Andrea, Camila e Suzara**, minhas grandes amigas. Não tenho como agradecer através de palavras o quanto elas foram importantes na minha caminhada, mesmo estando distantes. Obrigada por tudo!

Aos amigos “**piracicabanos**” e “**não-piracicabanos**”, que sempre estiveram ao meu lado e torceram para que meus projetos fossem realizados. Obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A ***Deus*** que ilumina, guia, protege e provém tudo em minha vida.

Aos meus pais, **Amariles e Nelson**, por toda dedicação e pelos esforços em construir um lar cheio de amor e afeto. Obrigada pelo exemplo de ética, honestidade, força e carinho. Eu dedico todos os meus passos e minhas vitórias a vocês. Eu amo vocês!

Ao meu irmão, **Diego**, exemplo de companheirismo, garra e coragem para buscar seus ideais. Você sempre será para mim um espelho a ser observado. Eu tenho muito orgulho de você!

À minha família, minhas avós **Albina e Terezinha**, aos meus tios **Marcilio, Rosa Cecília, Mônica, Antenor, Ademar, Lazaro Augusto, Maria do Carmo, Marta, José, Leticia e Tereza**, aos meus primos. Obrigada por todo carinho.

À minha amiga e “anjo da guarda”, **Karina Giovanetti**, pela amizade e carinho, sempre me apoiando em meus projetos como se fossem dela. Obrigada pelo companheirismo e paciência nas horas em que eu mais precisei.

À minha orientadora, **Profª. Drª. Regina Maria Puppim-Rontani**, exemplo de conhecimento e dedicação a docência. Obrigada pela paciência, orientação, por contribuir de maneira significativa para a minha formação como Odontopediatra e para minha formação científica, e além disso, pela amizade e afeto.

A utilização de materiais restauradores unidos ao substrato dentinário tem sido um desafio que vem sendo superado nos últimos anos. Pesquisas têm conseguido aperfeiçoar a união dos materiais ao substrato dentinário, porém, a maioria dos estudos utiliza dentina hígida, uma vez que a utilização da dentina após remoção de cárie, isto é o substrato dentinário afetado pela cárie torna as pesquisas de difícil execução. Dentre os principais motivos destaca-se a difícil seleção de lesões similares, sendo, portanto um desafio para os pesquisadores pela variabilidade encontrada nos resultados não se alcançando a devida evidência científica para a aplicação das técnicas de união. A fim de aprimorar os estudos sobre este tipo de substrato, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes modelos de produção de cárie: modelo biológico e modelo *in situ*, comparando-os quanto a microdureza e profundidade de cárie à lesão de dentes extraídos com cárie. Foram utilizados 15 terceiros molares, compreendendo 5 dentes extraídos com cárie (cárie oclusal de profundidade média – **C, grupo controle**), 10 dentes eram hígidos, dos quais 5 foram utilizados para o modelo de produção de cárie *in situ* (**IS**) e 5 para o modelo biológico (**MB**). De todos os dentes foram obtidos blocos de dentina de 4x4x2 mm. Os blocos de dentina hígida foram analisados quanto à microdureza de superfície (SMH) e depois submetidos ao processo de cárie artificial. Após o desafio cariogênico, os blocos dos 3 grupos (**C, IS, e MB**) foram seccionados longitudinalmente ao centro obtendo-se dois hemi-blocos um dos quais foi submetido à análise da microdureza longitudinal (CSMH), e o outro à análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A microdureza longitudinal foi medida em 4 colunas com 8 pontos diferentes (com distância de 20µm entre as cinco indentações iniciais e 100µm entre as três finais), obtendo-se uma média de medidas por bloco. Os hemi-blocos restantes foram submetidos à análise em MEV para verificação da profundidade da lesão (X25 e X200), que foi medida na região mais profunda de cada uma delas. Os dados obtidos na análise da microdureza de superfície e longitudinal da lesão foram submetidos ao teste t, ANOVA e teste de Tukey, respectivamente ($p<0,05$). E os dados obtidos na análise de profundidade da lesão pelo MEV foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey ($p<0,05$). Os resultados da

microdureza de superfície após a produção de cárie mostrou que houve diferença significativa entre os modelos de produção de cárie biológico e *in situ*, sendo que o modelo biológico não diferiu da lesão de cárie natural. Na microdureza longitudinal o modelo *in situ* apresentou nenhuma diferença estatística da cárie natural, mas o menor valor de CSMH foi observado na cárie produzida pelo modelo biológico. Na análise do MEV a lesão de cárie em dentina produzida pelo modelo biológico e a dentina cariada naturalmente tiveram profundidades similares, e o modelo *in situ* apresentou a menor profundidade de lesão de cárie. Baseado nos resultados obtidos neste estudo, foi concluído que os dois métodos de produção de cárie mostraram características similares ao da lesão de cárie natural em dentina nos diferentes testes realizados: microdureza de superfície e longitudinal, e Microscopia Eletrônica de Varredura.

Palavras-chave: Dentina, Cárie Dentária, Testes de Microdureza, Microscopia Eletrônica de Varredura.

ABSTRACT

The use of restorative materials attached to the dentin substrate has been a challenge that has been overcome in the last years. Research has been able to improve the bonding between the materials and dentin substrate, however, the most studies use sound dentin, since the use of dentin after caries removal, such as dentin substrate affected make research difficult to perform. Among the main reasons stand the difficult selection of similar lesions, and, therefore a challenge to the researchers for the variability found in the results not reaching the proper scientific evidence for the application of bonding techniques. In order to improve the researches about this specific substrate, the aim of this study was to evaluate different models to produce caries, using the biological model, and the *in situ* model, comparing them about the cross-sectional microhardness and caries depth with the natural carious lesion, thus, extract teeth with caries dentin. Were used 15 third molars, including 5 teeth with natural caries (occlusal caries with average depth- **CN**), 10 teeth were sound, which 5 were used for the *in situ* production model of caries (**IS**) and 5 for the biological model (**MB**). Of all the teeth were obtained dentin samples with 4x4x2mm. Sound dentin samples were submitted to surface microhardness analysis and after to artificial caries process. After the cariogenic challenge, samples of the three groups (**CN**, **IS**, e **MB**) were cross sectioned to the center obtaining two sections which one was submitted cross-sectional microhardness analysis (CSMH) and the other to Scanning Electron Microscopy (SEM). Samples were analyzed as cross-section hardness in 4 columns with 8 different points (with a distance of 20µm between the first five indentations and 100µm between the last three) obtaining average measures for sample. The rest of sections were submitted to analysis by SEM to check the depth of the lesion, which was measured in the deepest region of each one. The data obtained by microhardness analysis and the depth lesion by SEM were submitted to ANOVA 2 criteria and t test, and ANOVA and Tukey test, respectively ($p < 0,05$). Results of surface microhardness after to artificial caries process showed significantly difference between biological model and *in situ* model, and the biological model had no difference to natural caries. In the cross-sectional microhardness *in situ* model present no statistically difference from natural caries, but the lowest CSMH was

observed for biological model of caries producing. SEM analysis, the artificial carious dentin lesions produced by biological model and natural carious dentin had similar depth, and the *in situ* model had the lowest depth of carious lesion. Based on the obtained results of this study it was concluded that both methods showed similar characteristics to natural caries dentin but concerning different tests: surface and cross-sectional microhardness, and scanning electron microscopy.

Key-words: dentin, caries dentin, microhardness tests, Scanning Electron Microscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO	5
2.1. Evaluation of Dentin Caries Like-Lesions Produced by Different Models	5
3. CONCLUSÕES	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5. APÊNDICES	25
5.1. Figura 1 - Confecção do flat de Dentina	25
5.2. Figura 2 - Esquema representativo da confecção das amostras do grupo com dentina cariada pelo método biológico	25
5.3. Figura 3 - Esquema representativo do dispositivo intra-oral utilizado para produção da cárie <i>In situ</i>	26
5.4. Figura 4 - Blocos no meio de cultura para desenvolvimento da cárie biológica	26
5.5. Figura 5 - Troca de meio de cultura realizada a cada 48 horas	27
5.6. Figura 6 - Imagens do Microscópio Eletrônico de Varredura – Modelo de produção de Cárie Biológico	28
5.7. Figura 7 - Imagens do Microscópio Eletrônico de Varredura – Modelo de produção de Cárie <i>In situ</i>	29
5.8. Figura 8 - Imagens do Microscópio Eletrônico de Varredura – Lesão de Cárie Natural	30
5.9. Figura 9 - Imagens dos blocos, após a produção de cárie.	31
6. ANEXOS	32

A preservação máxima da estrutura dentária é um dos objetivos da odontologia restauradora contemporânea, substituindo o conceito tradicional da remoção completa do tecido cariado por um procedimento menos invasivo, o qual envolve a remoção parcial da cárie dentinária, protegendo também o tecido pulpar. A remoção parcial da cárie encontra-se baseada na diferenciação da dentina cariada, a qual possui duas zonas distintas: camada infectada e camada afetada (Fusayama e Terashima, 1972). A dentina infectada, mais externa, apresenta tecido amolecido e necrosado, não passível de remineralização e altamente infectado por bactérias. Entretanto, a dentina afetada por cárie, mais endurecida, apresenta-se passível de remineralização e com pequena colonização bacteriana (Hahn e Hellwing, 2004), além de possuir íntima relação com a câmara pulpar. Estes fatores possibilitam a preservação da dentina afetada por cárie, durante o preparo cavitário em cavidades profundas, quando sinais e sintomas de envolvimento pulpar não estiverem presentes.

Além da preservação da estrutura dentinária, a resistência de união, ou melhor, o sucesso do procedimento restaurador também é importante já que a adesão dos materiais se dá em níveis microscópicos, envolvendo ligações químicas e físicas com o substrato dentinário. Com o acelerado desenvolvimento dos sistemas adesivos assim como outros materiais restauradores, a determinação da resistência de união às estruturas dentinárias modificadas por cárie se tornou de grande importância e interesse.

Até a década de 1990, poucos estudos avaliaram as propriedades adesivas em substratos clinicamente relevantes como dentina cariada e/ou esclerótica, devido às

dificuldades técnicas dos testes existentes até então, já que essas lesões são geralmente pequenas e apresentam-se de forma irregular (Sadek, 2005).

Pequenas modificações no substrato dentinário podem ser responsáveis por significativas alterações no comportamento da união destes aos materiais restauradores, como nos tratamentos da dentina com ácidos, oxidantes (hipoclorito de sódio, EDTA) e outros agentes químicos ou também as próprias alterações no substrato decorrente de processos de envelhecimento, traumatismos e cárie dentária. Estudos que utilizam dentina afetada por cárie têm demonstrado resistência de união inferior a da dentina hígida devido respectivamente, a maior porosidade na dentina intertubular pela perda mineral em decorrência do processo da cárie e a presença intratubular dos cristais de cálcio ácido-resistentes que impedem a infiltração dos monômeros resinosos dentro dos túbulos (Yoshiyama et al., 2002; Arrais et al., 2004). Além disso, a dentina apresenta-se desmineralizada pelos ácidos produzidos pelas bactérias e com conteúdo orgânico alterado pelas toxinas exógenas produzidas pelas mesmas, produzindo um substrato com propriedades químicas, físicas e mecânicas diferentes do substrato hígido. Portanto, a interação molecular que ocorre entre os materiais adesivos e a dentina alterada pela cárie ou cariada se dá de forma diferenciada dos demais substratos dentinários (Spencer et al., 2000; 2005).

Metodologias que envolvam dentina cariada são difíceis de serem realizadas, devido à dificuldade de obtenção desse tipo de substrato. Frente a esse fato, é importante a análise do substrato cariado artificialmente para que possam substituir os dentes cariados *in vivo* (dentina cariada natural). Tendo em vista que os parâmetros envolvidos no desenvolvimento das lesões artificiais de cárie têm um papel significativo sobre as lesões

produzidas, o método de desenvolvimento de cárie tem papel preponderante na lesão formada, uma vez que dependendo do método empregado, pode ocorrer maior quantidade de desmineralização no substrato, o processo des-remineralização pode não ocorrer, produzindo uma estrutura da lesão cariosa muito diferente daquela que ocorre naturalmente no meio ambiente bucal (Haj-Ali et al., 2006; Hsu et al., 2008).

Modelos de produção de lesões cariosas *in situ* e *in vitro* têm sido estudados, procurando-se aproximar-se da produção da lesão natural de cárie. Dentre os modelos mais utilizados encontram-se os modelos químicos, dinâmicos ou estáticos, estes últimos utilizando-se de ácidos na forma de gel ou solução. Entretanto, estes são limitados, pois muitas vezes precisam de um período maior para desenvolver a lesão de cárie. O método químico dinâmico, onde se utiliza soluções des-remineralizantes através de ciclagens, produz lesões com profundidade semelhante a lesão natural de cárie porém com características estruturais um pouco diferentes (Nishitani et al., 2005; Sonoda et al., 2005).

Outro modelo que poderia ser utilizado seria o modelo *in situ*, uma vez que as lesões são produzidas no meio ambiente bucal, passível de todos os fatores que afetam o desenvolvimento das lesões cariosas, como o pH do meio, colonização bacteriana, formando um biofilme capaz de produzir toxinas e ácidos que desmineralizam os substratos dentários e as trocas de íons com saliva, o que permitiria a formação de lesões semelhantes a lesão de cárie natural (Cury et al., 2000, 2001). Entretanto, apresenta como desvantagens a necessidade de voluntários que apresentem padrões de atividade de cárie e que colaborem com os parâmetros da pesquisa.

Quanto ao método biológico para produção de cárie *in vitro*, este favorece a padronização das lesões e também apresenta características do meio semelhante a cárie

natural em atividade, induzindo o crescimento bacteriano através do fornecimento de nutrientes favorecendo o desenvolvimento da cárie.

Uma das formas de se observar as características estruturais das lesões é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), através desta são geradas imagens que podem mostrar a organização estrutural dos diferentes substratos produzidos. E também através dos testes de Microdureza que mostram o grau de desmineralização causado pelos diferentes métodos de produção de cárie realizados (Nakajima et al., 2005). Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar a estrutura morfológica dos substratos artificialmente cariados pelos modelos biológico e *in situ*, e compará-los com o substrato de cárie natural. Esta dissertação está baseada na resolução CCPG 002/06, a qual dispõe a respeito do formato das teses de mestrado e doutorado aprovados pela UNICAMP, e comporta um capítulo.

CAPÍTULO 1

EVALUATION OF DENTIN CARIES LIKE-LESIONS PRODUCED BY DIFFERENT MODELS*

Larissa Ferreira Pacheco- DDS, Master Student of Pediatric Dentistry, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Éfani Caroline de Freitas Banzi- DDS, Master Student of Pediatric Dentistry, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Eliana Rodrigues- DDS, PhD, Post-doctoral of Pediatric Dentistry, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Regina Maria Puppín-Rontani - DDS, MSc, PhD, Titular Professor of Pediatric Dentistry, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Regina M. Puppín-Rontani (Corresponding author)
Pediatric Dentistry Department – Piracicaba Dental School
University of Campinas
Av. Limeira 901, 13414-018 – Piracicaba – SP – Brasil.
Tel: 55 19 34125286 – FAX: 55 19 3412 5218
E-mail: rmpuppín@fop.unicamp.br
Home page: <http://www.unicamp.br/fop>

* Este artigo foi submetido Journal of Dentistry.

ABSTRACT

Objectives. This study evaluated comparatively the caries-like lesions produced by biological and *in situ* artificial models with natural caries (control group) in permanent dentin. **Study design.** Ten third sound molars and five third molars with carious lesion were used. The occlusal enamel was removed and dentin blocks with 4x4x2mm were obtained. Surface microhardness analyses (SMH₁) were made in all blocks before caries production. Half of sound dentin blocks were immersed in BHI broth with *S. mutans* for 14 days (biological model) and the other half were set in the intra oral device for 14 days to produce the *in situ* model. After development of artificial caries, all blocks were submitted to a final surface microhardness analyses (SMH₂) and were longitudinally sectioned on the center of the carious lesion, obtaining two sections which one was submitted cross-sectional microhardness (CSMH) and the other to Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis. Four columns of 8 indentations each were made in all blocks for cross-sectional microhardness and one measurement of carious dentin depth were made by SEM. The factors of this study were compared using two-way ANOVA factorial, considering caries producing methods and depth of measurements as study factors. T-test was used as a post-hoc test. The data from dentin caries lesions depth were submitted to one-way ANOVA and Tukey tests. All tests were considered at 0.05 significant level. **Results.** The biological model presented the lowest dentin surface values (SMH₂), similar to natural caries lesion. There was no difference in dentin cross-sectional microhardness between the *in situ* model of caries production and natural caries lesion, and the biological model had the lowest values. SEM showed that caries like-lesions produced biological model and natural lesions had similar depth. Those values were significantly higher than those obtained by *in situ*

model. **Conclusion.** Based on the obtained results of this study it was concluded that both models showed similar characteristics (microhardness and depth of lesions) to natural caries dentin.

INTRODUCTION

According to previous studies, carious dentin consists of a superficial first layer and a deeper second layer. The outer layer was characterized as highly decalcified, physiologically unrecalcifiable, showing degenerated collagen fibers with virtual disappearance of cross-links indicating irreversible denaturation of collagen. The inner layer was depicted as intermediately decalcified, physiologically recalcifiable, fuchsin-unstainable, with expanded odontoblastic processes, sound collagen fibers, and apatite crystals bound to the fibers (1,2,3). The mainly aim of contemporary restorative dentistry in the excavation of carious dentin is to remove only the outer layer (4).

Consequently this substrate modified by carie became relevant in daily practice. Several other substrate-related variables may affect the clinical outcome of bonded restorations (2,3).

The wetness of dentin surfaces, the presence of pulpal pressure, and the thickness of dentin are extremely important variables during bonding procedures, especially when testing bond strength of adhesive materials *in vitro* with the intention of simulating *in vivo* conditions (5). The humid and organic nature of carious dentin makes this hard tissue very challenging to bond to. Carious dentin has a Knoop hardness that is less than that of normal dentin (1,6), indicating that it has a certain level of demineralization, even though the

lumina of many dentin tubules are occluded with mineral crystals (7) to form the transparent layer.

Although most bond strength testing is done on normal dentin for convenience, clinically most bonding substrates are not normal, but rather are caries-affected dentin or sclerotic dentin. Unfortunately, little work has been published on these clinically-relevant substrates. Some studies recently attempted to simulate the properties and characteristics of sclerotic or caries-affected dentin *in vitro* (8).

The limited size and shape of caries-affected dentin creates technical difficulties when investigators attempted conventional testing methods. (8,9)

In vitro studies produce artificial caries to simulate the cariogenic challenge and analyze the cariostatic effect of materials by mineral loss (10), microhardness (11), inhibition zone formation and depth of developed outer lesion (10,11).

The artificial caries models found in the literature focus on physicochemical aspects of dental caries, namely static (acid gel or solutions) (10,11) or dynamic (pH regimens) (4,5) chemical models, and can also use microorganisms as acid producers in cultures (11,12), known as biological models. Different methodologies have been indicated to assess the depth of carious lesions produced in these models, such as, polarized light microscopy (13), confocal laser scanning microscopy and Scanning electron microscopy evaluations (14). Also some methods are cheap and easier of accomplishing as the microhardness test. Faltou uma frase de ligação, ou seja, que relembre o objetivo do trabalho ou o próprio objetivo. Thus, two methods were used: SEM and Surface and Cross-Sectional Microhardness to evaluate the standard of the lesion produced, according the microhardness values.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of Dentin Specimens

This study was performed under the protocol number 111/2005 approved by the Research Ethics Committee of the Dental School of Piracicaba, University of Campinas, Brazil.

Ten sound extracted third molars and five third molars with caries lesion in medium dentin (evaluated by radiography) were selected. Teeth were stored in 0.1% thymol for 1 month and then stored in distilled water at 4°C until use. The occlusal enamel was sectioned perpendicular to tooth long axis with a water-cooled low-speed diamond saw (Isomet; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA) to expose the subjacent dentin. Dentin was wet ground flat with 180- and 400-grit silicon carbide paper until a uniform enamel-free dentin surface was obtained. The roots were sectioned 1 mm short of the cement enamel junction and discarded. The pulp chamber was filled with composite resin. Blocks were produced with a 4x4x2 mm area, covered with an acid-resistant nail polish (Colorama; CEIL Com. Exp. Ind. Ltda., São Paulo, SP, Brazil), leaving just the crown surface free to be submitted to artificial caries development.

Artificial Caries Development

Two models of artificial caries development were used: biological (broth culture with *Streptococcus mutans* - UA159) and *in situ* (acrylic palatal appliances). Three groups (n=5) were formed according to the caries development (Table 1).

Table 1 – Groups according methods of caries production.

Caries Production Model	<i>GI</i>	Biological Model – Dentin artificial carious lesions produced by <i>S. mutans</i> biofilm
	<i>GII</i>	<i>In situ</i> Model - dentin artificial caries lesions by <i>in situ</i>
	<i>GIII</i>	Natural Caries Lesions - Extracted teeth with dentin caries lesions (control group).

Blocks from Group I were fixed with orthodontic wire on the lids of glass vials containing 22 mL of sterile distilled water and were taken to the Nuclear Energy Center for Agriculture (CENA - USP) to be submitted to gamma radiation (15) in a dose of 14.5 kGy - for about 12.5 h. The room temperature was constant (27 ° C), and then transferred to another glass vial containing 22 mL of sterile brain-heart infusion (BHI) broth (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) supplemented with yeast extract (Himedia Laboratories, PVT Ltd., Mumbai, India), with 0.5% glucose (Synth; LabSynth, São Paulo, SP, Brazil), 1% sucrose (Synth; LabSynth) and 2% *S. mutans* (UA159) for development of the artificial carious lesions (16). The concentration of this bacterial suspension was determined by measuring absorption at 660 nm (A660) (17). In order to adjust the number of viable bacteria to A660, the number of colony-forming units *per* milliliter of bacterial

suspension(cfu/mL) was determined with the use of standard spreading techniques at carious optical densities (17). Inoculation occurred only in the first day of the experiment, but the broth was renewed every 48 h during 14 days (16). Contamination of the broth was checked every day using Gram staining.

For *in situ* model (Group II), one acrylic palatal appliance was made for a volunteer, which was prepared with cavities of 5x5x2mm corresponding to the dentin specimen, which was set in the five sterile dental specimens. These were covered with a plastic grid attached to 1 mm from the specimen to allow the accumulation of dental biofilm (18,19). The Volunteer used the device daily including to sleep, throughout the 14 days (study period). The removal of intra-oral palatal appliance occurred only during meals. Written guidelines were issued to volunteer emphasizing the non-use of products containing fluoride, except recommended. The usual teeth brushing and the brushing of inner surface of the device was made with standard toothpaste fluoride-free. To simulate the cariogenic challenge, a drop of 20% sucrose solution was placed in each block of dentin and 5 min after the device was put back in the mouth, and the frequency and time drip predetermined (8 times per day). After the 14 days, the plastic grid that covered the dentin specimens were removed with a scalpel blade number 15 and the dentin specimens were analyzed(18,19).

After artificial caries development, specimens were washed with distilled water and sectioned longitudinally on the center of the carious lesion with a water-cooled low-speed diamond saw (Isomet; Buehler Ltd.) providing two halves (20).

Scanning Electron Microscopy Evaluations (SEM)

After the caries production, a hemisection of each block was prepared for SEM evaluation. They were dehydrated in ascending grades of ethanol (25% for 20 min, 50% for 20 min, 75% 20 min, 95% 30 min, 100% 60 min). After the final ethanol step the specimens were dried by immersion in hexamethyldisilazane (HMDS) for 10 minutes, placed on filter paper inside a covered glass vial, and air-dried at room temperature. (21) The hemisections were mounted on aluminum stubs with double-sided carbon tape (SEM, NISSHIN EM Co. Ltd., Tokyo - Japan), and sputter coated at 10 mA for 2 min (SCD050 sputter coater, Balzers, Liechtenstein). They were observed under a Scanning Electron Microscopy (JSM 5600LV, JEOL, Tokyo – Japan) at an accelerating voltage of 10 kV, a working distance of 20 mm, and 200x magnification.

From each dentin specimen, one image was obtained in a low magnification (X25) in order to identify a whole dentin caries lesion and established the highest depth region of the caries lesion. Then, in a higher magnification (X200) measurement at the deepest point was accomplished.

Surface and Cross-sectional Microhardness Tests

In order to confirm the presence of caries lesion on specimens it was accomplished a surface microhardness (SMH) using a Shimadzu HMV-2000 microhardness tester with a Knoop diamond under a 25g load for 10 s, before (SMH₁) and after (SMH₂) cariogenic challenge. Five indentations, spaced 100 µm from each other were made on the specimen surface.

To the cross-sectional microhardness (CSMH), after SMH analysis, all blocks were longitudinally sectioned through the center. To measure CSMH, a half of each block was

embedded in acrylic resin (Buehler Transoptic Powder, Lake Bluff, IL, USA) and the cut surfaces were exposed and polished. Next, the cross-sectional microhardness test was performed using the same load of SMH. Testing was performed on each block, with 32 indentations distributed in four columns of 8 indentations each at distances of 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 and 330 μm .

Statistical Analyses

Data from SMH₁ and SMH₂ were submitted to t-test ($p < 0.05$). In order to compare the groups (Groups I, II and III) data from SMH₂ and SMH₁ and natural caries lesions were submitted to one-way ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$).

The factors of this study were compared using two-way ANOVA factorial, considering caries producing models and depth of measurements as study factors. T-test was used as a post-hoc test. And all tests were considered at 0.05 significant level.

The same tests were applied for the data obtained in the SEM.

RESULTS

Dentin Surface and Cross-sectional Microhardness

All specimens showed similar values of SMH₁. After submitted to cariogenic challenge, *in situ* model provided higher surface microhardness than biological model ($p < 0.01$). Actually, biological model provided similar SMH₂ as natural caries lesions (NCL) and lower than *in situ* model ($p < 0.01$) (Table 2).

Table 2 - Surface microhardness average ($\bar{x}$) and standard deviation (SD) for all groups evaluated.

	Biological Model		<i>In situ</i> Model		NCL
	SHM ₁	SHM ₂	SHM ₁	SHM ₂	
$\bar{x}$	75.11a	5.44b	75.88a	11.47c	5.64b
SD	3.156	0.667	5.500	0.322	0.151

Averages followed by different small letters are significantly different statistically (t test at 5% of probability).

Averages followed by similar small letters are not significantly different statistically (t test at 5% of probability).

Two-way ANOVA test showed there was not significant interaction between studied factors ($p=0.4319$). However, both studied factors showed significant differences when considered independently.

Considering the models of caries production, *in situ* model showed no statistically significant difference from natural caries, concerning CSMH. The lowest CSMH value was observed for biological caries model (Table 3).

Table 3 – Cross-sectional microhardness average obtained by the three models of caries producing.

Methods of caries lesion producing		
<i>In situ</i>	Biological	Natural
25.01244 a	20.56181 b	23.29335 a

Averages followed by different small letters are significantly different statistically (t test at 5% of probability).

Averages followed by similar small letters are not significantly different statistically (t test at 5% of probability).

Regarding, the lowest values were observed until 30 μm , being considered as highly carious tissue. There was a significant difference of CSMH values in the depth of 30 to 330 μm . Also it was observed an increase in the value until the highest values between 220 and

330 μm were reached, regardless of caries production model, considered as sound dentin (Table 4).

Table 4 – Cross-sectional microhardness average obtained from all dentin depths (μm).

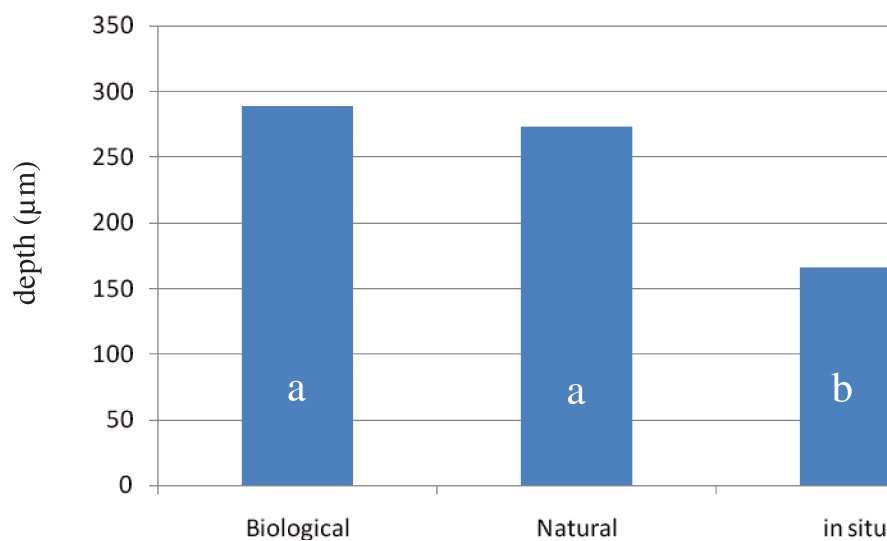
Depth in dentin (μm)							
10	30	50	70	90	110	220	330
7.55 g	10.27 g	14.15 f	18.47 e	23.44 d	30.19 c	35.55 b	44.02 a

Averages followed by different letters are significantly different statistically (t test at 5% of probability)

Depth caries lesions in dentin

The depths of the caries lesions at SEM showed that natural caries lesions and lesions produced by biological model showed similar depth of caries lesion, being the depths significantly higher than those obtained by *in situ* method (Figure1).

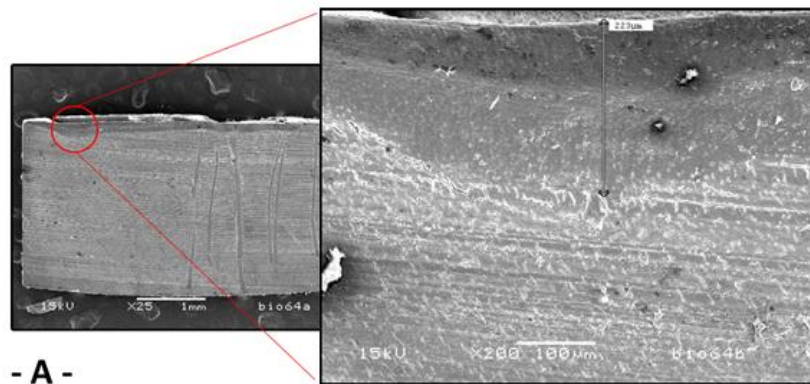
Figure 1 – Dentin caries depth values regarding methods of caries lesion production.



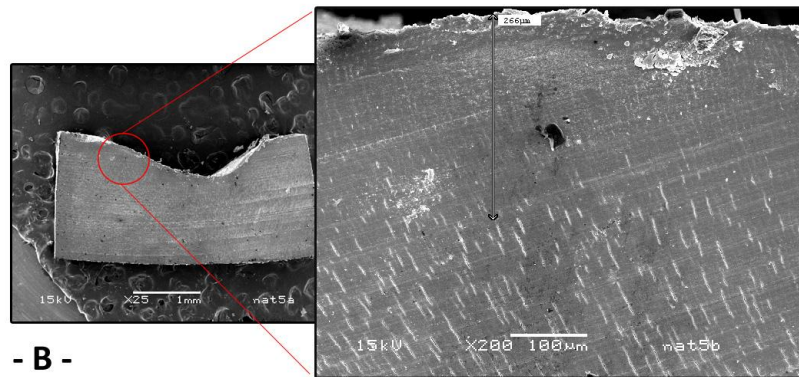
Averages followed by different small letters are significantly different statistically (t test at 5% of probability).

Averages followed by similar small letters are not significantly different statistically (t test at 5% of probability).

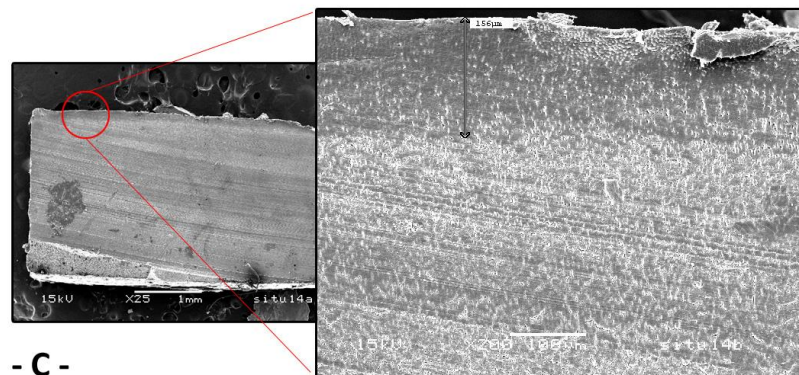
Figure 2 showed visible alterations and well delimited of the surface to center of the dentin in caries lesions produced by biological model and natural caries lesions. The image obtained for caries *in situ* lesion also was visible, but there was no difference between carious and sound dentin. This result can be related with lower values of depth measured in the image.



- A -



- B -



- C -

Figure 2 – Electronmicrography from dentin caries lesions. Red circle shows the deepest dentin caries lesion region that was measured in the specimen, showed in the highest magnification (X200) on right side. (A) dentin caries lesion produced by biological model, (B) dentin caries lesion produced naturally in oral cavity, note the different surfaces over the lesion length. (C) dentin caries lesion produced by *ins situ* model.

DISCUSSION

The development of methodology for easy and standard *in vitro* studies is very important, mainly in the contemporaneous world where techniques and materials are improved or created and need to be tested all the time. Thus, several materials are being used under caries-affected or infected dentin to invasive minimal technique like stepwise excavation. For that, developed materials meet the requirements of the modern treatments. It is necessary that *in vitro* methods reproducing the conditions of dental substrate be created (22).

The SEM and Microhardness tests were used in this study to evaluate the demineralization of the dentin and also to allow the visualization of the characteristics of caries lesions as continuity and depth (14).

SEM images showed that the biological model and natural carious lesions were more aggressive, developing deeper lesions and causing a higher demineralization in dentin structure than in the *in situ* model (Figs. 2A and 2B), which produced thinner lesions (Fig. 2C).

The results of CSMH showed no significant difference between *in situ* model and natural carious lesion, but both differ of the biological model. The broth used for the development of caries lesions was completely different; being biological model the one which produced more changes in dentin surface having as possible cause the direct contact of the surface with the broth suffering action of microorganisms during 14 days without interval for treatment or demineralization/remineralization process.

There was formation of caries lesions in all the specimens considering CSMH, what changed among the different methods were structural aspects and facilities of technique that

it are important for *in vitro* researches, therefore the best method that represents the points raised above is the biological (20).

In the biological model, the constant change of broth (every 48 h) might have promoted an unsaturated environment of minerals, leading to a continuous demineralization of specimens. In addition, sucrose and glucose supplied in the broth represents a nutrient source for acid production by *S. mutans*, keeping the pH around 4.0 (23).

Unlike this conditions, the specimens in the *in situ* method have external factors that can contribute to a possible remineralization process, as saliva buffering capacity and *Streptococcus mutans* count reducing the severity of the carious lesion produced (24), and were maintained at pH minimum around 5.5 (24). The caries lesions produced with biological model presented a structure defined and more similar of the natural carious lesion.

The caries lesions produced *in vitro* still need be studied for that to have more control of the results and it favors the development of reliable clinical technique.

CONCLUSION

Based on the obtained results of this study it was concluded that both models showed similar characteristics (microhardness and depth of lesions) to natural caries dentin.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by FAPESP (Process n° 2008/02331-6) from State of São Paulo, Brazil. The authors are grateful to Department of Pediatric Dentistry and Dental Materials (Piracicaba Dental School - University of Campinas) for their cooperation and to

Mr Marcos Cangiani e Marcelo C Maistro for been helpful during the developing of this study.

REFERENCES

1. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res* 1983;62(1):7-10.
2. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci* 2003; 111(3):243-252.
3. Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J Dent Res* 2001;80(8):1768-1771.
4. Banerjee A, Kidd EA, Watson TF. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. *Caries Res* 2000;34(2):144-150.
5. Perdigão J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Tome AR, Vanherle G, Lopes AB. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996; 12: 262-271.
6. Nakajima M, Sano H, Urabe I, Tagami J, Pashley DH. Bond strength of single-bottle dentin adhesives to caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2000 Jan-Feb; 25(1): 2-10.
7. Shimizu C, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. Carious change of dentin observed on longspan ultrathin sections. *J Dent Res* 1981;60(11):1826-1831.
8. Nakajima M, Kitasako Y, Okuda M, Foxton RM, Tagami J. Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal and caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Feb 15; 72(2): 268-75.
9. Fusayama T and Terashima S. Differentiation of two layers of carious dentin by staining. *Bull Tokyo Med Dent Univ*. 1972; 19: 83-92.
10. Kuramoto A, Imazato S, Walls AWG, Ebisu S. Inhibition of root caries progression by an antibacterial adhesive. *J Dent Res* 2005;84:89-93.

11. Okuda M, Pereira PNR, Nikaido T, Tagami J. Evaluation of *in vitro* secondary caries using confocal laser scanning microscope and X-ray analytical microscope. *Am J Dent* 2003;16:191-196.
12. Lima LM, Motisuki C, Spolidorio DMP, Santos-Pinto L. *In vitro* evaluation of probiotics microorganism adhesion to an artificial caries model. *Eur J Clin Nutrit* 2005;59:884-886.
13. Savarino L, Breschi L, Tedaldi M, Ciapetti G, Tarabusi C, Greco M et al.. Ability of restorative and fluoride releasing materials to prevent marginal dentine demineralization. *Biomaterials* 2004;25:1011-1017.
14. Kuang-Wei H, Marshall SJ, Pizon LM, Watanabe L, Saiz E, Marshall G. SEM evaluation of resin-carious dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *Dent Mater* 2008;24(7):880-887.
15. White JM, Goodis HE, Marshall SJ, Marshall GW. Sterelization of Teeth by Gamma Radiation. *J Dent Res* 1994; 73(9):1560-1567.
16. Banerjee A, Kidd EA, Watson TF. In vitro evaluation of five alternative methods of carious dentine excavation. *Caries Res* 2000;34(2):144-150.
17. Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials *in vitro*. *Caries Res* 2002;36:101-107.
18. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formers in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000; Nov-Dec; 34(6): 491-7.
19. Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. In situ study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and caries. *Braz Dent J*. 2001; 12(2): 101-4.
20. Carvalho FG, Fucio SBP, Sinhoreti MAC, Correr-Sobrinho L, Puppim-Rontani RM. Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis of Depth of Dentin Caries-Like Lesions In Primary Teeth. *Braz Dent J* 2008; 19(2):139-144.
21. Perdigão J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. A field emission SEM comparison of four post-fixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res* 1995;26:1111-20.

22. Sattabanasuk V, Shimada Y, Tagami J. Bonding of resin to artificially carious dentin. J Adhes Dent. 2005 Autumm; 7(3): 183-92.
23. Hashizume LN, Shinada K, Kawaguchi Y, Yamashita Y. Sequence of ultrastructural changes of enamel crystals and Streptococcus mutans biofilm in early enamel caries *in vitro*. J Med Dent Sci 2002;49:67-75.
24. Smith PW, Preston KP, Higham SM. Development of an in situ root caries model .A. In vitro investigations. J Dent. 2005 Mar;33(3):253-67.

CONCLUSÕES

Diante do objetivo e da metodologia empregada no presente estudo, concluiu-se que os dois métodos de produção de cárie mostraram características similares ao da lesão de cárie natural em dentina nos diferentes testes realizados: Microdureza de superfície e longitudinal, e Microscopia Eletrônica de Varredura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Arrais CA, Gianini M, Nakagima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 58-64.
2. Fusayama T and Terashima S. Differentiation of two layers of carious dentin by staining. *Bull Tokyo Med Dent Univ.* 1972; 19: 83-92.
3. Hahn P and Hellwig E. An in vitro investigation of penetration depth of dentine bonding agents into carious dentine. *J Oral Rehabil.* 2004; 31: 1053-1060.
4. Haj-Ali R, Walker M, Williams K, Wang Y, Spencer P. Histomorphologic characterization of noncarious and caries-affected dentin/adhesive interfaces. *J Prosthodont.* 2006 Mar-Apr; 15(2): 82-8.
5. Hsu KW, Marshall SJ, Pinzon LM, Watanabe L, Saiz E, Marshall GW. SEM evaluation of resin-cariou dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *Dent Mater.* 2008 Jul; 24(7): 880-7. *Epub* 2007 Dec 21.
6. Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR, Wadgaonkar B, Waller J, Agee K, Pashley DH. Tensile strength of mineralized/demineralized human normal and carious dentin. *J Dent Res.* 2005 Nov; 84(11): 1075-8.
7. Sadek FT, Goracci C, Cardoso PE, Tay FR, Ferrari M. Evaluation of the adhesion of fiber posts to intraradicular dentin. *J Adhes Dent.* 2005; winter; 7(4): 297-302.
8. Spencer P, Wang Y, Katz JL, Misra A. Physicochemical interactions at the dentin/adhesive interface using FTIR chemical imaging. *J Biomed Opt.* 2005 May-Jun; 10(3): 031104.
9. Spencer P, Wang Y, Walker MP, Wieliczka DM, Swafford JR. Interfacial Chemistry of the dentin/adhesive bond. *J Dent Res* 2000; 79: 1458-1463.
10. Sonoda H, Banerjee A, Sherriff M, Tagami J, Watson TF. An in vitro investigation of microtensile bond strength of two dentin adhesives to caries-affected dentin. *J Dent.* 2005 Apr; 33(4): 335-42. *Epub* 2004 Dec 9.
11. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K et al. Bonding to self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res.* 2002; 81: 556-560.

Figura 1. Confecção do flat de Dentina.



Figura 2. Esquema representativo da confecção das amostras do grupo com dentina cariada pelo modelo biológico.



Figura 3. Esquema representativo do dispositivo intra-oral utilizado para produção de cárie pelo modelo *in situ*.

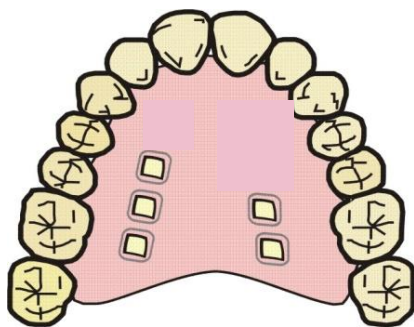


Figura 4. Blocos no meio de cultura para desenvolvimento de cárie artificial pelo modelo biológico.

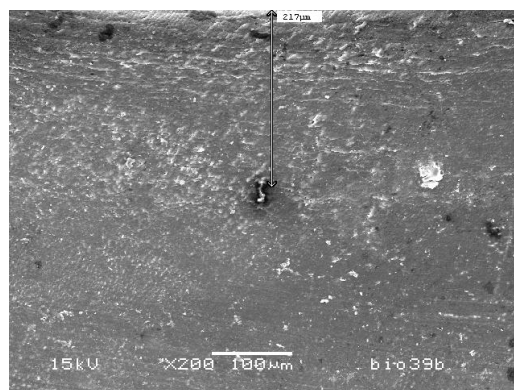
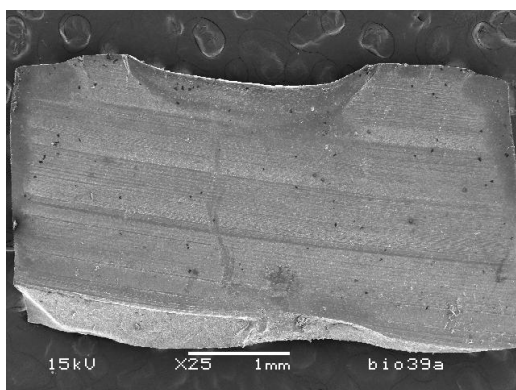


Figura 5. Troca de meio de cultura realizada a cada 48 horas.





Figura 6. Imagens do Microscópio Eletrônico de Varredura – Modelo de Produção de Cárie Biológico.



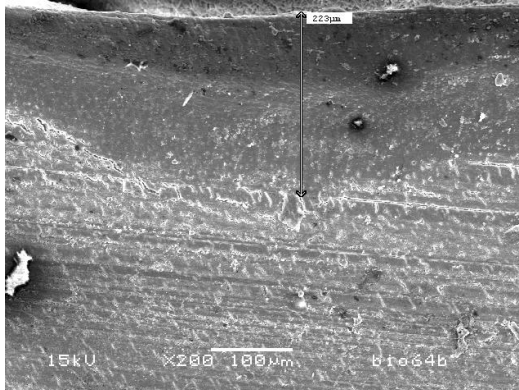
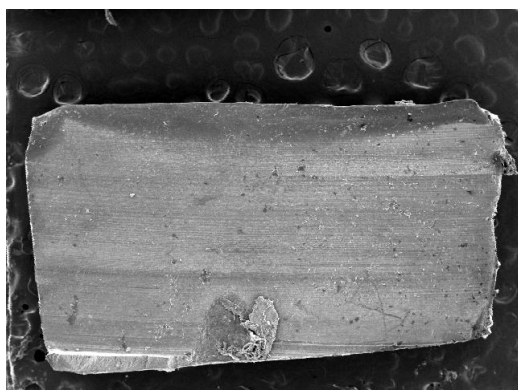
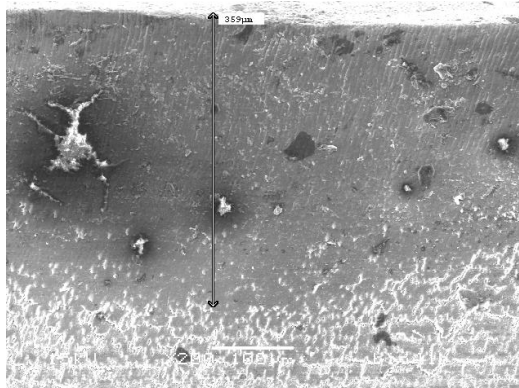
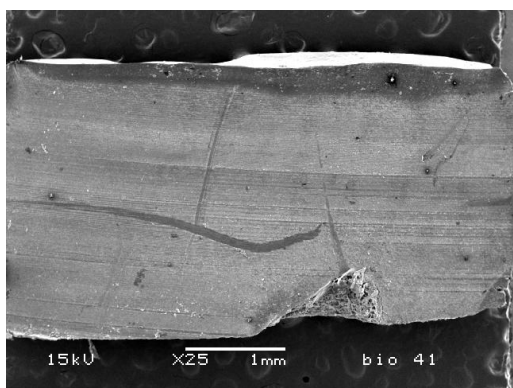
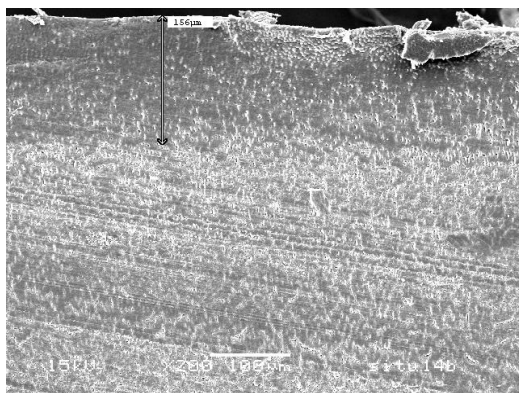
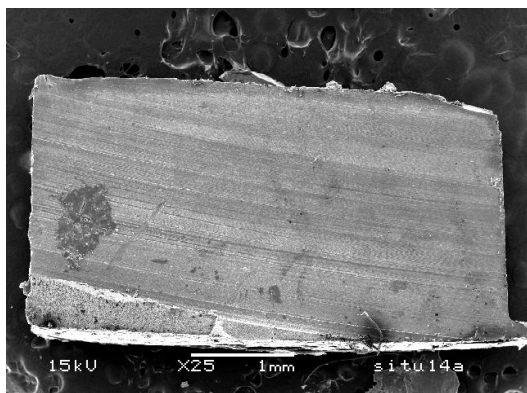


Figura 7. Imagens do Microscópio Eletrônico de Varredura – Modelo de Produção de Cárie *In situ*.



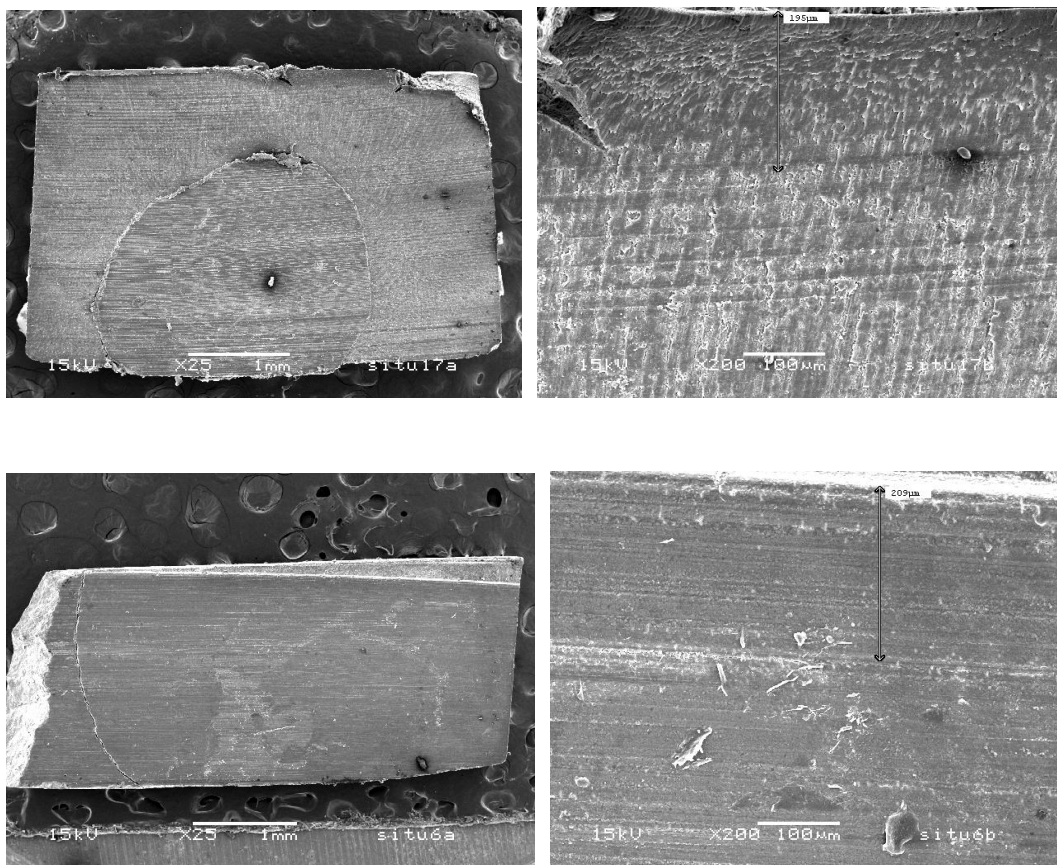
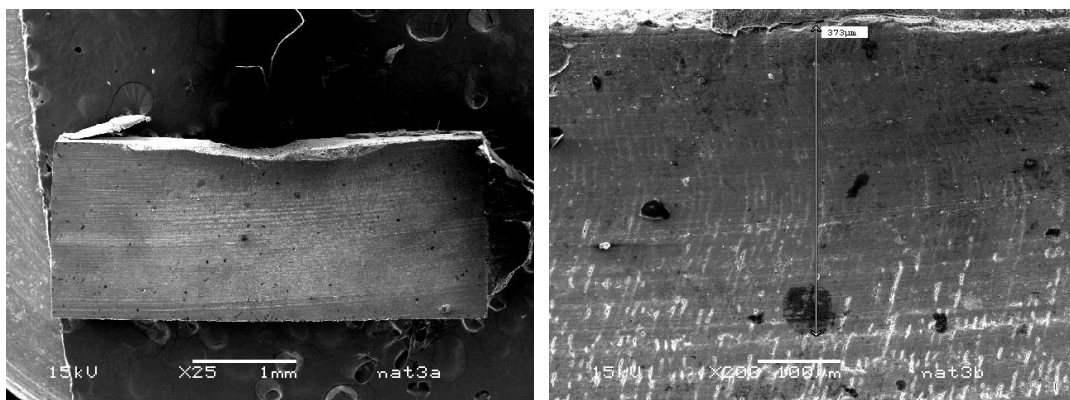


Figura 8. Imagens do Microscópio Eletrônico de Varredura – Lesão de Cárie Natural.



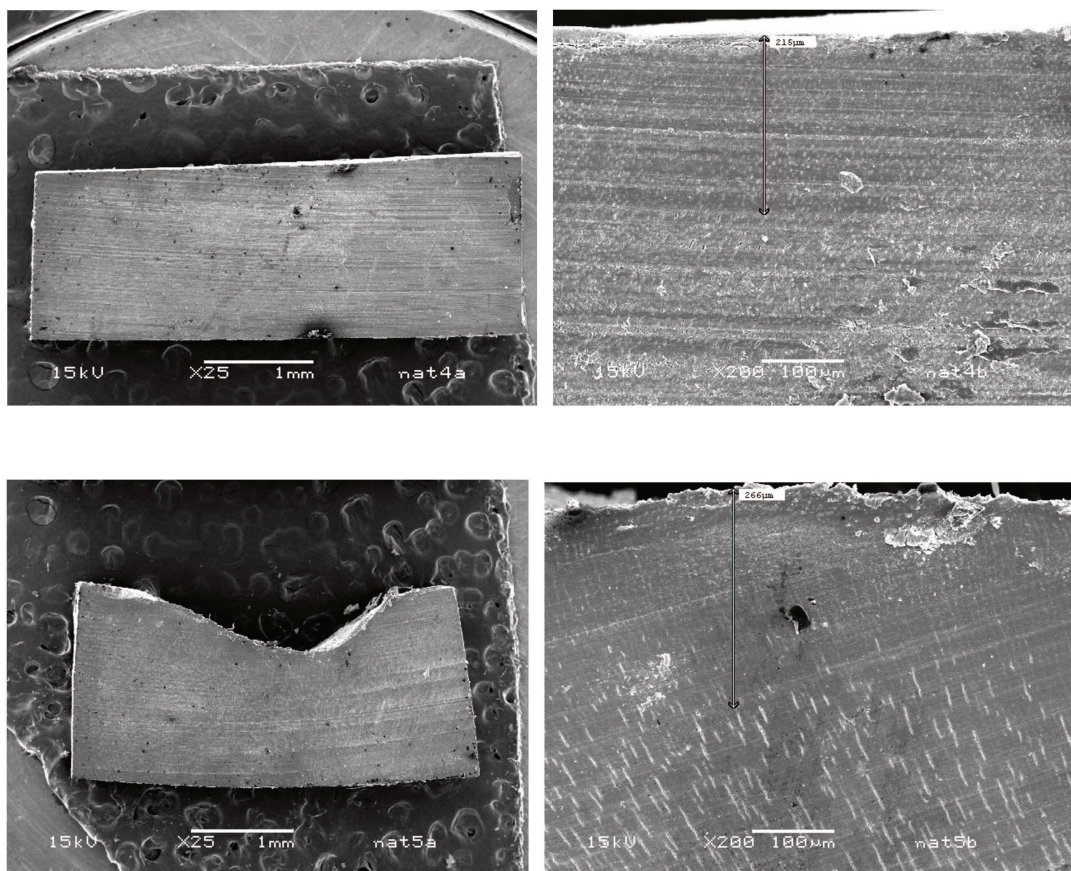


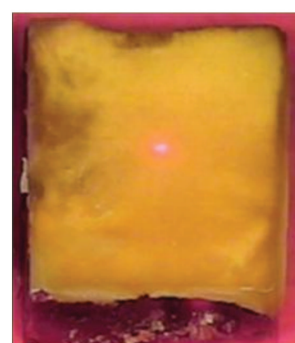
Figura 9. Imagens dos blocos, após a produção de cárie.



Modelo de Produção Biológico



Modelo de Produção *In situ*



Lesão de Cárie Natural

Anexo 1




COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa “Desempenho de sistemas de união à dentina decidua e permanente afetada por cárie quando submetidos ao dano cariogênico. Análise mecânica e micromorfológica”, protocolo nº **111/2005**, dos pesquisadores **FABÍOLA GALBIATTI DE CARVALHO, LARISSA FERREIRA PACHECO e REGINA MARIA PUPPIN RONTANI**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/08/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project “Performance of adhesive systems in primary and permanent affected caries dentin submitted to caries challenge. Mechanical and micro-morphological analysis”, register number **111/2005**, of **FABÍOLA GALBIATTI DE CARVALHO, LARISSA FERREIRA PACHECO and REGINA MARIA PUPPIN RONTANI**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 18/08/2008.



Prof. Pablo Agustín Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.