

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MARISTELA MAIA LOBO
CIRURGIÃ-DENTISTA

**“AVALIAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ADJACENTES A RESTAURAÇÕES
COM DIFERENTES MATERIAIS, INDUZIDAS ATRAVÉS DE MODELOS
QUÍMICO OU BIOLÓGICO”**

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

PIRACICABA

2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MARISTELA MAIA LOBO
CIRURGIÃ-DENTISTA

**“AVALIAÇÃO DE LESÕES DE CÁRIE ADJACENTES A RESTAURAÇÕES
COM DIFERENTES MATERIAIS, INDUZIDAS ATRAVÉS DE MODELOS
QUÍMICO OU BIOLÓGICO”**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz André Freire Pimenta

Co-Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz André Freire Pimenta

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Prof^a. Dr^a. Mônica Campos Serra

Este exemplar foi devidamente corrigido.
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG. 02 / 02 / 2004

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2003

UNIDADE BC
Nº CHAMADA 7/UNICAMP
L786a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 57492
PROC 16 - 117 - 04
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 14/04/2004
Nº CPD _____

CM00196200-9

BIB ID 313655

Ficha Catalográfica

L786a Lobo, Maristela Maia.
Avaliação de lesões de cárie adjacentes a restaurações com diferentes materiais, induzidas através de modelos químico ou biológico. / Maristela Maia Lobo. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003. x, 98p. : il.

Orientadores : Prof. Dr. Luiz André Freire Pimenta, Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries dentárias. 2. Flúor. I. Pimenta, Luiz André Freire. II. Gonçalves, Reginaldo Bruno. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 09 de Dezembro de 2003, considerou a candidata MARISTELA MAIA LOBO aprovada.

1. Prof. Dr. LUIZ ANDRE FREIRE PIMENTA

2. Profa. Dra. MÔNICA CAMPOS SERRA

3. Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

Este trabalho é a realização de um sonho. Para torná-lo realidade, eu precisei de coragem, determinação e perseverança. Nas páginas que se seguem, estão descritos os achados científicos. Mas no meu coração, ficaram as lições que me servirão para toda a VIDA. Senti a presença de DEUS nos momentos mais difíceis e também nos mais felizes... e por isso agradeço-Lhe com a alma e com o coração.

DEDICO ESTE TRABALHO...

...À MINHA FAMÍLIA, pilar central da minha vida. Foi sofrido estar longe... mas a magia e a intensidade de cada reencontro me reabastecia para prosseguir!

...Ao meu grande e único amor, LÉO, companheiro e cúmplice no sorriso e na dor.

...À minha eterna orientadora e amiga PAULA MATHIAS, como uma forma de coroar e celebrar tudo o que fez por mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Luiz André Freire Pimenta, pelo crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, pela oportunidade de aprender algo novo. Obrigada pela presença constante, apoio e troca de idéias.

À Profa. Dra. Ceres Mendonça Fontes, pelo incentivo e pelas palavras docemente sábias que contribuíram para que eu estivesse aqui hoje.

À Profa. Dra. Paula Mathias, pelo encorajamento, pelo entusiasmo, pelo dinamismo. Pelo exemplo de profissional, de mulher e de amiga!

Você impulsionou a realização de um sonho!

AGRADEÇO COM O CORAÇÃO...

À Minha Mãezinha, Stelamary, guerreira, linda, viva! Com você aprendi a ter sonhos, e a lutar por eles com honestidade e retidão de caráter.

Ao Meu Paizão, Cláudio, pelo exemplo de tranquilidade e otimismo diante das questões inerentes à vida... e pelo apoio incondicional aos meus projetos.

Ao meu irmão e melhor amigo Tom, pela presença gostosa ao meu lado, orgulhoso das minhas conquistas, e sempre pronto a me ajudar, acolher e incentivar.

A Jal, pela sensação de proteção e segurança, por estar sempre disposto a me amparar nas dificuldades, e vibrar comigo nos momentos de vitória.

A Jussara pelas orações em meu favor e pelas palavras de incentivo.

A Lorena, minha cunhadinha meiga, prestativa e maravilhosa!

Aos meus avós, Jairo e Maristela, porque são a base de tudo o que eu sou... são amor, carinho e apoio incondicional.

Aos tios queridos Marcos e Cris, e aos primos-irmãos Jairo, Kitty e Léo por comemorarem comigo as minhas conquistas, e pelo apoio nas horas difíceis.

Aos meus sogros, Lúcia e Britto, pelo filho maravilhoso que têm e pelas palavras de incentivo. Aos meus queridos cunhadinhos Dôgo e Duda, pelo exemplo de justiça e simplicidade. A Vó Célia, pelo carinho e amor.

Agradecimentos

À Giovana, a Gl, amiga e companheira, pelo apoio nos momentos de fragilidade, pela confiança e carinho que me dedicou...pela alegria de poder descobrir uma irmã curitibana!

À Cris Tengan, pelo alto-astral, pela alegria constante, pela energia maravilhosa que me contagiava de garra e entusiasmo!

À Iriana, uma amiga maravilhosa, crucial nos momentos difíceis, capaz de curar uma ferida com meia-dúzia de palavras!!

À Lidiany, pela disponibilidade em ajudar, pelas colocações sempre pertinentes, pelo exemplo de pessoa, amiga e profissional.

À Carol Erhardt, sempre prestativa e próxima, segurou a minha mão e me ajudou a crescer!

À Déa, minha amiguinha baiana, pelo apoio e amizade.

À Ana Karina, pelo apoio, pela amizade e pelos materiais fornecidos à pesquisa.

À Livia Tenuta, Adriana, Carol e Cecília, pela ajuda teórica e prática, e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao Celso Queiroz, pela ajuda indispensável à realização das microscopias de luz polarizada.

À Van Ruiva, pela bondade de coração e disponibilidade em ajudar, especialmente nas questões de estatística.

Aos colegas Marcelo Napimoga e Rafael Stipp, pela ajuda nos procedimentos laboratoriais de microbiologia.

À Marlize, Regiane, Ana Cláudia e Flávia, pela amizade e ajuda no laboratório de microbiologia.

A Alê, Fabinho, Grace, Larissa, Vanessinha, Mirela, Denissinha, Ciça, Paty, Guto, Cris Mariote, André, Marcelo, César, Cláudia Cia, Bia, Celso, Caio, pela acolhida dessa baiana da cariologia na dentística!!

A Débora, Lívia Litsue, Silvia, Lílian, Elaine, Luciano, Gustavo, Fábio e Tati, pela amizade nestes dois anos...

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho.

Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, coordenador geral do Curso de Pós-graduação e à Profa. Dra. Maria Cristina Volpato, coordenadora do Curso de Pós-graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Odontologia - Área de Cariologia.

Ao CNPq por financiar a minha estadia aqui em Piracicaba.

Aos Prof. Drs. Pedro Luiz Rosalen e Cinthia Pereira Machado Tabchoury, pela participação como membros da banca examinadora em minha pré-qualificação.

Aos Prof. Drs. Renata Mattos-Graner, Francisco Carlos Groppo e Marinês Nobre dos Santos, pela participação como membros da banca examinadora em minha qualificação.

Ao Prof. Dr. Jaime A. Cury, Coordenador da Área de Cariologia, pelas oportunidades de aprendizado científico, e colaboração em todos os momentos.

À Profa. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, pela orientação paciente e serena nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos, por disponibilizar o uso de equipamentos no Laboratório de Odontopediatria da FOP/UNICAMP, com satisfação.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP: Mariza de Jesus Carlos Soares – pelo auxílio constante no reparo das soluções e nas dosagens, e pelo convívio prazeroso; e José Alfredo da Silva – pelo auxílio em todos os momentos, e pelo convívio leve e simples.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Oral da FOP/UNICAMP: Wilma, pela disponibilidade em ajudar, e Anderson, pela colaboração constante, pelas soluções imediatas e pelo bom-humor.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Maria Elisa dos Santos, pela disponibilidade em ajudar e orientar, pela atenção e amizade.

Às secretárias da Pós-Graduação, Érica Alessandra Pinho e Sônia Lordello Arthur, pela colaboração e atenção.

Aos funcionários do Laboratório de Dentística Restauradora da FOP-UNICAMP, Paula Crazy, Fernanda e Pedro, pela ajuda incondicional, pela amizade e pelo bom convívio.

Aos funcionários do CENA-USP Paulo Cassieri Neto e Inês Franco Possignolo Rodrigues, pelo auxílio na irradiação dos espécimes e pela amizade.

Ciente de que seria impossível lembrar de todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo aqui meus sinceros agradecimentos àqueles que fizeram parte dessa minha conquista.

*"Bom mesmo é ir à luta com DETERMINAÇÃO,
Abraçar a vida e viver com PAIXÃO,
Perder com CLASSE e vencer com OUSADIA,
Pois o triunfo pertence a quem mais se atreve.
E a vida é MUITO para ser insignificante."*

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	09
2.1. DECLÍNIO E POLARIZAÇÃO DA DOENÇA CÁRIE.....	09
2.2. LESÕES DE CÁRIE SECUNDÁRIA.....	10
2.3. AÇÃO CARIOSTÁTICA DOS MATERIAIS RESTAURADORES: ESTUDOS IN VITRO.....	12
2.3.1. MODELO QUÍMICO: CICLAGEM DE PH.....	13
2.3.2. MODELO BIOLÓGICO: CULTURA SIMPLES.....	20
3. PROPOSIÇÃO.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
4.2. FASE PREPARATÓRIA.....	33
4.2.1. SELEÇÃO E CORTE DOS DENTES.....	33
4.2.2. CONFECÇÃO DAS CAVIDADES.....	35
4.2.3. PROCEDIMENTOS RESTAURADORES.....	35
4.2.4. PREPARO DOS RECIPIENTES.....	38
4.2.5. ESTERILIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DENTAIS.....	39
4.3. INDUÇÃO DAS LESÕES DE CÁRIE.....	40
4.3.1. GRUPO CONTROLE NEGATIVO (GC).....	40
4.3.2. MODELO BIOLÓGICO (GB).....	40
4.3.3. MODELO QUÍMICO (GQ).....	44
4.4. ANÁLISES.....	45
4.4.1. ANÁLISE BIOQUÍMICA DO BIOFILME DENTAL.....	45
4.4.1.1. FLÚOR (F ⁻).....	48
4.4.1.2. FÓSFORO INORGÂNICO (Pi).....	48
4.4.1.3. POLISSACARÍDEO INSOLÚVEL EM ÁGUA (PI).....	50
4.4.2. ANÁLISE DAS LESÕES DE CÁRIE.....	51

4.4.2. ANÁLISE DAS LESÕES DE CÁRIE.....	51
4.4.2.1. MICRODUREZA DO ESMALTE SECCIONADO LONGITUDINALMENTE.....	50
4.4.2.2. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA.....	53
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4.5.1. VOLUME MINERAL (%).....	56
4.5.2. PROFUNDIDADE DA LESÃO (µM).....	56
4.5.3. ANÁLISE DO BIOFILME DENTAL (F, PI E PI).....	56
5. RESULTADOS.....	57
5.1. ANÁLISE DO BIOFILME DENTAL.....	57
5.2. ANÁLISE DAS LESÕES DE CÁRIE.....	60
5.2.1. PORCENTAGEM DE VOLUME MINERAL.....	60
5.2.1.1. INDUÇÃO BIOLÓGICA.....	60
5.2.1.2. INDUÇÃO QUÍMICA.....	60
5.2.2. PROFUNDIDADE DAS LESÕES DE CÁRIE.....	63
5.2.2.1. INDUÇÃO BIOLÓGICA.....	66
5.2.2.2. INDUÇÃO QUÍMICA.....	68
5.3. MICROSCOPIAS DE LUZ POLARIZADA.....	70
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO I.....	99
ANEXO II	101
ANEXO III	103
ANEXO IV.....	105

RESUMO

O presente estudo analisou, *in vitro*, o desenvolvimento de lesões de cárie ao redor de diferentes materiais restauradores, utilizando modelos de indução de natureza química e biológica. Cavidades cilíndricas foram preparadas em 130 fragmentos dentais bovinos, divididos aleatoriamente em seis grupos de acordo com o tratamento restaurador: G1 – cimento provisório à base de óxido de zinco (Coltosol, n=30); G2 – amálgama (Permite C, n=20); G3 – resina composta (Filtek Z250, n=20); G4 – cimento de ionômero de vidro (Fuji II, n=20); G5 – cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremmer, n=20); e G6 – resina composta modificada por poliácidos (Dyract AP, n=20). Dez espécimes de cada grupo restaurado foram submetidos a 10 dias de ciclagens de pH (GQ, n=60), e outros dez espécimes de cada grupo foram incubados com *Streptococcus mutans* (GB, n=60) por cinco dias. O grupo controle (dez espécimes do G1) não foi submetido a nenhum desafio cariogênico (GC). O volume mineral (%) das lesões de cárie foi calculado a partir de ensaios de microdureza, e a profundidade dessas lesões foi medida em microscópio de luz polarizada. A composição bioquímica do biofilme formado sobre cada material restaurador no GB foi avaliada. Ambos os modelos de indução utilizados desenvolveram lesões de cárie secundária. Foi observado efeito cariostático superior para os cimentos ionoméricos convencional e modificado por resina, em comparação com os demais materiais. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de F⁻ e PI no biofilme dental, mas observou-se uma relação inversa entre a quantidade de fósforo inorgânico no biofilme dental e o potencial de inibição de cárie dos materiais restauradores.

ABSTRACT

This study evaluated caries development around different restorative materials, by means of chemical and biological models to produce caries-like lesions. Cylindric cavities were prepared in 130 bovine slabs, which were randomly divided into six groups, according to the restorative treatment: G1 – zinc oxide temporary filling (Coltosol, n=30); G2 – silver amalgam (Permite C, n=20); G3 – composite resin (Filtek Z250, n=20); G4 – glass ionomer cement (Fuji II, n=20); G5 – resin modified glass ionomer (Vitremmer, n=20); and G6 – polyacid modified resin (Dyract AP, n=20). Ten specimens of each group were submitted to ten days of pH-cycling (GQ, n=60), or were incubated with *Streptococcus mutans* for five days (GB, n=60). Control group (from G1, n=10) was not submitted to any caries induction (GC). After this period, mineral volume (%) was determined by means of cross-sectional microhardness, and carious lesion depth was measured in polarized light microscopy. Levels of water-insoluble glucans (WIG), inorganic phosphorus (Pi) and fluoride (F⁻) were quantified in the biofilms formed over the tooth surfaces in GB group. Both caries induction models developed secondary caries. Cariostatic effect was provided by glass ionomer cement and resin modified glass ionomer, when compared to the other materials. There were no differences at F⁻ and WIG biofilm levels over restorative materials. However, there was an inverse relation between biofilm phosphorus content and caries inhibition potential.

1. INTRODUÇÃO

Os indivíduos que possuem altos níveis de atividade e risco de cárie possuem maior probabilidade de desenvolver lesões de cárie secundária, freqüentemente apontadas como a principal razão para a substituição das restaurações (PIMENTA *et al.*, 1995; ÖZER & THYLSTRUP, 1995; MJÖR & TOFFENETTI, 2000; MJÖR *et al.*, 2000). Materiais restauradores com propriedades cariostáticas têm sido indicados a tais indivíduos, quando necessários, para atuar como adjuvantes locais no controle da doença cárie (BENELLI *et al.*, 1993; SERRA *et al.*, 1999).

A influência dos diversos materiais restauradores na dinâmica da cárie dental tem sido amplamente estudada, *in vitro*, em modelos que simulam um alto desafio cariogênico, com o objetivo de desenvolver lesões com características comparáveis às encontradas *in vivo* (GILMOUR & EDMUNDS, 1998; GROSSMAN & MATEJKA, 1999). Os modelos podem ser químicos: estáticos – imersão de substratos dentais em soluções ou géis ácidos (DIONISOPOULOS *et al.*, 1996; PEREIRA *et al.*, 1998a,b), ou dinâmicos – ciclos de desmineralização e remineralização (TEN CATE & DUIJSTERS, 1982; FEATHERSTONE *et al.*, 1986; PIMENTA *et al.*, 1995, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2001) ou, ainda, ter natureza microbiológica – exposição do substrato a uma ou mais espécies de microorganismos cariogênicos (GILMOUR *et al.*, 1990, 1993, 1997; FRANCCI *et al.*, 1999; TORII *et al.*, 2001). Embora todos esses modelos de indução de cárie

apresentem limitações, admite-se que a ciclagem de pH seja o método *in vitro* mais próximo do desenvolvimento natural da lesão, pois simula a dinâmica dos episódios físico-químicos de desmineralização e remineralização (TEN CATE *et al.*, 1990; HERKSTRÖTER *et al.*, 1991) e forma lesões histologicamente semelhantes às lesões *in vivo* (FEATHERSTONE *et al.*, 1986; PIMENTA *et al.*, 1995; WHITE, 1995). No entanto, sugere-se que a inclusão de aspectos biológicos – utilizando-se microrganismos como agentes produtores de ácidos (BOWDEN, 1995) – poderia fornecer indícios complementares acerca da influência dos materiais restauradores na aderência e metabolismo bacterianos, no que diz respeito à ação cariostática destes materiais (KAWAI & TAKAOKA, 2001; VAN LOVEREN, 2001).

De uma forma lógica, espera-se que as lesões formadas a partir desses modelos de indução artificial de cárie – que utilizam mecanismos distintos de desmineralização – apresentem características variáveis, em função da severidade do desafio cariogênico e das diferentes propriedades dos materiais restauradores empregados. No entanto, poderia haver uma complementariedade desses modelos quanto à análise das propriedades cariostáticas dos materiais restauradores, destacando a sua influência na físico-química da cárie (HATTAB *et al.*, 1989; FORSS & SEPPÄ, 1990) e a sua atividade antibacteriana (MARSH, 1995).

Em virtude da falta de estudos que utilizem modelos de natureza distinta para analisar as propriedades cariostáticas dos materiais restauradores (VAN LOVEREN, 2001), o presente trabalho se propôs a avaliar, *in vitro*, o desenvolvimento de lesões de cárie secundária ao redor de diferentes materiais

restauradores, através do emprego de um modelo químico dinâmico e outro biológico para a indução de lesões artificiais de cárie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DECLÍNIO E POLARIZAÇÃO DA DOENÇA CÁRIE

Nas últimas décadas, a prevalência de cárie dental – expressa através do número de dentes com história pregressa ou atual de cárie – tem sido menor, particularmente em indivíduos jovens de países ocidentais (**DOWNER**, 1996; **MARTHAELER**, 1996; **VEHKALAHTI, et al.**, 1997), incluindo o Brasil (**NARVAI et al.**, 1999; **MARCENES et al.**, 2001).

Existe um consenso de que essa redução é resultado da ampla disponibilidade de flúor em águas de abastecimento e em dentifrícios (**GLASS**, 1982; **BRATTHALL et al.**, 1996; **PETERSON et al.**, 1996; **DOWNER**, 1996). Outros autores destacam também a importância da provisão de medidas preventivas e educativas através dos serviços de saúde (**FDI/OMS**, 1985; **MARTHAELER**, 1996), das mudanças sócio-econômicas (**NADANOVSKY & SHEIHAM**, 1995), da redução no consumo de açúcar (**FDI/OMS**, 1985; **DOWNER**, 1996), e do impacto das mudanças ocorridas nos critérios de diagnóstico de cárie (**MARCENES et al.**, 2001).

Contrariando a expectativa de muitos profissionais de que a doença cárie tenderia a desaparecer em algumas décadas, **DOWNER** (1994) apontou para os altos níveis de atividade e de risco de cárie em determinados grupos de crianças, adolescentes e adultos jovens. Essa distribuição polarizada da experiência de cárie (**VEHKALAHTI et al.**, 1997, **SPENCER**, 1997) – onde grupos

restritos de indivíduos passaram a concentrar a incidência da doença – determinou a necessidade de adotar novas estratégias de prevenção e controle, específicas para tais grupos (**WHITE & EAKLE, 2000**).

Uma vez que os procedimentos restauradores, isolados, não são capazes de curar a doença cárie (**SERRA et al., 1999**), esses indivíduos podem desenvolver lesões de cárie secundária.

2.2. LESÕES DE CÁRIE SECUNDÁRIA

A cárie secundária é uma lesão que se desenvolve ao redor de uma restauração (**MJÖR & TOFFENETTI, 2000; KIDD, 2001**), através da difusão de ácidos bacterianos nos micro-espacos da interface dente/restauração (**HICKS et al., 2002**). Examinada histologicamente, esta consiste em duas lesões separadas e inter-relacionadas: uma lesão primária externa, na superfície do esmalte, e outra na parede cavitária – formada em consequência da microinfiltração marginal (**PIMENTA et al., 1995; DIONYSOPOULOS et al., 1998; TORII et al., 2001**).

O tipo de material restaurador – quanto ao mecanismo de retenção (mecânico ou adesivo) e à capacidade de liberar íons anticariogênicos (fluoretos, metais pesados ou ácidos) – é um dos fatores determinantes no desenvolvimento deste tipo de lesão (**DIONYSOPOULOS et al., 1996**). Um outro fator consiste na localização das margens da restauração em locais de difícil acesso à higiene, como as margens cervicais, onde a incidência desse tipo de lesão é mais elevada (**KIDD, 2001**).

A literatura freqüentemente emprega o termo “cárie recorrente” como sendo sinônimo de cárie secundária (ÖZER & THYLSTRUP, 1995; HSU *et al.*, 1998; MJÖR *et al.*, 2000; KIDD, 2001). HICKS *et al.*, em 2002, definiram simplificadaamente cárie secundária ou recorrente como sendo as lesões detectadas nas margens de uma restauração. É importante, no entanto, não confundir cárie secundária com cárie residual – que se desenvolve a partir da permanência de tecido cariado durante o preparo cavitário (KIDD, 2001).

A presença de lesões de cárie secundária é apontada como a principal causa para a falha e a substituição de restaurações, tanto na dentição decídua, quanto na permanente (PIMENTA *et al.*, 1995; ÖZER & THYLSTRUP, 1995; MJÖR & TOFFENETTI, 2000; MJÖR *et al.*, 2000). Muitas vezes, fendas e descolorações marginais são interpretadas como cárie secundária, o que, segundo HICKS *et al.* (2002) e MJÖR & TOFFENETTI (2000) é errôneo, pois a lesão só pode ser detectada clinicamente quando estas fendas atingem uma espessura mínima de 250µm. Defeitos e pigmentações marginais não são suficientes para predizer a presença ou a ausência de lesões de cárie secundária (PIMENTA *et al.*, 1995; KIDD, 2001).

O início desse tipo de lesão não está diretamente relacionado ao tamanho de um defeito marginal (KIDD & O'HARA, 1990; PIMENTA *et al.*, 1995), da mesma forma que fóssulas e fissuras profundas e inacessíveis não são determinantes do desenvolvimento da cárie oclusal (EKSTRAND *et al.*, 1995). Em princípio, fendas marginais podem ser comparadas a fissuras oclusais profundas, como sendo regiões vulneráveis ao acúmulo bacteriano, onde o controle de placa

externo é capaz de prevenir o desenvolvimento das lesões de cárie (CARVALHO *et al.*, 1992).

Em pacientes com alto risco ao desenvolvimento de cárie, maior atenção deve ser direcionada à possibilidade do ocorrer cárie secundária, visto que os procedimentos restauradores não são capazes de curar a doença (SERRA *et al.*, 1999). Alguns materiais restauradores, particularmente os que liberam flúor, podem agir como adjuvantes locais no controle dessas lesões (BENELLI *et al.*, 1993).

2.3. AÇÃO CARIOSTÁTICA DOS MATERIAIS RESTAURADORES: ESTUDOS *IN VITRO*

A avaliação *in vitro* do efeito cariostático dos diversos materiais restauradores tem sido amplamente conduzida há algumas décadas, a partir da formação artificial de lesões de cárie com características visuais e histológicas semelhantes às lesões *in vivo*, produzidas em curtos períodos de tempo e sob condições experimentais controladas (EDMUNDS *et al.*, 1988; WHITE, 1995).

Os principais modelos laboratoriais empregados têm natureza química ou biológica. Os modelos químicos podem ser estáticos – imersão do substrato dental em géis (HATTAB *et al.*, 1989; ARENDS & VAN DER ZEE, 1990) ou em soluções ácidas tamponadas (FORSS & SEPPÄ, 1990; DONLY & SEGURA, 2002); ou dinâmicos – representados pelas ciclagens de pH (TEN CATE & DUIJSTERS, 1982; FEATHERSTONE *et al.*, 1986; PIMENTA *et al.*, 1995, 1998). Os modelos biológicos utilizam microrganismos como agentes produtores de ácidos, a partir de biofilmes

cultivados em meios de cultura simples (DUMMER *et al.*, 1982; GILMOUR & EDMUNDS, 1998) ou em aparatos complexos que controlam o fluxo de nutrientes, a atmosfera e a temperatura (PIGMAN *et al.*, 1952; MARSH, 1995; TORII *et al.*, 2001).

Esses modelos auxiliam no entendimento da dinâmica de desmineralização e remineralização, permitindo o estudo de variáveis isoladas, como a quantificação da profundidade e perda mineral da lesão, além da liberação, incorporação e distribuição de flúor (ARENDS & VAN DER ZEE, 1990).

2.3.1. MODELO QUÍMICO DINÂMICO: CICLAGEM DE PH

As ciclagens de pH simulam as variações dinâmicas da saturação mineral e do pH, mimetizando a ocorrência de altos desafios cariogênicos em períodos cíclicos de desmineralização e remineralização (TEN CATE & DUIJSTERS, 1982; HERKSTRÖTER *et al.*, 1991). Nesse modelo, lesões subsuperficiais com 100 a 250µm de profundidade com relação à superfície do esmalte podem ser formadas em curtos períodos de tempo, como dias ou semanas, representando de 6 a 12 meses de progressão de lesão *in vivo* (WHITE, 1995).

O substrato dental é exposto a volumes previamente calculados de solução ácida tamponada (FEATHERSTONE *et al.*, 1986; SHINKAI *et al.*, 2001), contendo quantidades conhecidas de íons cálcio, fosfato e, algumas vezes, flúor, durante um período relativamente curto – geralmente de 3 a 6 horas, a depender da proposta do estudo (TEN CATE & DUIJSTERS, 1982; FEATHERSTONE *et al.*, 1986; WHITE, 1995). A renovação dessa solução pode ser diária ou em intervalos de

alguns dias. Após o período de desmineralização, o substrato dental é transferido para uma solução remineralizante por um período superior, simulando a ação da saliva natural (TEN CATE & DUIJSTERS, 1982).

Os períodos de desmineralização e remineralização geralmente totalizam 24h, e são repetidos durante alguns dias (2 a 14), constituindo ciclos (FEATHERSTONE *et al.*, 1986). A perda mineral é diretamente proporcional ao número de ciclos, em qualquer sistema químico, e independe da posição da janela de exposição do esmalte (AMAECHEI *et al.*, 1998b). Durante a imersão, os dentes são armazenados em temperaturas de 37°C ou 20°C (BOYLE *et al.*, 1998), sendo que altas temperaturas podem aumentar a velocidade de difusão dos ácidos através do esmalte (AMAECHEI *et al.*, 1998b).

Estudos In Vitro

Em 1982, TEN CATE & DUIJSTERS desenvolveram uma metodologia empregando ciclos de pH para estudar as alterações minerais em lesões de cárie artificial. Fragmentos de esmalte bovino foram expostos por 14 dias a uma solução desmineralizadora contendo cálcio, fosfato e tampão acetato com pH 5,0. Após a formação das lesões, os fragmentos foram submetidos alternadamente às soluções RE (1,5mM Ca, 0,9mM PO₄, 150mM KCl, tampão cacodilato em pH 7,0) e DES (2,0mM Ca, 2,0mM PO₄, 75mM de acetato, em pH 4,3), com e sem a presença de 2,0 ppm F⁻, respectivamente. Verificou-se que a presença de flúor promoveu a paralisação das lesões de cárie, as quais assemelharam-se

histologicamente às lesões formadas *in vivo* em áreas de água fluoretada a 1,0 ppm F⁻.

Baseados em resultados de experimentos *in vivo*, **FEATHERSTONE et al.**, em 1986, desenvolveram um modelo de ciclagens de desmineralização e remineralização *in vitro* para estudar o efeito cariostático de um dentifrício fluoretado associado a bochechos de fluoreto de sódio a 0,05% ou a aplicações de flúor-fosfato acidulado. Pacientes com extrações indicadas por razões ortodônticas submeteram-se a um mês de tratamento. Após esse período, os dentes foram extraídos, e a desmineralização foi avaliada por ensaios de microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente. O dentifrício fluoretado permitiu a perda mineral de apenas 5 a 15% em volume, e, quando associado a bochechos com fluoreto de sódio, promoveu uma completa proteção contra a desmineralização. Esses resultados foram reproduzidos em um regime de ciclagens de pH de 14 dias baseado nos estudos de **TEN CATE & DUIJSTERS** (1982), com tratamento diário com flúor por cinco minutos. Os dentes permaneciam individualmente imersos em 40mL de solução DES (2,0mM Ca, 2,0mM PO₄, 75mM de acetato, em pH 4,3) por 6h, e depois por 17h em 20mL de solução RE (1,5mM Ca, 0,9mM PO₄, 150mM KCl, tampão cacodilato em pH 7,0).

Através de um modelo químico dinâmico de ciclagens de pH baseado no estudo de **FEATHERSTONE et al.** (1986), **SERRA & CURY**, em 1992, simularam condições naturais de alto desafio cariogênico, avaliando as diferenças na formação de lesões de cárie ao redor de restaurações com cimento de ionômero

de vidro (CIV) ou resina composta (RC). A avaliação através de ensaios de microdureza *Knoop* demonstrou que o CIV apresentou valores de dureza próximos ao grupo controle – na faixa de 330 a 370, ao contrário da RC – entre 170 e 230, nas posições mais próximas à restauração. Assim, o material ionomérico foi capaz de reduzir a progressão das lesões artificiais adjacentes, porém não conseguiu inibir o início dessas lesões.

Estudando o desenvolvimento de lesões de cárie secundária, **SERRA**, em 1995, avaliou o efeito cariostático de materiais restauradores contendo flúor. Cavidades classe V foram preparadas em blocos de esmalte, divididos aleatoriamente em nove grupos. Restaurados, os blocos foram submetidos a um regime de ciclagens de pH por 14 dias, baseados nos estudos de **FEATHERSTONE et al.** (1986), e a 200 ciclos térmicos. As lesões de cárie foram avaliadas através de ensaios de microdureza. Os resultados demonstraram que o CIV apresentou maior potencial cariostático que os híbridos de ionômero de vidro/resina composta. As resinas compostas avaliadas não mostraram efeito cariostático.

PIMENTA et al., em 1998, avaliaram a inibição da desmineralização *in vitro* ao redor de restaurações de amálgama, com diferentes tratamentos das paredes cavitárias. Terceiros molares humanos restaurados foram submetidos a um regime de ciclagens de pH baseado nos estudos de **FEATHERSTONE et al.** (1986) por 14 dias, totalizando 10 ciclos de 24h. Os dentes permaneceram em 100mL de solução DES (2,0mM Ca, 2,0mM PO₄, 74mM acetato, em pH 4,3) por 6h e na solução RE (1,5mM Ca, 0,9mM PO₄, 0,1mM Tris, em pH 7,0) por 18h, a

37°C. Simultaneamente ao desafio cariogênico, 200 ciclos térmicos foram realizados. Em ensaios de microdureza *Knoop*, o grupo controle obteve os valores de dureza mais elevados ($\cong 355,0$), diferindo do amálgama adesivo ($\cong 290,0$), do amálgama com tratamento cavitário com flúor ($\cong 285,0$) e do amálgama forrado com cimento de ionômero de vidro ($\cong 280,0$) – os quais não diferiram entre si. Os menores valores de microdureza foram encontrados para os espécimes sem forramento ($\cong 260,0$) ou forrados com verniz ($\cong 230,0$). Os autores concluíram que o uso do sistema adesivo sob a restauração de amálgama reduziu significativamente a formação das lesões de cárie em comparação aos demais tratamentos, embora nenhum destes tenha evitado a desmineralização.

SHINKAI et al., em 2001, avaliaram a influência de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) no desenvolvimento de lesões cáries artificiais em esmalte e dentina radicular, ao redor de restaurações metálicas. A porção cervical de 12 terceiros molares humanos foi seccionada em quatro blocos, distribuídos em 4 grupos (n=12): C1 – ausência de cimentação e de desafio cariogênico; C2 – ausência de cimentação e desafio cariogênico; G1 – cimentação com CIVMR; e ZP – cimentação com fosfato de zinco. Os grupos C2, G1 e ZP foram submetidos a um regime de ciclagens de pH de oito dias: os espécimes foram imersos por 7h em solução DES (2,2mM Ca, 2,2mM PO₄, 0,05M acetato e 1,0 ppm F em pH 4,5, na proporção de 6,25mL/mm²) e por 17h em solução RE (1,5mM Ca, 0,9mM PO₄, 0,15M KCl em pH 7,0, na proporção de 3,125mL/mm²). Foram obtidos valores de microdureza *Knoop*, para o esmalte

seccionado longitudinalmente, os quais foram convertidos em volume mineral (%). Para a dentina, houve uma redução significativa do conteúdo mineral nos grupos submetidos à ciclagem, quando comparados ao controle, e os grupos GI e ZP revelaram maior efeito cariostático que o C2. No esmalte, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C2, GI e ZP. Em conclusão, os autores não encontraram diferenças entre o material ionomérico e o cimento de fosfato de zinco no desenvolvimento das lesões de cárie em esmalte ou dentina radicular sob restaurações metálicas.

DELBEM & CURY, em 2002, avaliaram o efeito do tempo de aplicação tópica de flúor neutro ou acidulado na resistência do esmalte a desmineralização *in vitro* e na incorporação do flúor ao mesmo. Cento e noventa e dois blocos dentais humanos foram subdivididos em 4 grupos tratados (n=36) e 1 grupo controle (n=48). Nos grupos tratados, o flúor neutro e o acidulado foram aplicados no esmalte durante um ou quatro minutos. Vinte e quatro blocos de cada grupo foram submetidos a um regime de ciclagens de pH, enquanto os demais blocos foram mantidos em ambiente úmido. A ciclagem, baseada no estudo de **FEATHERSTONE et al.** (1986), foi conduzida por 10 dias, onde os espécimes foram imersos por 6h em solução DES (2,0mM Ca, 2,0mM PO₄ em 75mM de tampão acetato, pH 4.3, 20mL por bloco) e por 18h em solução RE (1,5mM Ca, 0,9mM PO₄, 150mM KCl em tampão Tris, pH 7.0, 10mL por bloco). Durante o fim de semana, os espécimes permaneceram na solução RE, e as soluções foram renovadas após o quinto ciclo. Ensaios de microdureza superficial e em corte

longitudinal foram determinados em uma das metades dos blocos, e a incorporação de flúor foi determinada na outra metade. O flúor acidulado promoveu maior incorporação de flúor no esmalte do que o neutro, e também menor desmineralização. O tempo de aplicação tópica foi significativo em termos de incorporação de flúor, mas não quanto a resistência do esmalte à desmineralização.

HARA et al., em 2002, avaliaram o efeito cariostático de materiais restauradores na dentina radicular. Noventa e cinco fragmentos radiculares bovinos restaurados com RC com ou sem flúor, CIV, resina modificada por poliácidos (RCMP) e CIVMR foram submetidos a um regime de ciclagens de pH de dois dias. Os espécimes foram individualmente submetidos a uma solução desmineralizante (2,0mM Ca, 2,0mM PO₄, solução tampão com 74mM de acetato, em pH 4,3) por 30 min e depois foram transferidos para uma solução remineralizante (1,5mM Ca, 0,9mM PO₄, 20mM de tampão Tris, em pH 7,0) por 3h. Passado esse tempo, foram novamente imersos na solução DES por mais 30 min e depois permaneceram na solução RE por 20h. Valores de microdureza da superfície de dentina foram determinados, mostrando um efeito cariostático maior para o CIV, seguido pelo CIVMR. A RCMP e a RC analisadas não demonstraram efeito cariostático.

2.3.2. MODELO BIOLÓGICO DE CULTURA SIMPLES

Os modelos biológicos de indução de cárie empregam microrganismos cariogênicos como agentes produtores de ácidos (**BOWDEN**, 1995) para formar lesões com características semelhantes às naturais (**DUMMER *et al.***, 1982, **GILMOUR & EDMUNDS**, 1998; **GROSSMAN & MATEJKA**, 1999). Há uma grande diversidade de sistemas, variando de culturas simples (mono ou di-culturas) (**GILMOUR & EDMUNDS**, 1998; **GROSSMAN & MATEJKA**, 1999) até a formação de biofilmes complexos – contendo vários microrganismos – em aparatos que controlam a atmosfera, o fluxo de nutrientes e a temperatura (**PIGMAN *et al.***, 1952; **TORII *et al.***, 2001).

A inclusão de aspectos biológicos em um modelo laboratorial de cárie torna-se importante quando se pretende estudar os agentes antimicrobianos presentes em colutórios e dentifrícios (**GUGGENHEIM *et al.***, 2001), ou o potencial antibacteriano dos íons flúor ou dos materiais restauradores (**TEN CATE & MUNDORFF-SHRESTHA**, 1995; **GILMOUR & EDMUNDS**, 1998). No entanto, os modelos biológicos *in vitro* não são capazes de refletir a complexidade da resposta metabólica da microflora oral aos substratos, ou reproduzir os efeitos da distribuição espacial na interação das espécies de um biofilme naturalmente formado (**MARSH**, 1995). Além disso, torna-se difícil descrevê-los matematicamente, uma vez que os componentes protéicos do meio de cultura e polímeros microbianos podem modificar a difusão dos ácidos no esmalte (**GALLAGHER *et al.***, 1983).

A vantagem desse tipo de modelo biológico de indução de cárie *in vitro* consiste na simplicidade, no baixo custo e na formação de lesões similares às lesões *in vivo* e às produzidas em sistemas químicos (DUMMER *et al.*, 1982; GILMOUR *et al.*, 1993; GILMOUR & EDMUNDS, 1998). Segundo MARSH, (1995), os biofilmes formados a partir de monoculturas de microrganismos são versões ultra-simplificadas da composição, estrutura e metabolismo do biofilme dental natural, pois não são capazes de refletir as interações bacterianas, tais como competição ou sucessão microbiana (BOWDEN, 1995). Em tais sistemas, as condições do meio de cultura e as cepas dos microrganismos utilizados são fatores críticos ao desenvolvimento da lesão (DUMMER *et al.*, 1982; EDMUNDS *et al.*, 1988).

Embora a inclusão de aspectos naturais, como biofilme dental e saliva, seja relevante em sistemas biológicos *in vitro*, estes fatores são microbiologicamente complexos e conseqüentemente pouco caracterizados, e podem inserir variáveis indesejadas ao estudo *in vitro* (MARSH, 1995). Um exemplo disso é a dificuldade de padronização e reprodução do inóculo, uma vez que é impossível manipular a sua composição para propósito experimental (MARSH, 1995).

Estudos In Vitro

GILMOUR *et al.*, em 1990, induziram lesões artificiais de cárie ao redor de restaurações de RC em pré-molares humanos, variando a finalização do preparo cavitário (bisel + condicionamento ácido; apenas condicionamento ácido; ausência

de condicionamento ácido). Os autores utilizaram uma única cepa de *S. mutans* (NCTC 10832), isolada de sítios intra-orais. Culturas de estoque congeladas desse microrganismo foram reativadas e um volume de 0,2mL dessas culturas puras foi inoculado em tubos contendo 20mL de meio suplementado com 5% de sacarose. Os tubos foram incubados a 37°C, renovando-se o meio a cada 24h, durante cinco dias, para pré-condicionar os microrganismos à sacarose. Após esse período, os dentes restaurados foram imersos em tubos contendo 20mL do mesmo meio de cultura e inoculados com 0,2mL da cultura do microrganismo pré-condicionado. Após 24h em 37°C, os espécimes eram transferidos para novos tubos e novamente inoculados, repetindo-se o processo por 10 dias. Visualizadas em microscopia de luz polarizada, as lesões formadas apresentaram zonas semelhantes às lesões incipientes *in vivo*, e a limitada profundidade da lesão de parede assemelhou-se às lesões induzidas em modelo químico. Lesões de parede foram mais freqüentes ao redor das restaurações de resina composta sem bisel e sem condicionamento ácido.

GILMOUR et al. (1993) induziram lesões artificiais de cárie ao redor de restaurações de amálgama e de resina composta em pré-molares humanos, utilizando o modelo biológico utilizado em 1990, mas aumentando os dias de incubação para 15. Os autores variaram material restaurador, procedimentos de finalização para a resina composta (bisel + condicionamento ácido; apenas condicionamento ácido; ausência de condicionamento ácido; ausência de qualquer finalização), aplicação ou não de verniz para o amálgama e estresse térmico. O

exame dos espécimes em microscópio de luz polarizada revelou a presença de lesões externas semelhantes para os dois materiais testados, embora menores lesões de parede cavitária adjacentes à resina composta. A aplicação de verniz e o estresse térmico tiveram efeitos irrelevantes no desenvolvimento das lesões artificiais.

Um modelo de indução de cárie artificial com *S. mutans* foi utilizado por **NAGAMINE et al.**, em 1994, para avaliar a inibição de lesões de cárie ao redor de restaurações com três CIVMR, um CIV convencional e uma resina composta. Após 20 dias de incubação, secções de 60µm foram avaliadas por microrradiografia. Não ocorreram diferenças significativas nas profundidades das lesões entre os cimentos de ionômero de vidro convencional e modificado por resina composta.

VALENZUELA et al. (1994) utilizaram um modelo biológico de monocultura de *S. mutans* (cepa *Ingbritt*), para induzir cárie ao redor de restaurações de amálgama convencional, amálgama contendo flúor e cimento de ionômero de vidro, em secções de pré-molares humanos. Os espécimes foram imersos em um meio de cultura contendo 5% de sacarose e 500µg/mL de bacitracina, em pH 6,5, inoculado com o microrganismo. Os tubos foram incubados em jarras anaeróbicas a 37°C, por oito semanas, e a renovação dos meios era realizada a cada sete dias. Após a observação em microscópios de luz transmitida e luz polarizada, a profundidade das lesões foi mensurada em micrometros. Os resultados mostraram

que o cimento de ionômero de vidro mostrou os menores valores de profundidade de lesão ($11\mu\text{m}$), seguido do amálgama contendo flúor ($46\mu\text{m}$), e do amálgama convencional ($160\mu\text{m}$). Os autores concluíram que o amálgama contendo flúor inibe o desenvolvimento de lesões de cárie secundária de maneira similar aos cimentos de ionômero de vidro.

GILMOUR et al., em 1997, compararam a efetividade de um CIV convencional e de uma resina composta contendo flúor (RCF) no controle do desenvolvimento de lesões de cárie secundária em pré-molares humanos, formadas através do modelo biológico descrito por **GILMOUR et al.** (1990). As profundidades das lesões externas e de parede foram medidas em microscópio de luz polarizada. As lesões externas adjacentes à RCF foram cerca de 1/3 mais profundas quando comparadas às lesões adjacentes ao CIV. Além disso, as lesões de parede foram significativamente mais prevalentes no grupo restaurado com a RCF do que no grupo restaurado com o material ionomérico. Os autores concluíram que o CIV foi efetivo no controle do desenvolvimento das lesões artificiais de cárie, em função da integridade marginal e da liberação de fluoretos, sendo que o mesmo não ocorreu para a resina composta contendo flúor.

Hsu et al., em 1998, estudaram o efeito cariostático de materiais restauradores contendo flúor após o seu envelhecimento *in vitro*. Os autores testaram versões fluoretadas e não fluoretadas de amálgama e resina composta, e um CIV, em restaurações classe V recentes ou envelhecidas por duas semanas. Após a termociclagem, grupos de cinco dentes foram imersos em 150mL de meio

de cultura TSB-YE suplementado com 1% de sacarose e 1% de glicose e inoculado com 2,0mL de uma suspensão de *S. mutans* (10449 sorotipo c). Os meios eram renovados a cada 48h, por oito dias. Após o desafio, secções de $100 \pm 20\mu\text{m}$ foram obtidas e visualizadas em microscópio de luz polarizada embebidos em água, onde foram medidas a profundidade e a área das lesões. Uma zona ácido-resistente de inibição de cárie foi observada ao longo das paredes cavitárias ao redor das restaurações com amálgama contendo flúor e CIV. Por outro lado, uma camada mais fina e fracamente ácido-resistente foi observada ao redor dos materiais que não liberaram flúor.

GILMOUR & EDMUNDS, em 1998, examinaram a aparência histológica de lesões de cárie adjacentes a restaurações de amálgama, RCF e CIV, em pré-molares humanos. Essas lesões foram formadas utilizando a metodologia descrita por **GILMOUR et al.** (1990). Através de visualização em microscopia de luz polarizada, os autores constataram um padrão histológico similar entre as lesões de cárie produzidas *in vitro* e as lesões *in vivo*. Não foi observada a presença de lesões de parede adjacentes ao material ionomérico, ao contrário da RCF, sugerindo um efeito positivo da liberação de flúor e do selamento marginal. A resina fluoretada não parece ter tido efeito em relação à redução da cárie, atentando para o fato de que um material que contém flúor não necessariamente possui ação cariostática nos tecidos dentais adjacentes.

Em 1999, **GROSSMAN & MATEJKA** descreveram e compararam a ocorrência, a freqüência e o padrão de desenvolvimento de lesões artificiais de

cárie secundária em pré-molares humanos restaurados ou não com amálgama. De um total de 132 dentes, 12 não foram restaurados e os outros 120 foram divididos aleatoriamente em 20 grupos com diferentes combinações de materiais restauradores: dois amálgamas de prata, seis materiais de base e dois vernizes. Os dentes foram envelhecidos por períodos de três meses a um ano. Oitenta dentes restaurados e o grupo controle foram imersos individualmente em meio de cultura BHI contendo 3% de sacarose e inoculado com *S. mutans* (ATCC 25175), por 36 dias a 37°C. Os 40 dentes remanescentes foram submetidos a um modelo químico estático, utilizando um regime de incubação similar, mas acidificando o BHI com lactato até um pH 4,0. A maior profundidade, a maior largura e a área das lesões de parede e externa foram medidas em microscópio de luz polarizada. Microscopicamente, foram observadas típicas lesões externas em forma de faixa, que se expandiam para formar a lesão de parede.

FRANCCI *et al.*, em 1999, mediram a liberação de flúor de diversos materiais restauradores adesivos e avaliaram o efeito desse íon na resistência da dentina a desmineralização, e no metabolismo bacteriano. Cavidades padronizadas foram preparadas em dentina bovina e divididas em seis grupos, de acordo com os materiais restauradores utilizados (CIV, RC ou CIVMR). Para cada grupo, 12 espécimes foram avaliados quanto à liberação de flúor nas primeiras 24h após a restauração, e depois foram submetidos a uma solução de ácido láctico (pH 4,3) por 3h, na qual o cálcio liberado foi mensurado. Os outros 12 espécimes de cada grupo foram armazenados por 24h em água deionizada, e imersos em

uma suspensão de *S. mutans* (em meio de cultura THB, contendo 50mM de glicose, com $A_{660} = 0,2$) por 6h, na qual foram medidos a liberação de cálcio e o pH. A elevação da resistência da dentina a desmineralização foi diretamente proporcional à quantidade de flúor liberado pelo material restaurador, considerando-se os desafios químico e biológico.

ITOTA *et al.*, em 2001, avaliaram o efeito de dois adesivos contendo Bis-GMA e um adesivo sem Bis-GMA na inibição de cárie secundária ao redor de cavidades classe V, restauradas com RCMP e RC, em pré-molares humanos. Os autores incubaram os dentes em meio de cultura BHI contendo 1% de sacarose e *S. mutans* (IFO 13955) a 37°C, por 14 dias. Através de microrradiografias, observaram a presença de lesões externas na superfície do esmalte adjacente às restaurações em todos os espécimes. No entanto, notaram a formação de uma fina camada radiopaca adjacente às restaurações com a RCMP, e mais espessa para a associação deste material com o adesivo sem Bis-GMA.

ZANIN *et al.*, em 2003, incubaram fragmentos dentais bovinos abrasionados com três diferentes microrganismos (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguinis*) por 3, 5 e 7 dias, em BHI contendo 5% de sacarose. Os autores avaliaram a contagem microbiana e a extensão das lesões de cárie – através de ensaios de microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente. A extensão da lesão foi diretamente proporcional ao período de incubação, com o *S. mutans* mostrando-se mais cariogênico. No entanto, não houve correlação entre a quantidade de UFC/mg de biofilme dental e a extensão da lesão de cárie.

3. PROPOSIÇÃO

Considerando a literatura consultada e a escassez de estudos que utilizem modelos de natureza distinta para induzir a formação de lesões de cárie e investigar as propriedades cariostáticas dos materiais restauradores, o presente estudo *in vitro* se propôs a:

- Avaliar o desenvolvimento de lesões de cárie secundária – considerando o conteúdo mineral e a profundidade, através da utilização de um modelo químico dinâmico e outro biológico para a indução de lesões artificiais de cárie.

- Analisar a influência dos materiais restauradores na composição bioquímica do biofilme dental formado no modelo biológico, considerando as concentrações de flúor, fósforo e polissacarídeo insolúvel em água.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo *in vitro* teve um delineamento experimental totalmente aleatorizado. Os fatores em estudo neste trabalho foram:

- *Tratamento Restaurador* em 6 níveis (amálgama, resina composta, cimento de ionômero de vidro convencional, cimento de ionômero de vidro modificado por resina composta, resina composta modificada por poliácidos e cimento provisório à base de óxido de zinco).
- *Indução Artificial de Lesões de Cárie* em 3 níveis (modelos químico e biológico e ausência de indução).

As unidades experimentais foram 130 fragmentos dentais bovinos, distribuídos aleatoriamente em seis grupos – de acordo com o tratamento restaurador, e depois em três grupos – em função do modelo de indução de cárie (FIG.1). As variáveis de resposta foram: *Desenvolvimento de Lesões Cariosas Artificiais Adjacentes a Restaurações* – avaliada através de ensaios de microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente e microscopias de luz polarizada, e *Influência dos Materiais Restauradores na Composição do Biofilme Dental* – avaliada através dos níveis de flúor, fósforo inorgânico e glucanos insolúveis.

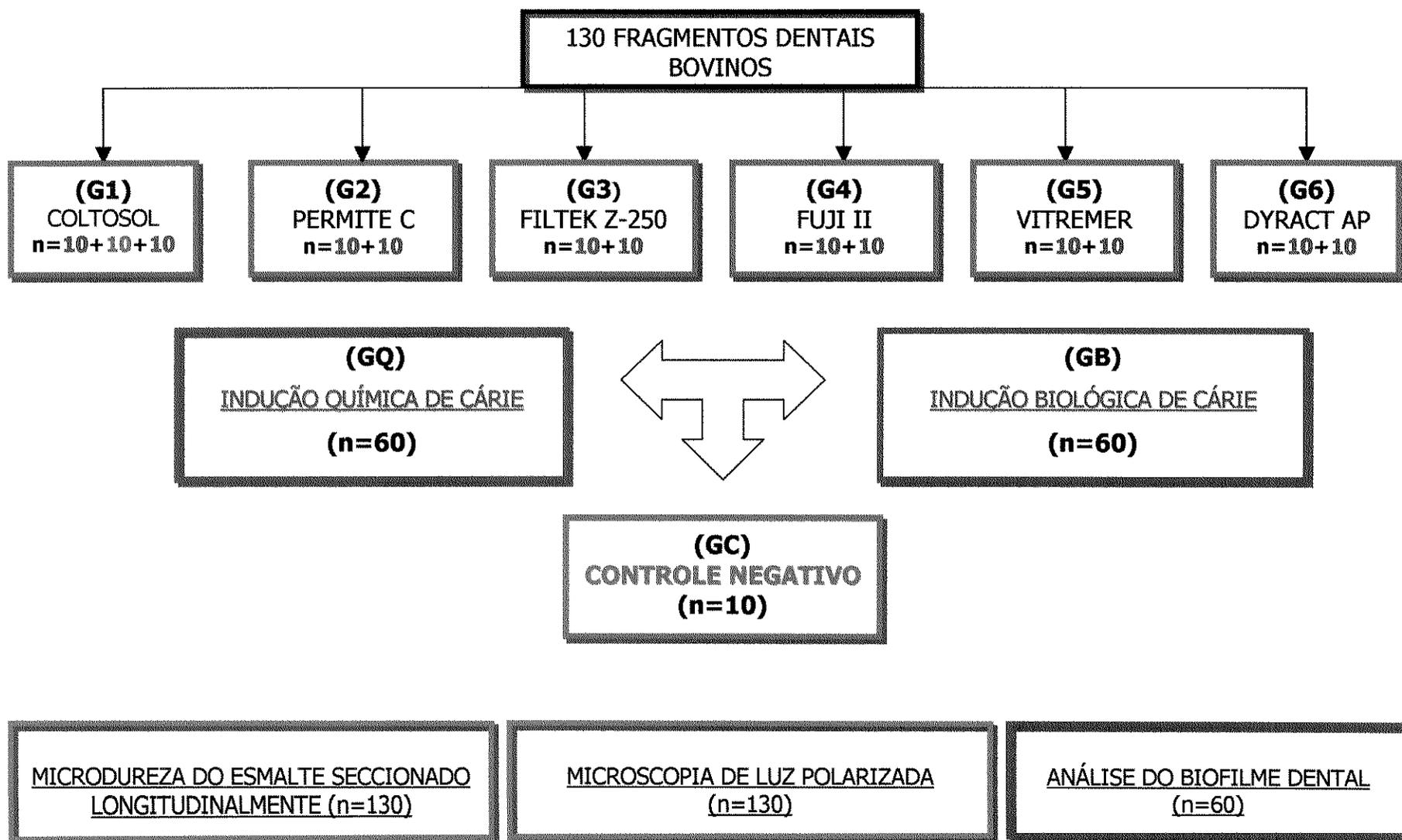


Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental.

4.2. FASE PREPARATÓRIA

4.2.1. SELEÇÃO E CORTE DOS DENTES

Cento e trinta incisivos bovinos inferiores hígidos, mantidos em solução de timol a 0,1% (AMAECCHI *et al.*, 1998b) a 4°C, foram limpos com curetas periodontais (FIG.2a) e lâmina de bisturi #15, seguindo-se do uso de taças de borracha, pedra pomes e água, sob baixa rotação^a. Os dentes com trincas e manchas na superfície do esmalte foram excluídos.

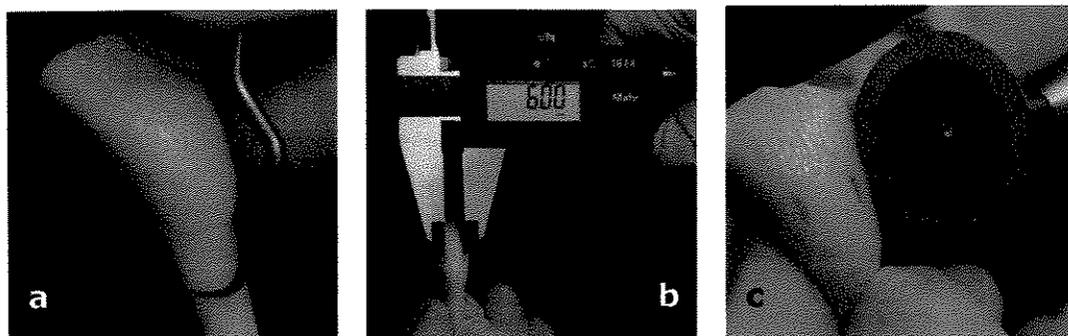


Figura 2: (a) Limpeza dos dentes bovinos. (b, c) Delimitação e corte dos fragmentos vestibulares.

Com o auxílio de um paquímetro digital^b, limites de 6,0mm de comprimento e 6,0mm de largura foram demarcados na região central da face vestibular desses dentes, determinando uma área de 36,0mm² de superfície de esmalte (FIG.2b). Seguindo essas marcações, os cortes foram feitos

^a Kavo do Brasil

^b Digital Caliper, MAHR

manualmente, com discos diamantados dupla-face^c, em baixa rotação e sob refrigeração (FIG.2c).

Os fragmentos obtidos foram fixados com cola quente a cilindros de resina acrílica (FIG.3a), e polidos em politriz^d com o objetivo de ajustar a dentina e abrasionar o esmalte superficial (FIG.3b), padronizando o substrato dental (MELBERG, 1992; TEN CATE *et al.*, 1995). A face dentinária de cada fragmento foi lixada com lixa à base de óxido de alumínio^e de granulação 600, em baixa velocidade e sob refrigeração à água. Em seguida, o fragmento foi fixado em posição contrária, com a dentina voltada para o cilindro de acrílico, e uma fina camada superficial de esmalte ($\pm 100\mu\text{m}$) foi removida com uma lixa de mesma granulação (600). Finalmente, foi utilizada a lixa 1200, e realizado um polimento final com pasta de diamante^g de $1\mu\text{m}$ sobre feltro^f refrigerado com óleo mineral^h.



Figura 3: (a) Fixação dos fragmentos em cilindros de resina; (b) Ajuste da dentina e abrasão do esmalte superficial em politriz; (c) Preparo das cavidades.

^c KG Sorensen Ind e Com Ltda.

^d Maxgrind - Solotest

^e Lixa d'água Waterproof, Carborundum, Brasil

^g Metadi[®] Buehler

^f Metadi[®] Buehler

^h Arotec

Para cada 10 fragmentos dentais, foi utilizado um disco de cada lixa, e o mesmo disco de feltro. Intercalando as lixas, os espécimes foram submetidos a banhos de ultrassomⁱ em água destilada deionizada por cinco minutos, e após o polimento final foram novamente submetidos aos banhos, em solução detergente, por três minutos. Ao final desta etapa, foram obtidos fragmentos dentais bovinos nas dimensões de 6,0mm de comprimento por 6,0mm de largura e 5,0mm de altura.

4.2.2. CONFECCÃO DAS CAVIDADES

Na região central do fragmento, foram confeccionadas cavidades cilíndricas medindo 2,0mm de diâmetro e 2,0mm de profundidade, utilizando pontas diamantadas pré-fabricadas com *stop*^j em alta rotação^k e sob refrigeração (FIG.3c). Essas pontas foram substituídas a cada 10 preparos e utilizadas para o posterior acabamento em baixa rotação. Através de uma reavaliação em lupa estereoscópica^l (40x), os fragmentos com trincas, manchas ou fraturas do ângulo cavo-superficial foram excluídos do estudo.

4.2.3. PROCEDIMENTOS RESTAURADORES

Inicialmente, os 130 fragmentos dentais bovinos foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos de acordo com o tratamento restaurador:

ⁱ Ultrasonic Cleaner T 1440D, Odontobrás

^j KG Sorensen # 2294

^k Kavo do Brasil

^l Meiji 2000, Meiji, China

- (G1) Cimento provisório à base de óxido de zinco – **Coltosol^m** (n=30).
- (G2) Amálgama – **Permite Cⁿ** (n=20).
- (G3) Sistema adesivo *SingleBond^o* + Resina composta – **FiltekTM Z250^o** (n=20).
- (G4) Cimento de ionômero de vidro restaurador – **GC Fuji II^P** (n=20).
- (G4) Ionômero de vidro modificado por resina composta – **Vitremer^{TMq}** (n=20).
- (G5) Sistema adesivo *Prime & Bond NT^r* + Resina composta modificada por poliácidos – **Dyract AP^r** (n=20).

A seqüência das restaurações foi determinada em sorteio aleatório prévio^s. A descrição dos materiais utilizados pode ser observada no Anexo I, e as técnicas restauradoras no Anexo II. Foi utilizado o aparelho fotopolimerizador OPTILUX 500^t para os materiais fotopolimerizáveis. Depois de restaurados, os fragmentos permaneceram em ambiente úmido, a 37°C, por 24h, e somente então, receberam polimento com pontas abrasivas de borracha^u – para as restaurações de amálgama, ou com uma seqüência de discos de lixa à base de óxido de alumínio^v, em baixa rotação e sob refrigeração – para os demais materiais. Ao final desta etapa, os grupos restaurados – **G1, G2, G3, G4, G5 e G6**

^m Colténe, Vigodent, RJ, Brasil

ⁿ S.D.I., Australia

^o 3M Dental Products, St Paul, MN, USA

^p GC Corporation, Tokyo, Japan

^q 3M Dental Products, St Paul, MN, USA

^r Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz

^s Excel, Microsoft®

^t Demetron Kerr, USA

^u KG Sorensen Ind e Com Ltda.

^v Sof-Lex, 3M Dental Products, USA

– foram subdivididos e reagrupados, aleatoriamente, nos seguintes grupos (FIG.1):

(GC) (n=10): grupo **controle**, contendo 10 espécimes do G1.

(GB) (n=60): **indução biológica**, contendo 10 espécimes de cada grupo restaurado.

(GQ) (n=60): **indução química**, contendo 10 espécimes de cada grupo restaurado.

A área dos fragmentos a ser exposta à indução de cárie foi determinada através de papéis adesivos* e esmalte para unhas^x (FIG.4):

- Para o **GC** e o **GB**: toda a superfície de esmalte contendo a restauração permaneceu exposta, com uma área de $36,0\text{mm}^2$ (6,0mm de comprimento x 6,0mm de altura) (FIG.4b).
- Para o **GQ**, foi preservada uma circunferência de 4,0mm de diâmetro – correspondente ao diâmetro da restauração (2,0mm) acrescido de 1,0mm de esmalte circundante. A área calculada dessa circunferência correspondia a $12,56\text{mm}^2$ (área do círculo = $\pi r^2 = 3,14 \times 2^2$) (FIG.4c).

* Contact®

x Colorama

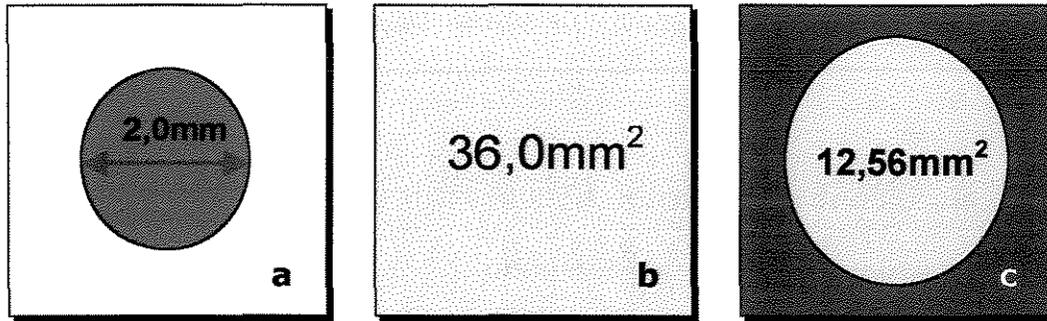


Figura 4: (a) Restauração com 2,0mm de diâmetro; (b) GCN e GB: proteção de toda a superfície vestibular com papel adesivo e isolamento das demais faces; (c) GQ: proteção da restauração acrescida de 1,0mm de esmalte ao redor e isolamento das demais faces.

Diferentes áreas foram deixadas expostas à indução de cárie, para os grupos GB e GQ. A intenção era a de não favorecer a superfície do material restaurador na indução biológica e propiciar uma área maior para a coleta de biofilme posteriormente. Na indução química, visto que o volume das soluções desmineralizadora e remineralizadora é calculado em função da área exposta, esta foi conservada em menores proporções.

4.2.4. PREPARO DOS RECIPIENTES

Os fragmentos restaurados e isolados foram fixados com cola quente a fios ortodônticos #6, de aproximadamente 8,0cm de comprimento (FIG.5a), e estes foram fixados com cera #7 e cola quente à tampa de potes de vidro (FIG.5b), em seqüência numericamente identificada (FIG.5c). Cada pote de vidro continha 10 fragmentos dentais de um mesmo grupo, totalizando 13 potes: seis potes para o GQ, seis potes para o GB e um pote para o GC. Todos os

fragmentos foram imersos em 25mL de água destilada deionizada estéril, e embalados com filme plástico para a posterior esterilização.

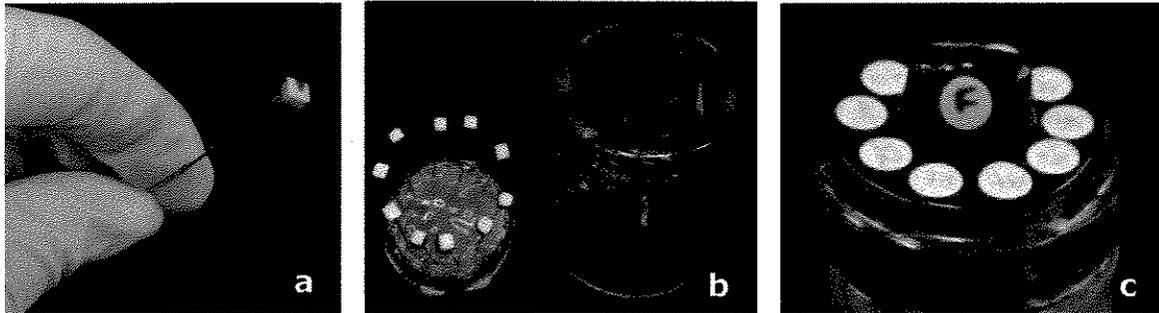


Figura 5: (a) Fixação dos fragmentos dentais em fios ortodônticos; (b) Fixação dos fios ortodônticos nas tampas dos potes de vidro; (c) Identificação dos fragmentos na tampa dos potes.

4.2.5. ESTERILIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DENTAIS

Os potes foram levados ao Centro de Energia Nuclear da Agricultura (C.E.N.A. – USP) para serem submetidos à radiação gama (PARSELL *et al.*, 1996; EDMUNDS *et al.*, 1988; AMAECHI *et al.*, 1998a) sob uma dose de 14,5kGy^w (RODRIGUES *et al.*, 2003) – durante aproximadamente 12,5h (FIG.6). A temperatura da sala permaneceu constante (27°C).

^w GAMMACELL 220 EXCEL (GC-220E)

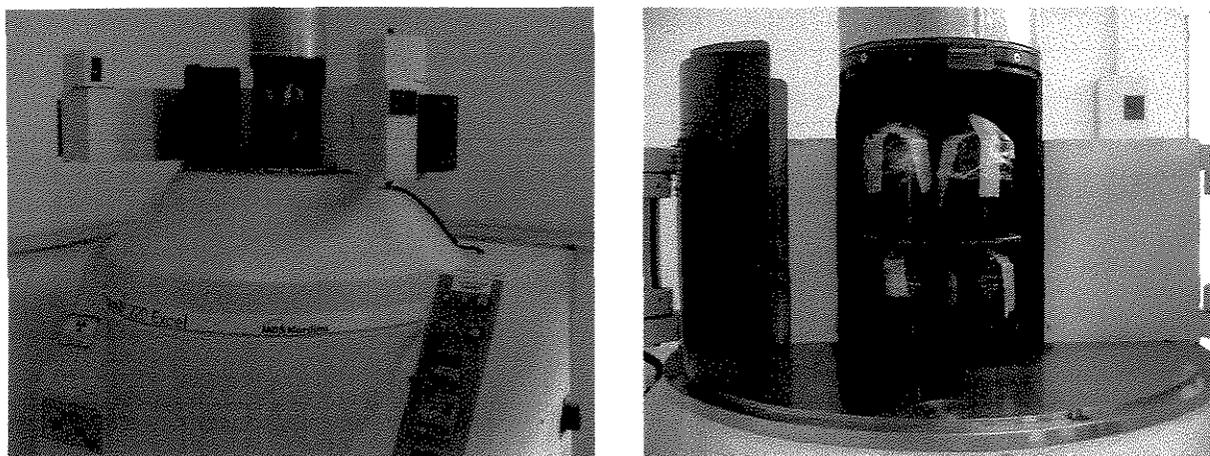


Figura 6. Aparelho de radiação gama para a esterilização dos fragmentos dentais.

4.3. INDUÇÃO DAS LESÕES DE CÁRIE

4.3.1. GRUPO CONTROLE NEGATIVO (GC)

Após a esterilização, a água destilada deionizada do pote desse grupo foi substituída por gaze umedecida, e os espécimes permaneceram em ambiente úmido a 37°C, não sendo submetidos a qualquer modelo de indução de cárie artificial.

4.3.2. MODELO BIOLÓGICO (GB)

O modelo biológico utilizado no presente estudo baseou-se nos estudos de **GILMOUR *et al.*** (1990, 1993, 1997) e foi modificada por **ZANIN *et al.*** (2003). Imediatamente após a esterilização, as tampas dos seis potes do **GB** foram transferidas para novos potes contendo 25,0mL de meio de cultura BHI^y estéril, suplementado com 5% de sacarose. Esta última foi adicionada ao meio

^y Merck, Darmstadt, Germany

previamente à esterilização por autoclave (121°C por 15 minutos), pois em um estudo piloto, verificou-se que não há degradação deste carboidrato quando submetido a tais condições de esterilização.

Para a padronização do inóculo, cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) foram reativadas a partir de culturas de estoque (em BHI glicerol, a -20°C). Diluições seriadas dessas novas culturas em solução salina estéril – 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} – tiveram os valores de absorbância determinados em espectrofotômetro^z a 660nm (BOECKH *et al.*, 2002), e depois foram plaqueadas com alça de drigalsky em BHI ágar* e incubadas por 48 horas a 37°C, sob atmosfera de 10% de CO₂. As UFCs foram contadas em lupa acoplada a um contador**. A contagem determinou que o valor de absorbância de 0,135 ($A_{660}=0,135$) era correspondente a 1,0 a $2,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Novas culturas do microrganismo foram reativadas (FIG.7a,b) em triplicata, na proporção de 100µL da cultura de estoque para 10mL de BHI, e após 18h de crescimento, foi utilizada para o preparo do inóculo aquela que apresentou cadeias médias de crescimento na coloração de Gram.

Após homogeneização**, 1,0mL da cultura foi transferido para um eppendorf estéril (EPP1), o qual foi centrifugado*** a 13,000g por 5 min a 4°C (FIG.7c). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e o precipitado foi

^z Gênese 10uv, Spectronic Unicam

* Merck, Darmstadt, Germany

** Marconi, SP

*** Sanyo

novamente suspenso em 1,0mL de solução salina estéril. Um volume de 250 μ L dessa suspensão foi transferido para outro eppendorf (EPP2), contendo 750 μ L de solução salina estéril. Depois de homogeneizar, 500 μ L dessa solução foram colocados em uma cubeta plástica (C1). Para obter o valor da absorbância dessa suspensão, preparou-se uma cubeta com o “branco”, que continha 500 μ L de solução salina estéril. Essas cubetas foram lidas em espectrofotômetro a 660nm, e a solução da C1 foi diluída ou concentrada, com o objetivo de alcançar a absorbância de 0,135 (FIG.7d). As proporções de suspensão bacteriana e solução salina foram repetidas posteriormente em um terceiro eppendorf (EPP3). Dessa suspensão bacteriana final, 100 μ L foram inoculados em cada pote (FIG.7e) (GILMOUR *et al.*, 1993), e estes foram incubados a 37°C, sob atmosfera de 10% de CO₂ (FIG.7f).

O inóculo foi realizado somente no primeiro dia, embora os meios de cultura tenham sido renovados a cada 24h durante cinco dias (EDMUNDS *et al.*, 1988) (FIG.8a,b). Antes de serem descartados, os meios eram diariamente avaliados quanto à contaminação, através de coloração de Gram, e quanto ao pH, utilizando-se fitas de pH*.

Os valores de pH medidos no meio a ser descartado após 24h de incubação, através de fitas de pH, corresponderam a 4,0 para todos os grupos, em todos os cinco dias de desafio biológico.

* Merck, Darmstadt, Germany

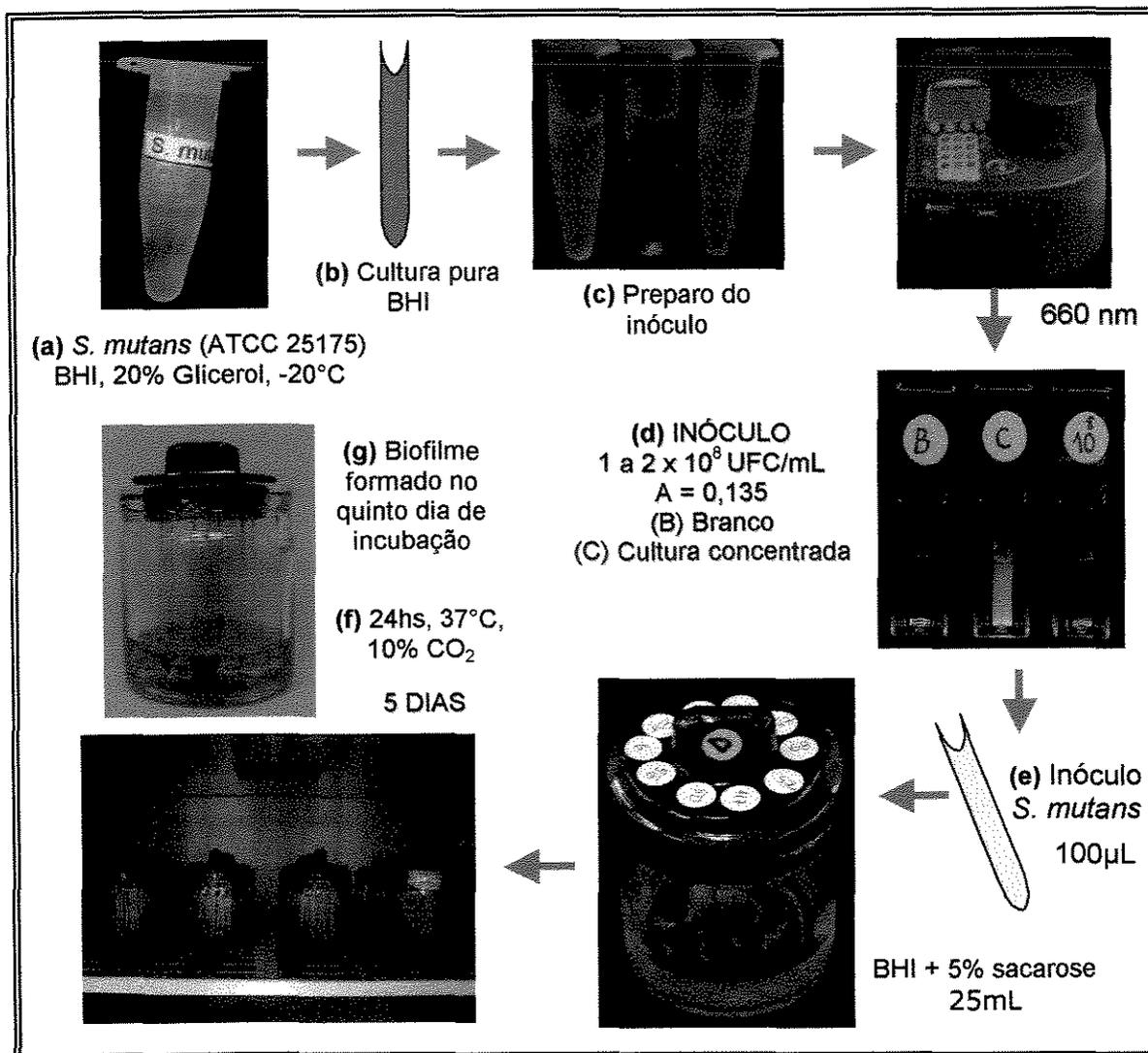


Figura 7. Esquema da indução biológica.

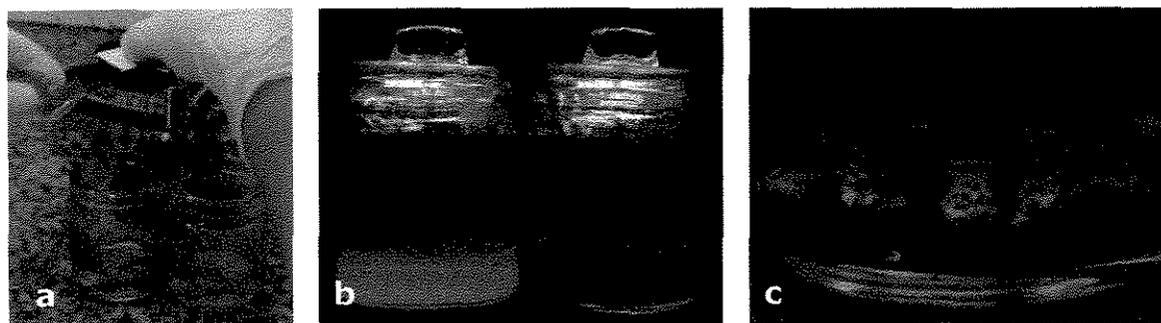


Figura 8. (a) Troca dos meios a cada 24h. (b) A cultura bacteriana e o meio estéril. (c) Biofilme formado após cinco dias de incubação.

4.3.3. MODELO QUÍMICO (GQ)

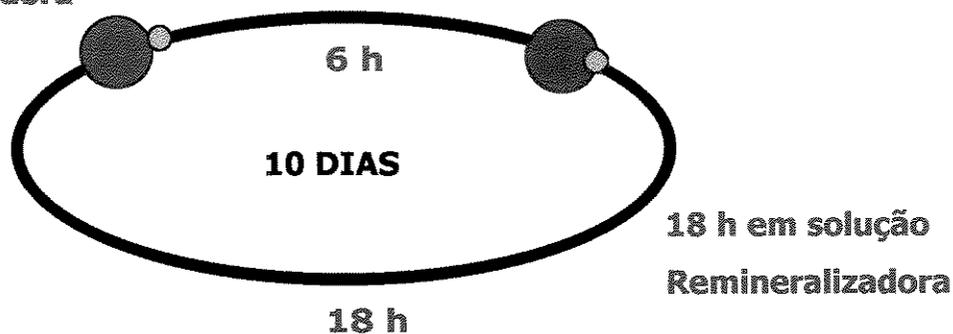
Simultaneamente à indução microbiológica, os 60 espécimes do grupo GQ foram submetidos a um regime de ciclagens de pH baseado nos estudos de FEATHERSTONE *et al.* (1986), DELBEM & CURY (2002) e ARGENTA *et al.* (2002). Estudos pilotos prévios foram realizados para determinar o número de ciclos, a composição das soluções desmineralizadora e remineralizadora e o período para a sua renovação dessas. Isso porque a velocidade de formação de lesão de cárie no dente bovino é maior que no dente humano (FEATHERSTONE & MELBERG, 1981).

Os fios ortodônticos foram removidos das tampas dos potes de vidro e fixados individualmente na tampa de 60 potes plásticos. A ciclagem iniciou-se com a imersão de cada espécime em 39,25mL de solução remineralizadora por 18h, a 37°C. Após esse período, os fragmentos dentais eram lavados por 30s em água destilada deionizada, secos com papel absorvente e imersos em 78,50mL de solução desmineralizadora por 6h, a 37°C (FIG.9). O volume das soluções DES e RE foi calculado em função da área exposta à ciclagem (12,56mm²), na proporção de 6,25mL/mm² e 3,125mL/mm², respectivamente (SHINKAI *et al.*, 2001).

No total, foram realizados 10 ciclos de 24h (FIG.9), renovando-se diariamente a solução RE e apenas uma vez a solução DES, completado o quinto ciclo (DELBEM & CURY, 2002; PAES LEME *et al.*, 2003). Durante o fim de semana, os espécimes permaneceram por dois dias em solução RE, a 37°C.

6 h em solução

Desmineralizadora



○ 30s de enxágüe com água destilada deionizada e secagem com papel absorvente

SOLUÇÃO REMINERALIZADORA	SOLUÇÃO DESMINERALIZADORA
(3,18mL/mm ²)	(6,39mL/mm ²)
1,5mM Ca(OH) ₂	2,0mM Ca(OH) ₂
0,9mM H ₃ PO ₄ 85%	2,0mM H ₃ PO ₄ 85%
150mM KCl	75mM Acetato
20mM TRIS	0,03 ppm F ⁻
0,05 ppm F ⁻	pH 4,3
pH 7,0	Cristais de timol
Cristais de timol	

Figura 9. Diagrama das ciclagens de pH e composição das soluções DES e RE.

4.4. ANÁLISES

4.4.1. ANÁLISE BIOQUÍMICA DO BIOFILME DENTAL

Terminado o desafio biológico de cárie, os biofilmes acumulados sobre os fragmentos dentais foram lavados por três vezes consecutivas e de forma padronizada em solução salina estéril para a remoção das células não aderidas

(HAYACIBARA *et al.*, 2003) (FIG.10a,b). Utilizando espátulas plásticas estéreis, o biofilme disposto sobre a face de esmalte vestibular e a restauração foi cuidadosamente removido de cada fragmento (FIG.10c), e acondicionado em eppendorfs pré-pesados, estéreis e identificados (FIG.10d). O peso dos biofilmes foi determinado utilizando-se uma balança analítica*, e subtraindo-se o peso dos eppendorfs vazios (Anexo III). As amostras foram tratadas com 0,5mL de HCl 0,5M para cada 10mg de peso úmido de biofilme dental, durante 3h, em temperatura ambiente, sob agitação (CURY *et al.*, 2000). Após esse período, adicionou-se a essas amostras o mesmo volume de TISAB II (contendo 20g NaOH/L, pH 5,0) (CURY *et al.*, 2001).

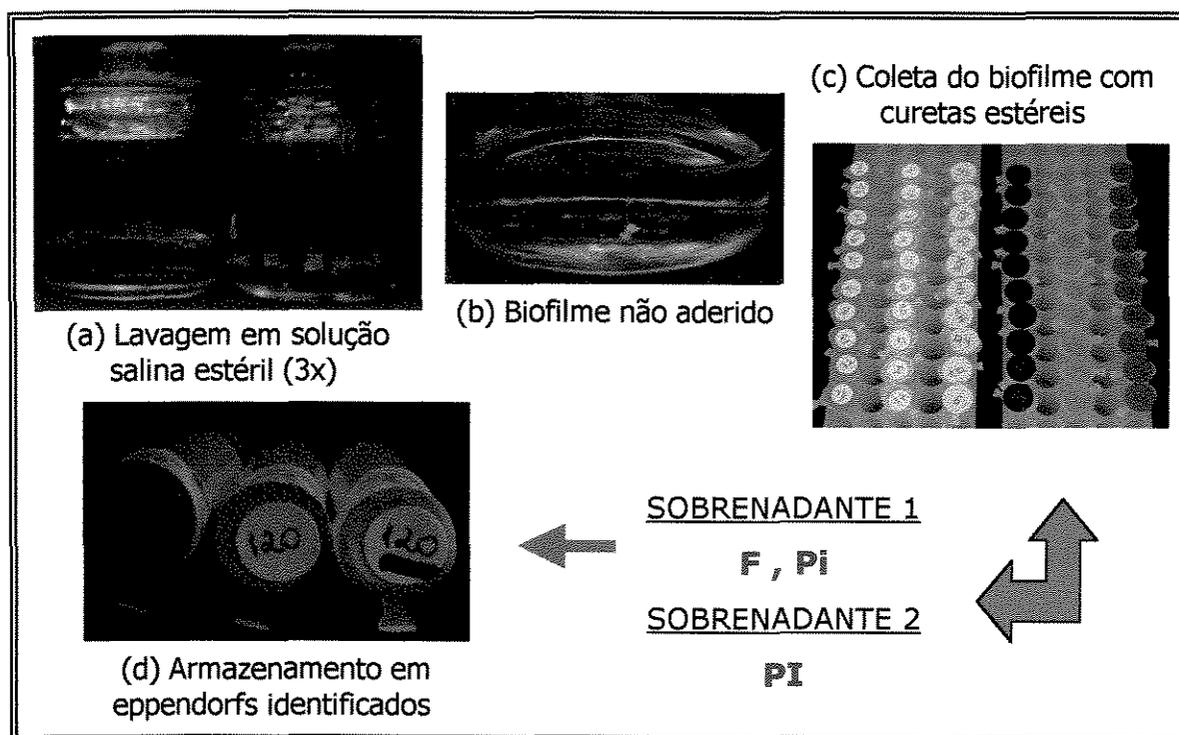


Figura 10. Esquema da coleta e armazenamento do biofilme dental.

* Chyo, JS 110, YMC Co, Japan

As amostras foram centrifugadas durante 5 min a 13,000g e a 4°C, sendo o sobrenadante (SB1) armazenado em eppendorfs identificados, para a posterior análise da concentração de flúor (F⁻) e fósforo inorgânico (Pi) presentes no biofilme dental (FIG.10 e 11). Ao precipitado (PPT1) foi adicionado 1,0mL de NaOH 1,0M para cada 10mg de peso úmido de biofilme dental. O precipitado foi novamente suspenso e deixado 3h em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas conforme descrito acima, tendo sido o sobrenadante (SB2) armazenado em eppendorfs identificados, para a posterior análise da concentração de polissacarídeos insolúveis em água (PI).

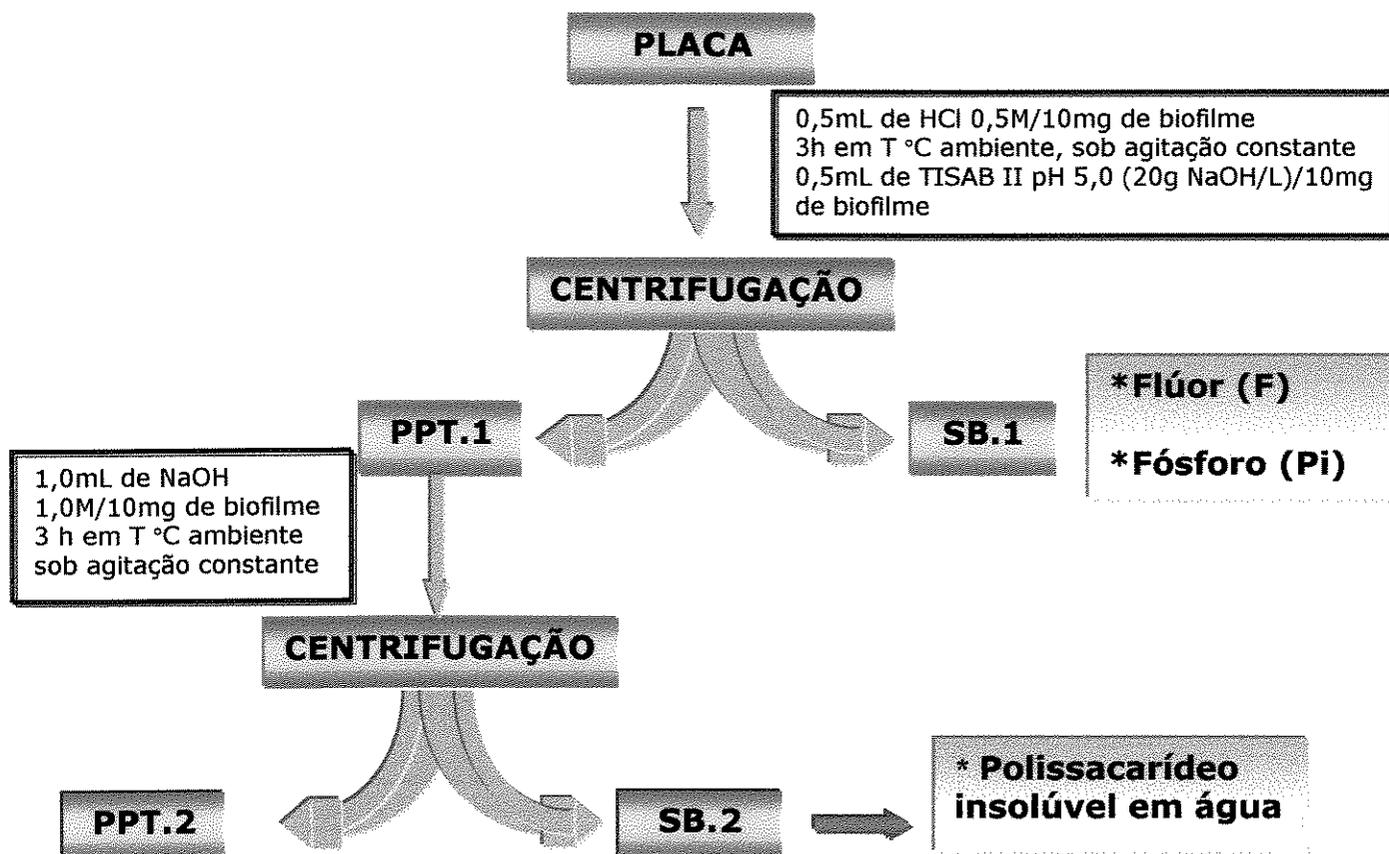


Figura 11. Esquema do tratamento do biofilme dental.

4.4.1.1. FLÚOR (F)

A concentração de flúor no SB1 foi determinada através de um potenciômetro^z com um eletrodo específico para flúor ORION 96-09, utilizando uma curva de calibração com padrões de 0,025 a 2,0ppm F⁻(TAB.1), preparados com TISAB II pH 5,0 (20g NaOH/L) e HCl 1,0M. As leituras das amostras foram expressas em milivolt (mV) e transformadas em µgF⁻/mL (ppm F⁻) através da regressão linear da curva de calibração, e calculadas em função do peso do biofilme em miligramas.

Tabela 1. Preparo da curva de calibração para a dosagem de F⁻.

PADRÕES	PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (ppm F ⁻)							Unidade
	Branco	0,025	0,05	0,1	0,5	1,0	2,0	
0,1 ppm	-	0,5	-	-	-	-	-	mL
0,2 ppm	-	-	0,5	-	-	-	-	mL
0,4 ppm	-	-	-	0,5	-	-	-	mL
2,0 ppm	-	-	-	-	0,5	-	-	mL
4,0 ppm	-	-	-	-	-	0,5	-	mL
8,0 ppm	-	-	-	-	-	-	0,5	mL
HCl 1,0M	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	mL
TISAB II	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	mL
HCl 0,5M	1,0	-	-	-	-	-	-	mL

4.4.1.2. FÓSFORO INORGÂNICO (Pi)

A determinação da concentração de fósforo inorgânico no SB1 foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por FISKE & SUBAROW (1925) e a

^z ORION EA-940, Orion Research Inc., Boston, MA 02129

intensidade de cor, medida em um espectrofotômetro* a 660nm. Este método tem como princípio a transformação do fósforo dos fosfatos minerais em fosfomolibdato, o qual em seguida é reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol-sulfônico (agente redutor), gerando um produto de cor azul, cuja intensidade da coloração é proporcional ao teor de fósforo inorgânico presente na amostra.

Foram realizadas quatro curvas de calibração em duplicata – uma duplicata para cada 20 amostras, com padrões de fósforo variando de 0,3 a 2,4 μ gPi/mL, a partir de uma solução padrão de fósforo a 3,0mg % (TAB.2):

Tabela 2. Preparo da curva de calibração para a dosagem de Pi.

REAGENTES	PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (ppm Pi)						UNIDADE
	Branco	0,3	0,6	1,2	1,8	2,4	
H ₂ O miliQ	400	390	380	360	340	320	μ L
FÓSFORO 3,0mg %	0	10	20	40	60	80	μ L
ÁC. MOLÍBDICO	83	83	83	83	83	83	μ L
AGENTE REDUTOR	33	33	33	33	33	33	μ L
VOLUME FINAL	516	516	516	516	516	516	μ L

Os volumes de amostra utilizados variaram de 0,15 a 0,25mL (SB1), aos quais foi acrescentado o volume de água miliQ necessário para completar 400 μ L, além de 83 μ L de ácido molíbdico. Após a colocação do ácido, a solução foi imediatamente agitada, e, decorridos 10 min, foram adicionados 33 μ L do agente redutor. Agitou-se novamente, e, após 20 min, a intensidade de cor foi medida no espectrofotômetro (660nm), previamente calibrado com os padrões. Os valores de

* Analyser 800M

absorbância foram transferidos para uma planilha no Excel®, onde foram convertidos em $\mu\text{gPi}/\text{mg}$ de biofilme dental.

4.4.1.3. POLISSACARÍDEO INSOLÚVEL EM ÁGUA (PI)

A concentração dos polissacarídeos insolúveis nas amostras de placa foi determinada utilizando-se o SB2. Foi empregado o método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS *et al.*, 1956), que se baseia na capacidade de um açúcar (pentose ou hexose) formar compostos furfúricos quando na presença de um ácido forte (H_2SO_4). Esses compostos furfúricos, na presença de fenol, adquirem uma coloração laranja cuja intensidade é proporcional ao teor de polissacarídeo da amostra.

Foi realizada uma curva de calibração em duplicata, com padrões de glicose variando de 5 a $25\mu\text{g}/\text{mL}$, a partir de uma solução de glicose anidra, na concentração de $100\mu\text{g}/\text{mL}$ (TAB.3).

Tabela 3. Preparo da curva de calibração para a dosagem de PI.

PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (ppm PI)							
PADRÕES	Branco	5	10	15	20	25	UNIDADE
GLICOSE	0	5	10	15	20	25	μL
NaOH 4%	20	20	20	20	20	20	μL
H ₂ O miliQ	200	195	190	185	180	175	μL
FENOL 5%	200	200	200	200	200	200	μL
H ₂ SO ₄	1000	1000	1000	1000	1000	1000	μL

Após a mensuração da intensidade de cor dos padrões em espectrofotômetro a 490nm, foi realizado um teste para o volume das amostras a ser utilizado (10, 15 ou 20 μ L). As amostras foram então preparadas com as mesmas proporções de fenol e ácido sulfúrico, e medidas 20 min após o seu preparo, repetindo-se a curva a cada 15 amostras. No total, foram realizadas quatro duplicatas de curva de calibração para a medida de 60 amostras. Os valores de absorbância foram transferidos para uma planilha no Excel®, onde foram convertidos em μ gPI/mg de biofilme dental úmido.

4.4.2. ANÁLISE DAS LESÕES DE CÁRIE

Após a fase de indução de cárie, os 130 fragmentos dentais foram seccionados longitudinalmente através do centro de suas restaurações e uma das metades foi embutida em cilindros codificados de resina de poliestireno, expondo a porção interna do esmalte e da restauração. Essas metades embutidas foram avaliadas quanto a microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente. Das metades remanescentes, foram retiradas fatias de $100 \pm 20\mu$ m para posterior análise em microscópio de luz polarizada.

4.4.2.1. MICRODUREZA DO ESMALTE SECCIONADO LONGITUDINALMENTE

As metades embutidas em resina foram seqüencialmente lixadas em politriz a 300 rpm e sob refrigeração, utilizando-se lixas de óxido de alumínio nas granulações 400, 600 e 1200, trocadas a cada 10 espécimes. O polimento foi realizado com pastas de diamante de 6, 3 e 1 μ m sobre discos de feltro,

refrigerados com óleo mineral. Intercalando a escala de polimento, os espécimes foram imersos em banhos de ultrassom por 10 minutos, para a remoção das partículas de lixa e de diamante.

A desmineralização do esmalte adjacente às restaurações foi avaliada em microdurômetro*, com penetrador tipo *Knoop* e carga estática de 25g aplicada por 5s, visualizando-se as superfícies dentais com o auxílio do monitor** do próprio aparelho. Vinte e quatro impressões em esmalte foram realizadas para cada espécime – 12 em cada margem da restauração: em distâncias de 50, 150, 250 e 350µm da interface dente/restauração e em profundidades de 30, 60 e 90µm, partindo-se da superfície do esmalte (FIG.12). Os valores de microdureza *Knoop* foram transformados em porcentagem de volume mineral, através da equação: $4,3 (\sqrt{KHN}) + 11,3$ (FEATHERSTONE *et al.*, 1983).

* Future-Tech – FM – Japan

** Monitor 9M 100A, Teli, Japan

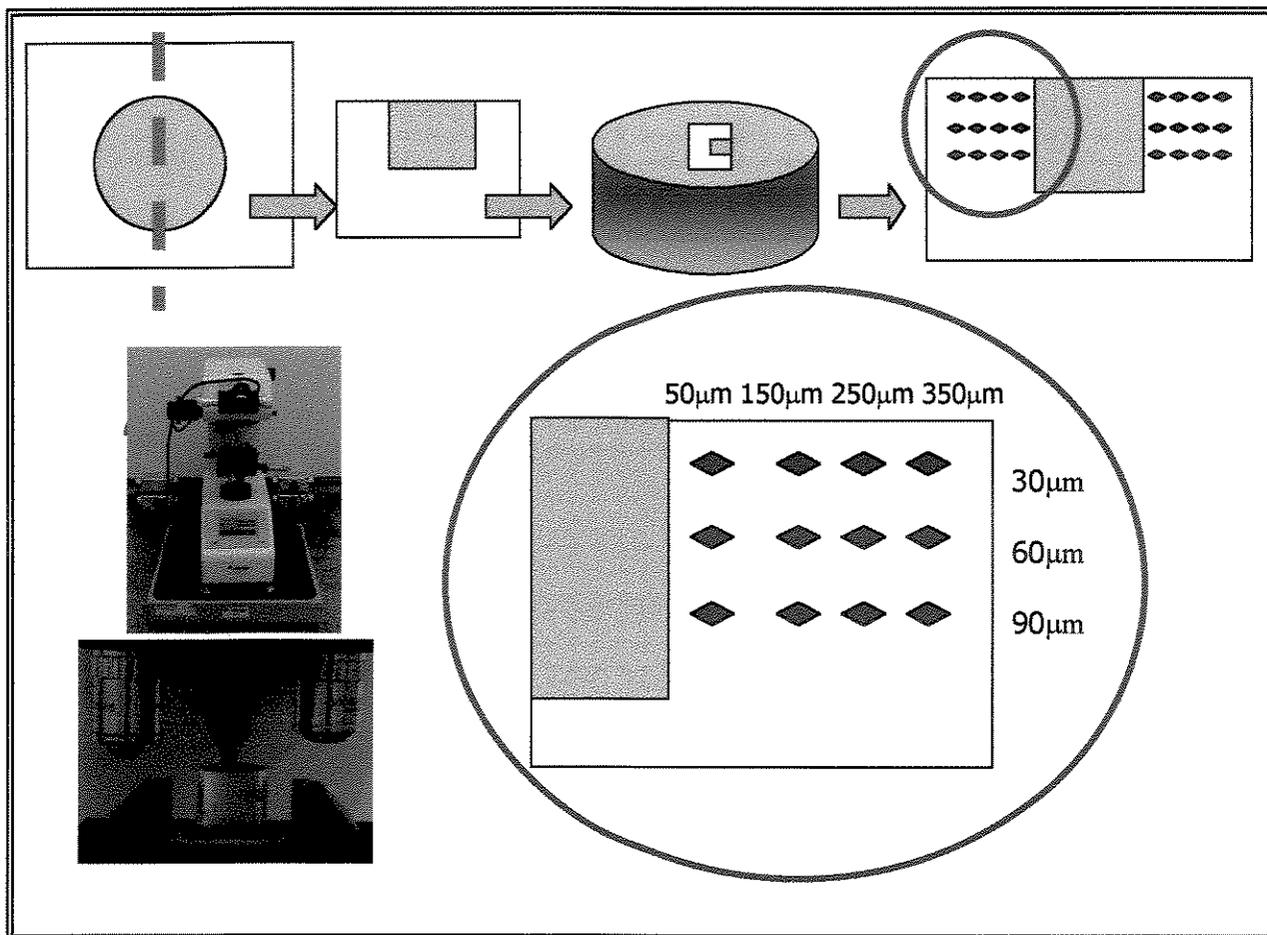


Figura 12. Corte, inclusão e esquema das 24 impressões realizadas nos fragmentos dentais.

4.4.2.2. MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

As metades não incluídas em resina foram seccionadas longitudinalmente para a obtenção de fatias dentais de aproximadamente 400µm de espessura (FIG.13a,b). Essas secções foram lixadas manualmente com lixas de óxido de alumínio (granulações 600 e 1200) dispostas sobre placas de vidro e refrigeradas com água, até que a espessura final alcançasse $0,10 \pm 0,02\text{mm}$ (Hsu

et al., 1998; GROSSMAN & MATEJKA, 1999), conferindo-se com paquímetro digital (FIG.13c).

As secções foram embebidas em água, dispostas sobre lâminas de vidro seladas com lamínulas, e visualizadas em microscópio de luz polarizada* com uma câmera acoplada. As imagens, captadas com uma lente de 10x de aumento, foram transferidas para o monitor de um computador, através do software Image-Pro® Plus** (FIG.13d) (AL-HELAL, *et al.*, 2003). A distância entre a superfície do esmalte e o limite mais inferior da lesão foi medida nas distâncias de 50, 150, 250 e 350µm da margem da restauração, utilizando uma ferramenta de medida linear do programa de computador (FIG.13e). Os resultados foram obtidos em micrometros, correspondendo à profundidade das lesões de cárie nestas distâncias.

* LEICA, MLST

** Version 4.1 for Windows™, Media Cybernetics

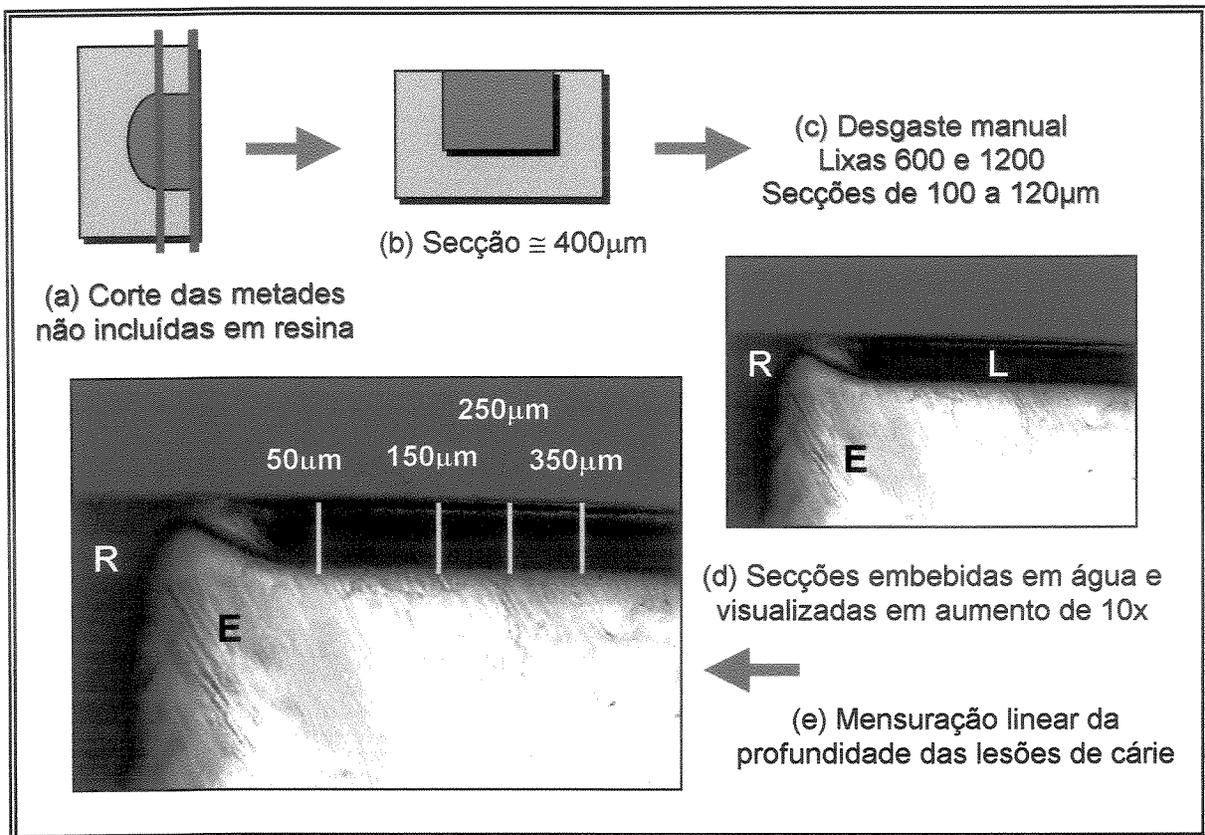


Figura 13. Esquema da análise das lesões em microscópio de luz polarizada. (R) restauração, (E) esmalte, (L) lesão de cárie.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória utilizando o programa estatístico SAS*, para observar se as variáveis de resposta apresentavam distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Os dados que não apresentaram essas características foram devidamente transformados. Todas as análises foram realizadas considerando o nível de significância de 5%, utilizando os *softwares* SAS e Sanest.

* SAS Institute Inc, Cary, NC 27513, USA

4.5.1. VOLUME MINERAL (%)

Os valores médios de porcentagem de volume mineral para o GB, o GQ e o GC foram analisados pelo ANOVA em esquema de parcela sub-sub-dividida, avaliando os efeitos dos fatores: Grupo (GC, G1, G2, G3, G4, G5 e G6), Distância da margem da restauração (50, 150, 250 e 350 μ m) e Profundidade em relação à superfície do esmalte (30, 60 e 90 μ m), e a interação entre eles. O teste de Tukey foi aplicado para comparar os níveis dos fatores ($\alpha=0,05$).

4.5.2. PROFUNDIDADE DA LESÃO (μ m)

Os dados de profundidade das lesões foram analisados pelo ANOVA em esquema de parcela subdividida, avaliando os efeitos dos fatores: Material Restaurador (Coltosol, Permite C, Filtek Z250, Fuji II, Vitremer e Dyract AP) e Distância da margem da restauração (50, 150, 250 e 350 μ m), e a interação entre eles. O teste de Tukey foi empregado para comparar os níveis dos fatores ($\alpha=0,05$).

4.5.3. ANÁLISE DO BIOFILME DENTAL (F, PI E Pi)

Os dados de concentração de F⁻, PI e Pi no biofilme dental foram analisados pelo ANOVA, após sofrerem transformações: inverso da raiz quadrada ($y=1/\sqrt{x}$), logarítmica ($y=\log(x)$) e inversa ($y=1/x$), respectivamente. O teste de Tukey foi empregado para comparar os materiais restauradores dentro do GB ($\alpha=0,05$).

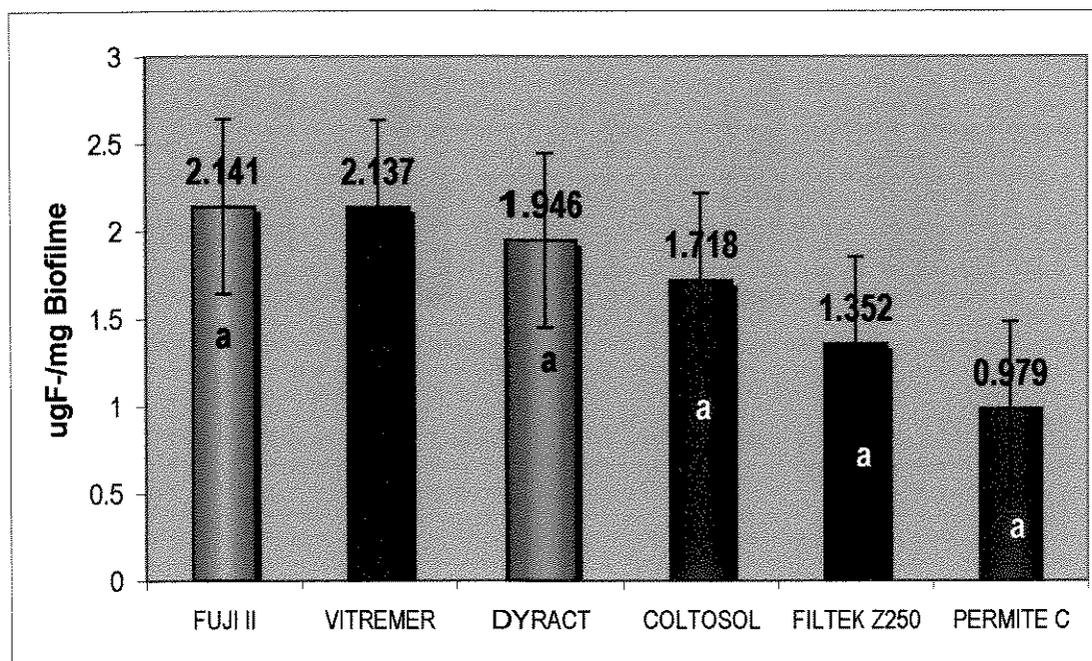
5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DO BIOFILME DENTAL

Flúor (F)

O teste ANOVA revelou a inexistência de diferenças estatisticamente significativas para a concentração de flúor no biofilme dental formado sobre os diferentes materiais restauradores ($p=0,1671$) (GRAF.1) (Anexo IV).

Gráfico 1. Concentrações de flúor no biofilme dental ($\mu\text{gF/g}$) em função do Material Restaurador (n=10).

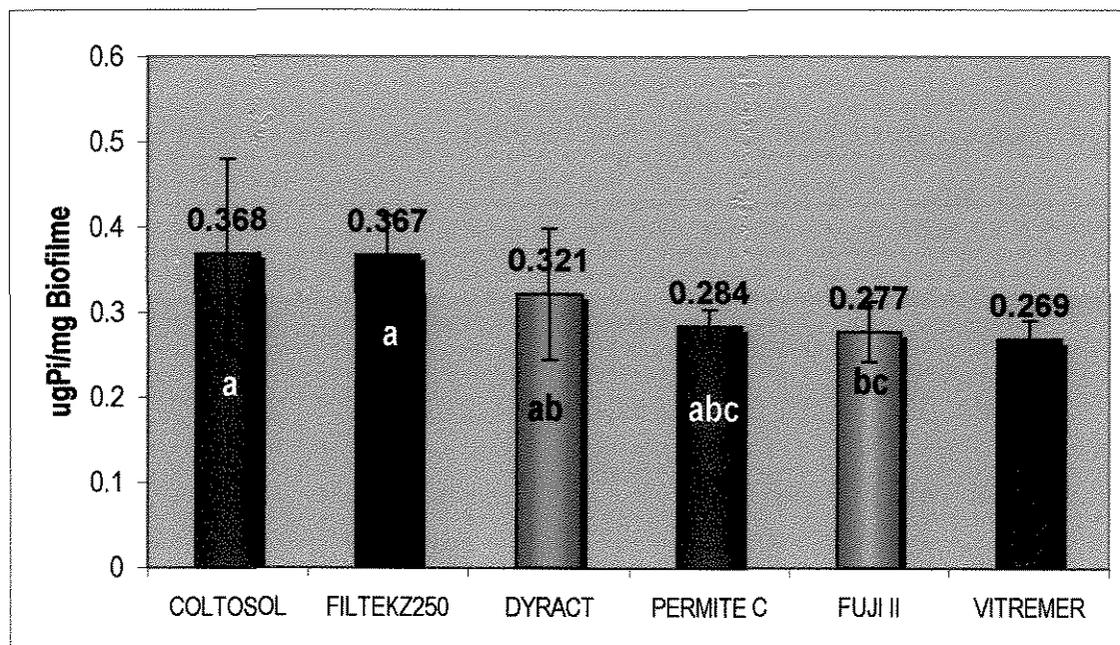


CV: 26,79. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Fósforo Inorgânico (Pi)

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $p=0,0001$) para as concentrações de fósforo inorgânico no biofilme dental sobre os diferentes materiais restauradores testados (GRAF.2) (Anexo IV).

Gráfico 2. Concentrações de fósforo inorgânico no biofilme dental ($\mu\text{gPi}/\text{mg}$) em função do Material Restaurador ($n=10$).



CV: 13,91. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

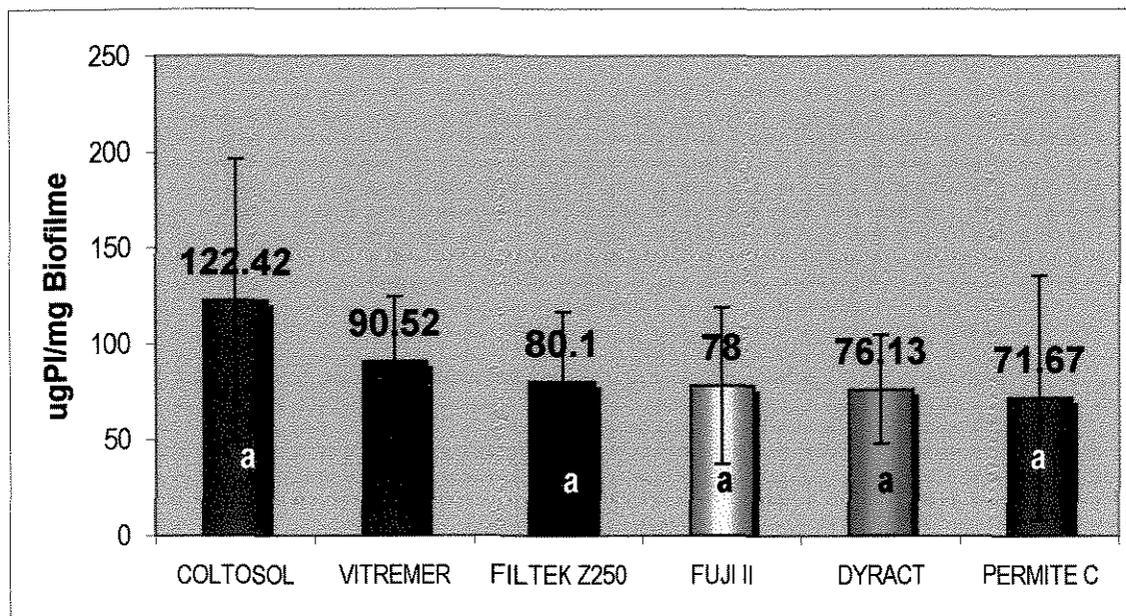
As maiores concentrações desse mineral foram observadas no biofilme formado sobre o cimento provisório (Coltosol) e a resina composta (Filtek Z250). Valores intermediários foram encontrados para a resina modificada por poliácidos (Dyract AP), para o amálgama (Permite C) e para o cimento de ionômero de vidro

(Fuji II). A menor concentração de fósforo inorgânico foi observada no biofilme formado sobre o ionômero de vidro modificado por resina (Vitremmer).

Polissacarídeo Insolúvel em Água (PI)

O teste ANOVA não detectou nenhuma diferença estatisticamente significativa considerando-se a quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis em água no biofilme formado sobre os materiais restauradores testados ($p=0,2669$) (GRAF.3) (Anexo IV).

Gráfico 3. Concentrações de polissacarídeo insolúvel em água no biofilme dental ($\mu\text{gPI}/\text{mg}$), em função do Material Restaurador ($n=10$).



CV: 12,86. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

5.2. ANÁLISE DAS LESÕES DE CÁRIE

5.2.1. PORCENTAGEM DE VOLUME MINERAL

5.2.1.1. INDUÇÃO BIOLÓGICA

A análise de variância em esquema de parcela sub-sub-dividida detectou diferenças estatisticamente significativas entre os níveis dos fatores Grupo ($p=0,00001$), Distância da margem da restauração ($p=0,00001$) e Profundidade com relação à superfície do esmalte ($p=0,00001$) (Anexo IV). Pode-se observar interação entre os fatores Grupo e Distância ($p=0,0004$) e Grupo e Profundidade ($p=0,00001$) – indicando o efeito dos materiais restauradores sobre a lesão de cárie formada nas diferentes posições em relação à margem da restauração e à superfície do esmalte. Não ocorreu interação tripla (Grupo x Distância x Profundidade, $p=0,2450$). Os níveis do fator Grupo foram comparados pelo teste de Tukey, em cada nível dos fatores Distância (TAB.4) e Profundidade (TAB.5).

Os dados da tabela 4 mostram que os materiais ionoméricos (Vitremer e Fuji II) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com relação ao grupo controle nas quatro distâncias avaliadas, demonstrando valores elevados de conteúdo mineral. Entretanto, esses materiais ionoméricos também não diferiram dos demais materiais nas distâncias de 150, 250 e 350 μm . Na posição mais afastada da restauração (350 μm), o Vitremer e o Fuji II diferiram apenas da resina composta (Filtek Z250). Esta resina composta apresentou valores mais elevados

de conteúdo mineral na distância de 50 μ m, assemelhando-se ao grupo controle, o que não ocorreu nas distâncias seguintes.

Tabela 4. Volume mineral (médias \pm dp) considerando a interação entre os fatores Grupo e Distância.

GRUPOS	DISTÂNCIAS (μ m)			
	50	150	250	350
CONTROLE (GC)	95,4 \pm 3,8 aA	95,5 \pm 4,4 aA	95,7 \pm 3,6 aA	95,7 \pm 3,9 aA
VITREMER (G5)	84,6 \pm 13,8 abA	78,6 \pm 14,3 abA	78,5 \pm 13,8 abA	79,7 \pm 14,0 abA
FUJI II (G4)	81,3 \pm 14,0 abA	78,3 \pm 13,5 abA	76,4 \pm 14,9 abA	75,1 \pm 14,5 abA
COLTOSOL (G1)	68,0 \pm 14,8 bA	69,2 \pm 15,5 bA	66,8 \pm 15,1 bA	66,2 \pm 15,3 bcA
DYRACT (G6)	67,0 \pm 15,1 bA	65,2 \pm 14,5 bA	64,2 \pm 14,5 bA	64,6 \pm 16,9 bcA
PERMITE C (G2)	65,1 \pm 14,3 bA	64,5 \pm 14,8 bA	66,0 \pm 16,1 bA	64,2 \pm 15,9 bcA
FILTEK (G3)	73,8 \pm 14,8 abA	58,0 \pm 17,0 bB	58,8 \pm 15,5 bB	58,2 \pm 15,4 cB

CV(parcela): 4,44 – CV(sub-parcela): 3,9 – CV(sub-sub-parcela): 6,04. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As letras minúsculas indicam as diferenças entre os grupos, e as letras maiúsculas indicam as diferenças entre as distâncias.

Houve formação da lesão de cárie, evidenciada através da redução do conteúdo mineral em todos os materiais testados e todas as distâncias avaliadas (TAB.4). A resina composta (Filtek Z250) foi o único material cujo comportamento apresentou diferenças estatisticamente significativas considerando as distâncias avaliadas: a 50 μ m da margem da restauração, esse material demonstrou menor perda mineral em comparação às demais distâncias.

A tabela 5 evidencia a progressão da lesão de cárie, demonstrando a ocorrência de perda mineral para os grupos submetidos à indução de cárie, em todas as profundidades avaliadas.

Tabela 5. Volume mineral (médias \pm dp) considerando a interação entre os fatores Grupo e Profundidade.

GRUPOS	PROFUNDIDADES (μm)		
	30	60	90
CONTROLE (GC)	95,4 \pm 3,8 aA	95,5 \pm 4,4 aA	95,7 \pm 3,6 aA
VITREMER (G5)	70,2 \pm 15,0 bB	83,5 \pm 12,1 abA	89,9 \pm 9,0 abA
FUJI II (G4)	67,1 \pm 14,1 bB	83,1 \pm 13,0 bcA	87,2 \pm 8,5 abA
DYRACT (G6)	52,6 \pm 10,2 cC	72,7 \pm 16,0 cdB	83,7 \pm 10,9 abA
COLTOSOL (G1)	52,1 \pm 8,3 cC	69,7 \pm 10,5 cdB	81,4 \pm 8,1 bA
PERMITE C (G2)	47,6 \pm 6,1 cC	68,1 \pm 8,7 dB	83,1 \pm 8,5 bA
FILTEK (G3)	47,0 \pm 11,9 cC	67,0 \pm 11,5 dB	80,9 \pm 13,9 bA

CV(parcela): 4,44 – CV(sub-parcela): 3,9 – CV(sub-sub-parcela): 6,04. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As letras minúsculas indicam as diferenças entre os grupos, e as letras maiúsculas indicam as diferenças entre as profundidades.

Na profundidade de 30 μm – que apresentou desmineralização mais severa para esse modelo de indução – os materiais ionoméricos (Vitremer e Fuji II) obtiveram valores intermediários de conteúdo mineral, diferindo do grupo controle e dos demais grupos. A 60 μm da superfície do esmalte, o ionômero modificado por resina (Vitremer) não diferiu estatisticamente do grupo controle nem do cimento de ionômero de vidro (Fuji II). O amálgama (Permite C) e a resina composta (Filtek Z250) apresentaram maior desmineralização, diferindo

estatisticamente do grupo controle e dos materiais ionoméricos. Na profundidade de 90 μ m, a desmineralização foi significativamente menor do que nas outras profundidades. Os materiais Vitremer, Fuji II e Dyract apresentaram valores intermediários de conteúdo mineral, não diferindo do grupo controle ou dos demais materiais.

5.2.1.2. INDUÇÃO QUÍMICA

De forma semelhante à indução biológica, o teste ANOVA em esquema de parcela sub-sub-dividida revelou que houve diferença significativa entre os níveis dos fatores: Grupo ($p=0,00001$), Distância ($p=0,00001$) e Profundidade ($p=0,00001$) (Anexo IV). Pode-se observar interação entre os fatores Grupo e Distância ($p=0,00008$), e Grupo e Profundidade ($p=0,00001$). Porém, não houve interação tripla ($p=0,9203$). Os níveis do fator Grupo foram comparados pelo teste de Tukey em cada nível dos fatores Distância (TAB.6) e Profundidade (TAB.7).

A tabela 6 mostra que, nesse modelo químico, houve desmineralização do esmalte adjacente a todos os materiais restauradores testados. Na posição mais próxima à restauração (50 μ m), o ionômero modificado por resina (Vitremer) apresentou valores intermediários de conteúdo mineral, diferindo apenas do amálgama (Permite C) e da resina composta (Filtek Z250). O mesmo ocorreu para o cimento ionomérico (Fuji II) nessa distância, embora este tenha diferido apenas da resina composta. Na distância de 150 μ m, o comportamento dos materiais

ionoméricos (Vitremer e Fuji II) foi similar à primeira distância, com ambos diferindo apenas do amálgama e da resina composta.

Nas posições de 250 e 350 μ m da margem da restauração, apenas o Vitremer não diferiu estatisticamente do grupo controle. Este mesmo material diferiu somente do amálgama e da resina composta a 250 μ m, e do amálgama a 350 μ m.

Tabela 6. Volume mineral (médias \pm dp) considerando a interação entre os fatores Grupo e Distância.

GRUPOS	DISTÂNCIAS (μ m)			
	50	150	250	350
CONTROLE (GC)	95,4 \pm 3,8 aA	95,5 \pm 4,4 aA	95,7 \pm 3,6 aA	95,7 \pm 3,9 aA
VITREMER (G5)	75,7 \pm 11,9 abA	63,3 \pm 13,8 abAB	60,5 \pm 15,9 abAB	57,6 \pm 15,1 abB
FUJI II (G4)	70,8 \pm 14,2 abcA	57,8 \pm 18,4 abAB	52,3 \pm 17,1 bcB	43,7 \pm 12,4 bcB
COLTOSOL (G1)	55,8 \pm 18,5 bcdA	51,6 \pm 15,6 bcA	44,8 \pm 11,8 bcA	48,6 \pm 11,9 bcA
DYRACT (G6)	45,6 \pm 11,0 bcdA	39,3 \pm 11,2 bcA	38,8 \pm 10,4 bcA	39,9 \pm 11,4 bcA
PERMITE C (G2)	44,3 \pm 11,2 cdA	32,8 \pm 6,9 cAB	31,5 \pm 4,2 cB	31,1 \pm 4,7 cB
FILTEK (G3)	34,7 \pm 9,7 dA	30,2 \pm 5,9 cA	32,8 \pm 8,9 cA	35,0 \pm 8,6 bcA

CV(parcela): 11,99 – CV(sub-parcela): 8,62 – CV(sub-sub-parcela): 12,23. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As letras minúsculas indicam as diferenças entre os grupos, e as letras maiúsculas indicam as diferenças entre as distâncias.

Comparando a desmineralização nas diferentes distâncias para cada material, fica claro que o efeito cariostático do Vitremer e do Fuji II é maior nas posições mais próximas à restauração. Em adição, o amálgama demonstrou redução da lesão de cárie no esmalte imediatamente adjacente à restauração

(50 μ m), apesar de ter apresentado significativa desmineralização com relação ao grupo controle.

Tabela 7. Volume mineral (médias \pm dp) considerando a interação entre os fatores Grupo e Profundidade.

GRUPOS	PROFUNDIDADES (μ m)		
	30	60	90
CONTROLE (GC)	95,4 \pm 3,8 aA	95,5 \pm 4,4 aA	95,7 \pm 3,6 aA
VITREMER (G5)	63,7 \pm 9,8 bB	56,2 \pm 17,8 bC	74,7 \pm 16,1 abA
FUJI II (G4)	53,6 \pm 13,5 bB	50,8 \pm 19,2 bcC	64,7 \pm 20,1 bcA
COLTOSOL (G1)	38,0 \pm 6,9 cC	51,6 \pm 11,5 bcB	68,1 \pm 15,0 bcA
DYRACT (G6)	38,5 \pm 9,3 cB	37,2 \pm 9,6 cdB	51,2 \pm 16,9 cA
PERMITE C (G2)	35,9 \pm 6,9 cA	30,5 \pm 5,3 dB	36,5 \pm 9,5 dA
FILTEK (G3)	32,6 \pm 6,7cA	29,0 \pm 6,4 dB	34,3 \pm 10,5 dA

CV(parcela): 11,99 – CV(sub-parcela): 8,62 – CV(sub-sub-parcela): 12,23. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As letras minúsculas indicam as diferenças entre os grupos, e as letras maiúsculas indicam as diferenças entre as profundidades.

Analisando a tabela 7, observa-se menor desmineralização para o Vitremer e o Fuji II na profundidade de 30 μ m, quando comparados aos demais materiais restauradores. Na profundidade de 60 μ m – onde a desmineralização foi mais severa para esse modelo de indução – a resina modificada por poliácidos (Dyract AP), o amálgama e a resina composta perderam significativamente mais mineral em relação ao Vitremer. O cimento provisório (Coltosol) não diferiu dos materiais ionoméricos ou da resina modificada por poliácidos nessa profundidade.

A 90 μ m da superfície do esmalte, o Vitremer recuperou os níveis de conteúdo mineral, assemelhando-se ao grupo controle. Os materiais Fuji II, Coltosol e Dyract AP apresentaram valores intermediários de conteúdo mineral, enquanto que o amálgama e a resina composta demonstraram grande perda mineral mesmo nessa profundidade.

5.2.2. PROFUNDIDADE DAS LESÕES DE CÁRIE

5.2.2.1. INDUÇÃO BIOLÓGICA

A análise de variância em esquema de parcela sub-dividida revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os níveis dos fatores Material Restaurador ($p=0,0134$) e Distância da margem da restauração ($p=0,0465$) (Anexo IV). A interação entre esses fatores ($p=0,0169$) demonstrou que houve efeito dos diferentes tratamentos restauradores testados sobre os valores de profundidade das lesões de cárie nas diferentes distâncias avaliadas. Os níveis do fator Grupo foram comparados pelo teste de Tukey em cada distância (TAB.8).

Na posição mais próxima à margem da restauração (50 μ m), o Fuji II e o Vitremer demonstraram significativamente menores valores de profundidade de lesão em relação ao Coltosol, embora não tenham diferido dos outros materiais. Na distância de 150 μ m, somente o Vitremer diferiu estatisticamente do Coltosol. Os demais materiais (Filtek Z250, Permite C, Dyract AP, Coltosol e Fuji II) apresentaram valores intermediários de profundidade de lesão. A 250 e 350 μ m da

margem da restauração, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os materiais testados.

Tabela 8. Profundidade da lesão de cárie (μm , médias \pm dp) considerando a interação entre os fatores Material Restaurador e Distância.

MATERIAL RESTAURADOR	DISTÂNCIAS (μm)			
	50	150	250	350
COLTOSOL (G1)	126,5 \pm 42,8 aA	111,2 \pm 43,4 aAB	105,9 \pm 50,6 aB	120,1 \pm 39,7 aAB
FILTEK (G3)	101,7 \pm 23,4 abA	96,2 \pm 24,0 abA	108,1 \pm 28,9 aA	98,9 \pm 20,6 aA
PERMITE C (G2)	101,5 \pm 40,6 abA	102,1 \pm 47,8 abA	102,4 \pm 29,4 aA	104,9 \pm 45,5 aA
DYRACT (G6)	85,9 \pm 22,2 abA	88,3 \pm 21,9 abA	91,5 \pm 28,9 aA	91,9 \pm 28,6 aA
FUJI II (G4)	74,2 \pm 41,6 bA	73,2 \pm 44,0 abA	70,8 \pm 44,3 aA	75,9 \pm 48,4 aA
VITREMER (G5)	56,2 \pm 33,2 bB	60,9 \pm 27,4 bAB	69,1 \pm 21,2 aAB	79,1 \pm 25,2 aA

CV (parcela): 36,71 – CV (sub-parcela): 14,80. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As letras minúsculas indicam as diferenças entre os materiais restauradores, e as letras maiúsculas indicam as diferenças entre as distâncias.

Considerando as distâncias dentro de cada material restaurador, o Vitremer demonstrou efeito cariostático no esmalte imediatamente adjacente à restauração, apresentando menores valores de profundidade de lesão a 50 μm , quando comparado à distância de 350 μm . O Coltosol, por outro lado, obteve maior profundidade de lesão de cárie a 50 μm da margem de restauração, quando comparado à distância de 250 μm .

5.2.2.2. INDUÇÃO QUÍMICA

O teste ANOVA em esquema de parcela sub-dividida revelou a presença de diferenças significativas somente entre os níveis do fator Material Restaurador ($p=0,0047$) (Anexo IV). Não houve interação entre os fatores: Material Restaurador e Distância da margem da restauração ($p=0,2004$). Desse modo, não foi observado o efeito dos materiais restauradores sobre a formação da lesão de cárie nas quatro distâncias avaliadas. Os níveis do fator Material Restaurador foram comparados entre si pelo teste de Tukey (TAB.9).

Tabela 9. Profundidade da lesão de cárie (μm , médias \pm dp) considerando os materiais restauradores em cada distância.

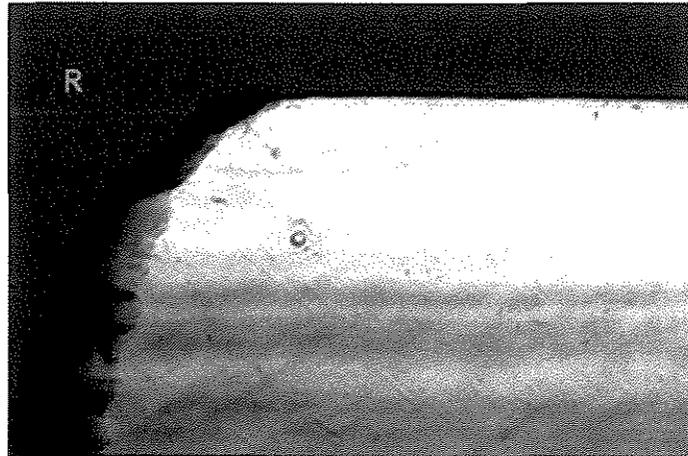
MATERIAL RESTAURADOR	DISTÂNCIA (μm)			
	50	150	250	350
FILTEK (G3)	182,3 \pm 33,2 aA	179,1 \pm 34,1 aA	188,2 \pm 41,0 aA	180,7 \pm 32,1 aA
PERMITE C (G2)	175,0 \pm 64,0 abA	157,3 \pm 50,0 abA	159,4 \pm 48,2abA	154,5 \pm 45,4 abA
DYRACT (G6)	154,1 \pm 34,0 abA	156,2 \pm 32,5 abA	155,9 \pm 29,5 abA	153,9 \pm 30,4 abA
COLTOSOL (G1)	130,8 \pm 41,4 abA	149,9 \pm 56,5 abA	145,0 \pm 53,8 abA	141,5 \pm 55,4 abA
FUJI II (G4)	127,8 \pm 20,2 bA	121,1 \pm 15,0 bA	130,8 \pm 26,0 bA	124,7 \pm 26,4 bA
VITREMER (G5)	114,6 \pm 26,0 bA	124,5 \pm 22,1 bA	121,5 \pm 38,7 bA	133,7 \pm 46,6 bA

CV: 12,91. Os tratamentos seguidos de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$). As letras minúsculas indicam as diferenças entre os materiais restauradores e as letras maiúsculas indicam as diferenças entre as distâncias.

Em todas as distâncias, os materiais ionoméricos (Vitremmer e Fuji II) apresentaram lesões menos extensas em profundidade quando comparados à

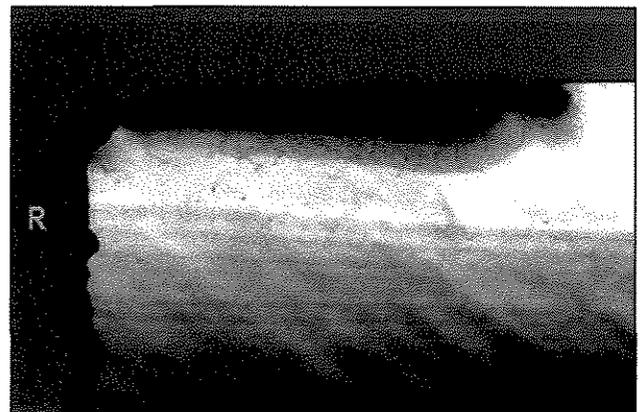
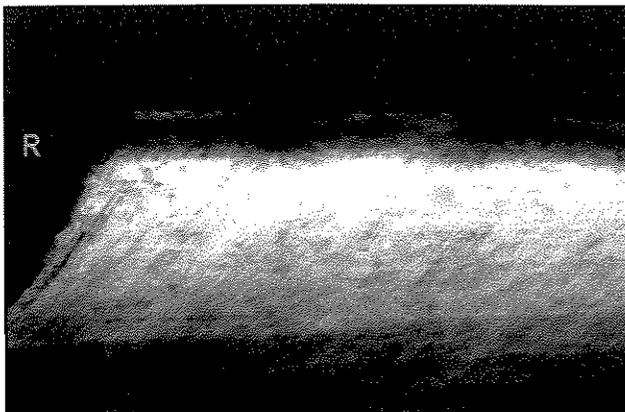
resina composta. Os materiais Permite C, Dyract AP e Coltosol apresentaram valores intermediários de profundidade de lesão.

5.3. MICROSCOPIAS DE LUZ POLARIZADA



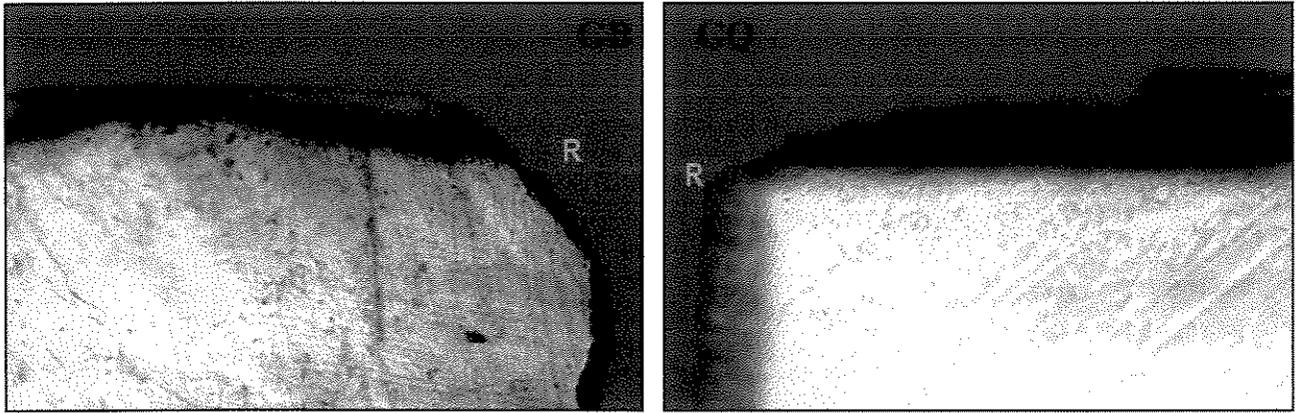
GC – CONTROLE NEGATIVO

A observação da microscopia de luz polarizada dos espécimes do grupo controle negativo (sem indução de cárie) evidenciou a integridade do esmalte. A profundidade da lesão neste caso é nula. (R) Restauração.



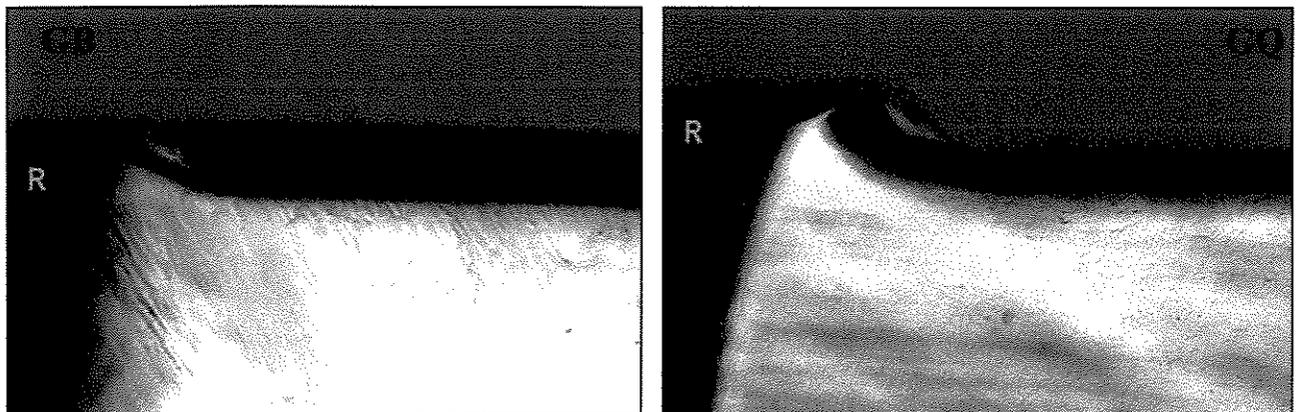
G1 – COLTOSOL

Este cimento provisório à base de óxido de zinco apresentou formação de cárie nos dois modelos de indução, embora a lesão tenha sido menor no modelo biológico em função da menor severidade desse desafio.



G2 – PERMITE C

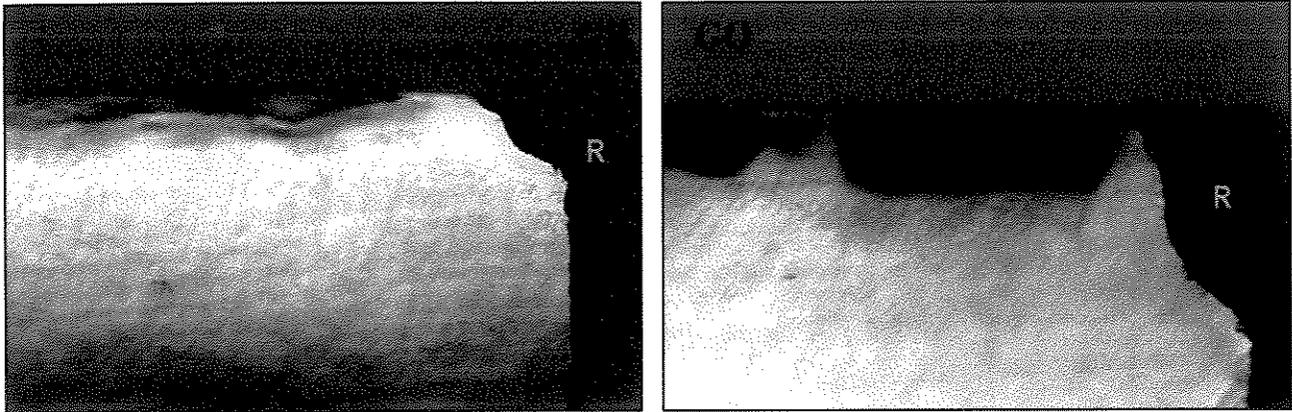
O amálgama obteve a formação de lesões severas em ambos os modelos, mas a desmineralização no modelo químico parece ter sido ainda mais severa, e parte da superfície e do corpo da lesão foi perdida durante o desgaste manual da secção dental para a microscopia.



G3 – FILTEK Z250

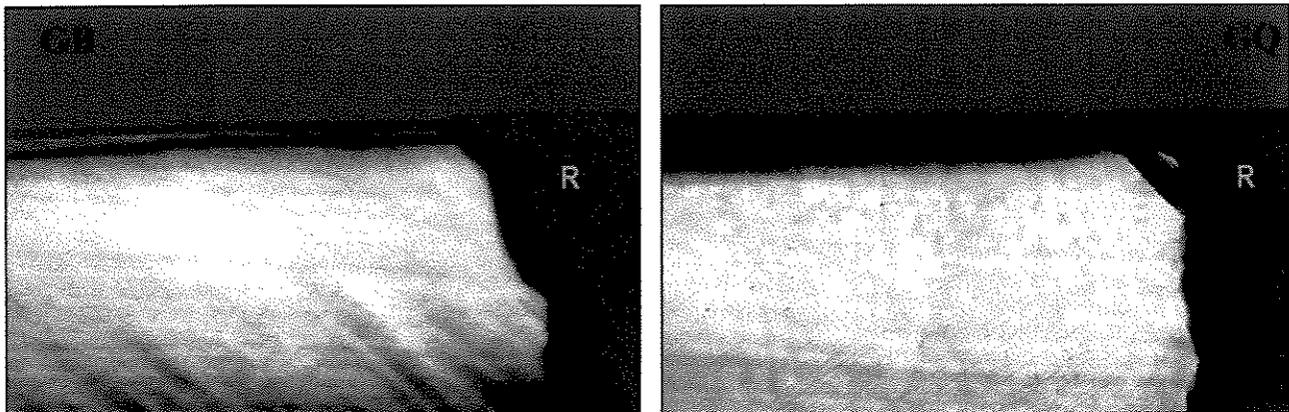
A mesma severidade observada para o amálgama ocorreu para a resina composta no modelo químico. No modelo biológico, pode-se observar a integridade da superfície da lesão, a qual não foi perdida durante o desgaste manual do espécime. Ainda nesse modelo, a profundidade de lesão de cárie é

nitidamente menor no esmalte imediatamente adjacente à restauração, sugerindo a ocorrência do selamento marginal.



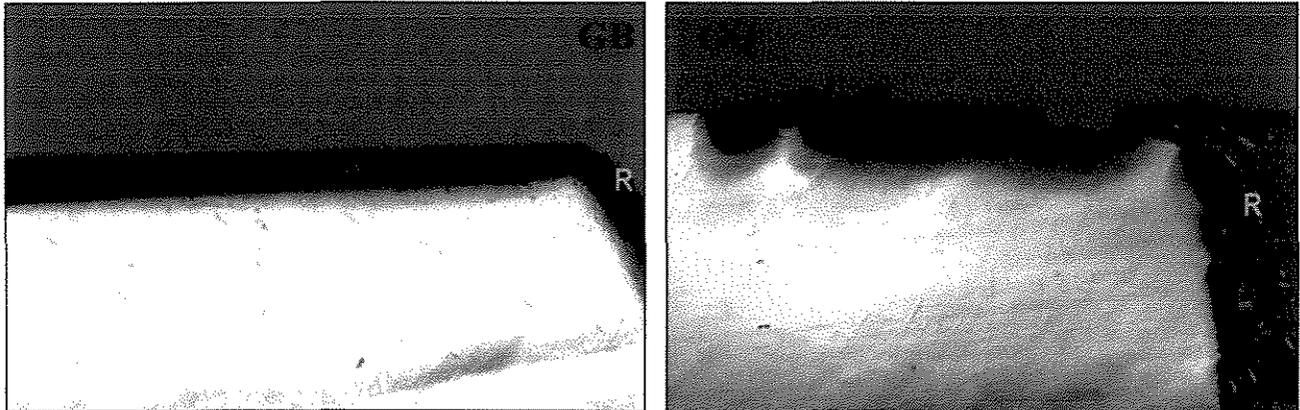
G4 – FUJI II

Para o cimento de ionômero de vidro, nota-se uma zona de inibição de lesão de cárie no esmalte imediatamente adjacente à restauração. Apesar desse efeito cariostático, esse material não foi capaz de evitar o desenvolvimento da lesão.



G5 – VITREMER

O ionômero modificado por resina composta demonstrou menores profundidades de lesão de cárie nas posições mais próximas à margem da restauração, mas também não evitou a formação da lesão.



G6 – DYRACT AP

A resina composta modificada por poliácidos, assim como o amálgama e a resina composta, perdeu parte da superfície e do corpo da lesão durante o preparo do espécime em função da severa desmineralização oferecida pelo modelo químico.

Em todas as microscopias, pode-se observar o padrão da lesão de cárie subsuperficial e em forma de faixa contínua, para ambos os modelos de indução empregados.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, os modelos químico e biológico foram capazes de induzir a formação de lesões de cárie ao redor das restaurações, em concordância com **GROSSMAN & MATEJKA (1999)** e **FRANCCI *et al.* (1999)**. Os materiais restauradores comportaram-se de maneira semelhante em ambos os desafios cariogênicos, embora estes tenham apresentado graus de severidade distintos. Entretanto, não seria possível comparar esses modelos experimentais, visto que são metodologias essencialmente diferentes.

Foi demonstrado um maior efeito cariostático para os cimentos ionoméricos modificado por resina e convencional, revelado através dos maiores conteúdos minerais e das menores profundidades de lesão de cárie, em ambos os modelos de indução. Entretanto, esses materiais não foram capazes de prevenir completamente o desenvolvimento das lesões. Esses resultados concordam com diversos estudos *in vitro* que utilizaram, isoladamente, géis ácidos (**TANTBIROJN *et al.*, 1997**; **DYONISOPOULOS *et al.*, 1998**; **PEREIRA *et al.*, 1998a**; **DONLY & SEGURA, 2002**), ciclagens de pH (**SERRA & CURY, 1992**; **SERRA, 1995**; **HARA *et al.*, 2002**), culturas simples (**NAGAMINE *et al.*, 1994**; **VALENZUELA *et al.*, 1994**; **GILMOUR *et al.*, 1997**; **GILMOUR & EDMUNDS, 1998**) e câmaras de fluxo contínuo (**TORII *et al.*, 2001**).

Este estudo caracterizou-se pela utilização simultânea de um regime de ciclagens de pH e um modelo de cultura simples para avaliar o potencial cariostático de materiais restauradores. Com o mesmo objetivo, **FRANCCI *et al.***

(1999) e **GROSSMAN & MATEJKA** (1999) utilizaram modelos biológicos – cultura simples, e químicos – soluções ácidas.

As propriedades cariostáticas dos materiais ionoméricos podem ser explicadas pela elevada liberação de flúor nos primeiros dias após a restauração (**CARVALHO & CURY**, 1999; **PENG et al.**, 2000). Os fluoretos liberados estariam agindo nos micro-espacos da interface dente/restauração e na superfície do esmalte adjacente, inibindo a desmineralização e ativando a remineralização (**FEATHERSTONE et al.**, 1986; **TEN CATE et al.**, 1995; **SERRA & CURY**, 1992). Nesse sentido, os materiais ionoméricos possuem implicações clínicas relevantes, especialmente em pacientes cárie-ativos, pois funcionam como agentes terapêuticos locais no controle dessa doença.

A quantidade de flúor liberado por um material restaurador está intimamente relacionada à ação cariostática do mesmo (**DIONYSOPOULOS et al.**, 1998; **DONLY & SEGURA**, 2002), e é afetada diretamente pelas suas características físico-químicas (**PRESTON et al.** 2003). Esse fato poderia explicar as diferenças freqüentemente encontradas entre os efeitos cariostáticos de cimentos de ionômero de vidro (CIV) convencionais e de resinas compostas contendo flúor (RCF). Os primeiros liberam de 10 a 50 vezes mais flúor que os últimos (**CARVALHO & CURY**, 1999), uma vez que a fonte de flúor na RCF permanece aprisionada na matriz resinosa, dificultando a absorção de água e a conseqüente liberação de flúor (**PRESTON et al.** 2003). Materiais como o cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) e a resina composta modificada por

poliácidos (RCMP) poderiam oferecer efeitos intermediários (DIONYSOPOULOS *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 1998b; HICKS *et al.*, 2000). No entanto, alguns autores reportam semelhanças na liberação de flúor entre os cimentos de ionômero de vidro convencionais e aqueles modificados por resina (PENG *et al.*, 2000; ATTAR & TURGUT, 2003).

No presente estudo, o CIVMR testado ofereceu efeitos cariostáticos superiores à RCMP e ao CIV, em concordância com TANTBIROJN *et al.* (1997); TORII *et al.* (2001) e HARA *et al.* (2002). Esse resultado confirma a observação de que um material que contém flúor nem sempre oferece propriedades cariostáticas aos tecidos dentais adjacentes (GILMOUR & EDMUNDS, 1998). Segundo CARVALHO & CURY (1999), PENG *et al.* (2000) e ATTAR & TURGUT (2003), restaurações recentes de RCMP liberam menores quantidades de fluoretos quando comparadas aos materiais ionoméricos (CIV e CIVMR). Quimicamente semelhantes às resinas compostas, as RCMP possuem um padrão de liberação de flúor semelhante às RCF, sendo a única diferença atribuída a menor tamanho das partículas de flúor-silicato de estrôncio ($\cong 1\mu\text{m}$) (PENG *et al.*, 2000).

A lesão de cárie secundária pode se formar a partir de duas frentes de desafio cariogênico – na superfície do esmalte e na parede cavitária (PIMENTA *et al.*, 1995; HICKS *et al.*, 2002). Dessa forma, a prevenção da microinfiltração – diminuindo a difusão de ácidos na interface dente/restauração – é uma das maneiras de reduzir a formação de lesões de cárie secundária, além da liberação de fluoretos (PIMENTA *et al.*, 1998). Sendo assim, a capacidade de selar as

margens cavitárias também é uma propriedade desejada para o material restaurador. **Hsu et al.** (1998) observaram a formação de uma zona dentinária de inibição de cárie ao longo das paredes cavitárias adjacentes aos materiais liberadores de flúor. Entretanto, também foi observada uma zona de inibição, embora mais fina, ao redor dos materiais adesivos que não liberaram flúor. Esse fato provavelmente está associado à formação da camada híbrida, que é ácido-resistente (**TORII et al.**, 2001).

No presente estudo, dois materiais apresentaram menor desmineralização na posição mais próxima à restauração (50 μ m), em comparação com as demais distâncias: a resina composta no modelo biológico (TAB.4), e o amálgama no modelo químico (TAB.7). É possível que o condicionamento ácido e o sistema adesivo tenham oferecido alguma resistência ao desafio ácido na vizinhança imediata da restauração de resina composta (**Hsu et al.**, 1998; **TORII et al.**, 2001), sugerindo a ocorrência de um selamento marginal eficiente. O comportamento do amálgama também pode ter ocorrido em função de um selamento, provavelmente provocado pelos produtos da corrosão deste material (**KIDD et al.**, 1989).

Os efeitos cariostáticos obtidos com os materiais avaliados neste estudo requerem algumas considerações importantes. De acordo com **HARA et al.** (2002), cuidados devem ser tomados ao extrapolar os resultados do presente estudo para outros materiais restauradores, mesmo que sejam da mesma classe, porque a composição de cada material é específica e pode influenciar o efeito cariostático.

Além disso, o potencial cariostático desses materiais foi analisado em intervalos de uma a duas semanas após os procedimentos restauradores. Esse período corresponde àquele de maior nível de liberação de flúor dos CIV e CIVMR (CARVALHO & CURY, 1999; PENG *et al.* 2000; ATTAR & TURGUT, 2003).

Com relação ao modelo biológico, o comportamento do cimento restaurador provisório sugere que este material, apesar de apresentar óxido de zinco em sua composição, não demonstrou efeito cariostático significativo. Esse fato contradiz os achados de OPPERMAN *et al.* (1980), que afirmaram que o zinco poderia funcionar como um agente antimicrobiano. Contudo, na indução química, esse material apresentou menor desmineralização em relação à resina composta e ao amálgama, nas profundidades de 60 e 90 μ m (TAB.8). É provável que componentes deste cimento possam estar interferindo na físico-química do desenvolvimento das lesões *in vitro*. MAYER *et al.* (1994) e DAVEY *et al.* (1997), estudaram a incorporação de zinco na hidroxiapatita e concluíram que o íon zinco (Zn^{+2}) pode substituir o cálcio (Ca^{+2}) e se incorporar à estrutura da apatita, diferentemente dos íons magnésio (Mn^{+2}) e ferro (Fe^{+3}), que apenas adsorvem à apatita durante a precipitação. SHINKAI *et al.* (2001) não encontraram diferenças quanto a ação cariostática de um cimento adesivo ionomérico e outro de fosfato de zinco em esmalte ou dentina adjacentes a restaurações metálicas. Outros estudos se fazem necessários para desvendar o papel do zinco na formação de lesões de cárie em modelos *in vitro*.

A análise em microscopia de luz polarizada permitiu a visualização de lesões externas sub-superficiais em forma de faixa contínua, em um padrão semelhante àqueles encontrados por **GILMOUR *et al.* (1990)**, **GILMOUR & EDMUNDS (1998)** e **TORII *et al.* (2001)**. A medida da profundidade dessas lesões confirmou a superioridade do efeito cariostático dos cimentos ionoméricos modificado por resina e convencional, detectada a partir dos ensaios de microdureza, para os dois modelos aplicados. No modelo biológico, o ionômero modificado por resina obteve maior efeito cariostático na posição mais próxima à restauração, ao contrário do cimento restaurador provisório (TAB.6). Para o modelo químico, a resina composta obteve os maiores valores de profundidade de lesão, alcançando até 190 μ m da superfície do esmalte (TAB.9). **HICKS *et al.* (2000)** encontraram valores de profundidade de lesão de cárie superiores a 200 μ m para a mesma resina composta, utilizando, porém, um modelo químico estático por oito semanas.

Para as dosagens bioquímicas, a mensuração dos níveis de flúor no biofilme dental foi considerada mais adequada do que no meio de cultura, por refletir as alterações minerais do fluido imediatamente em contato com o dente (**DUCKWORTH & GILBERT, 1992**). Apesar de se observar uma tendência numérica que favorece os materiais restauradores contendo flúor, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações desse íon nos biofilmes formados sobre os diferentes materiais restauradores. Esse fato poderia ser explicado pelo baixo pH do meio de cultura no momento da coleta do biofilme (pH 4,0), uma vez que a acidez do fluido extracelular do biofilme dental está

associada com baixos níveis de flúor (**GUHA-CHOWDHURY et al.**, 1997; **BALZAR EKENBÄCK et al.**, 2001). Além disso, o flúor pode ter difundido do biofilme em direção ao meio de cultura (**TORII et al.**, 2001). Em estudos posteriores, convém dosar a concentração de flúor no meio de cultura, ou utilizar metodologias mais sensíveis para a dosagem do flúor no biofilme dental. Técnicas de microdifusão (**WHITFORD & REYNOLDS**, 1979) ou de adição padronizada de fluoretos (**TEN BOSCH & BOUJ**, 1992) poderão ser úteis.

A dosagem dos polissacarídeos extracelulares insolúveis em água é uma das maneiras de verificar a influência dos materiais restauradores na composição do biofilme dental (**HAYACIBARA et al.**, 2003). Altas concentrações desses polímeros podem torná-lo mais cariogênico, facilitando a difusão dos carboidratos fermentáveis (**MARSH**, 1995; **CURY et al.**, 2000) e diminuindo a densidade de bactérias que se ligam ao cálcio (**ROSE et al.**, 1993). Isso pode gerar quedas mais pronunciadas do pH na interface esmalte/biofilme (**DIBDIN & SHELLIS**, 1988). A sua síntese está associada à presença de sacarose (**CURY et al.**, 2000), e media a adesão específica das bactérias ao dente e ao biofilme inicialmente formado (**SHILLING & BOWEN**, 1992; **MATTOS-GRANER et al.**, 2000). Contudo, diferenças estatisticamente significativas não foram encontradas entre as concentrações desse polímero no biofilme dental formado sobre os materiais restauradores testados. Esse resultado difere do estudo realizado por **KAWAI & TAKAOKA** (2001), que encontraram menores quantidades de glucanos aderidos à superfície de ionômeros modificados por resina e resinas modificadas por

poliácidos, quando comparados a uma resina composta, após 24h de incubação com *S.sobrinus* (B13). Entretanto, parece existir, na literatura, um consenso de que a síntese de polissacarídeos extracelulares é insensível ao flúor (HAMILTON, 1990; WAHAB *et al.*, 1993; KAWAI & TAKAOKA, 2001). Estudos com biofilmes mostraram que o fluoreto de sódio não é capaz de inibir a formação dos polímeros extracelulares sacarose-dependentes, mesmo em concentrações altas, indicando que as enzimas envolvidas na síntese desses açúcares são resistentes à ação do flúor (HAMILTON, 1990).

Baseando-se nos resultados dos estudos *in situ* (CURY *et al.*, 1997, 2000), admite-se que as baixas concentrações de flúor, cálcio e fósforo inorgânico no biofilme dental estejam diretamente associadas a uma maior cariogenicidade deste, na presença de sacarose. Segundo CURY *et al.* (1997), essa redução dos níveis minerais no fluido da placa poderia estar relacionada às constantes quedas de pH durante a fermentação da sacarose, as quais dissociariam compostos minerais do biofilme dental, liberando íons para a saliva. Uma outra possibilidade, ainda segundo o autor, seria a precipitação desses minerais no esmalte dental durante a remineralização.

Os resultados do presente estudo, no entanto, foram contrários àqueles encontrados nos estudos intra-orais (CURY *et al.*, 1997, 2000). Os biofilmes dentais formados sobre o cimento provisório e a resina composta – que apresentaram maior desmineralização no modelo biológico – mostraram níveis significativamente maiores de fósforo inorgânico. Esse fato poderia ser explicado pela presença de

fósforo na composição do meio de cultura, tornando-o supersaturado em relação ao biofilme dental e evitando a difusão dos íons para fora do mesmo. Análises bioquímicas realizadas por **GILMOUR *et al.*** (1997) em um meio de cultura recém-preparado detectaram a presença de quantidades consideráveis de fosfato. Os autores acreditam que a alta concentração desse componente no meio de cultura pode garantir uma condição de supersaturação deste em relação a hidroxiapatita, em pH neutro. Dessa forma, o meio de cultura recém-preparado, com pH em torno de 7,0, estaria oferecendo uma oportunidade de remineralização diária, a cada renovação do meio contaminado. Levando em consideração que o pH, no modelo biológico aplicado neste estudo, chegou a 4,0 depois de 24h de incubação, pode-se sugerir que esses íons seriam provenientes da desmineralização do esmalte dental, em concordância com **KASHKET & YASKELL** (1990) e **RANKINE *et al.*** (1991).

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se observar que a liberação de fluoretos e o selamento marginal são condições importantes para a inibição das lesões de cárie secundária, uma vez que existem duas frentes de desafio cariogênico: na superfície do esmalte e na margem da restauração. O ideal seria agregar essas propriedades em um só material, o que parece acontecer com o cimento ionomérico modificado por resina composta. Este seria um material adequado para o controle localizado da doença em grupos de risco. A resina composta ou o amálgama, no entanto, são capazes de promover apenas o

selamento marginal, mas não inibem o desenvolvimento de lesões cárias nas proximidades da restauração.

Segundo **MARSH** (1995), não existe modelo experimental isolado que seja capaz de desvendar todos os aspectos da doença cárie. A importância dos modelos *in vitro* reside na redução da complexidade do problema em estudo para permitir a percepção das relações de causa e efeito (**TEN CATE & MUNDORFF-SHRESTHA**, 1995). No entanto, um modelo laboratorial sempre vai diferir da situação natural, e, desse modo, jamais vai substituir a necessidade de estudos clínicos em humanos (**MARSH**, 1995). Os métodos de indução de cárie utilizados no presente estudo simularam condições de alto desafio cariogênico, com impactos essencialmente diferentes da situação clínica. Seria interessante desenvolver modelos laboratoriais que induzissem a formação de lesões de cárie em períodos mais prolongados, aproximando-se da realidade do processo cariioso.

7. CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais e os resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- Os modelos de indução de cárie químico e biológico foram capazes de induzir lesões de cárie secundária.
- Os materiais ionoméricos Vitremer e Fuji II demonstraram efeito cariostático significativamente superior aos demais materiais, em um padrão semelhante nos modelos de indução de cárie empregados.
- Observou-se uma relação inversa entre a quantidade de fósforo inorgânico no biofilme dental e o potencial de inibição de cárie dos materiais restauradores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- [1] AL-HELAL, A.S. *et al.* Effect of smear layer on root demineralization adjacent to resin modified glass ionomers. J Dent Res, v.82, n.2, p.146-50, 2003.
- [2] AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel demineralization. Caries Res, v.32, p.441-6, 1998a.
- [3] AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Factors affecting the development of carious lesions in bovine teeth *in vitro*. Archs Oral Biol, v.43, p.619-28, 1998b.
- [4] ARENDS, J.; VAN DER ZEE, Y. Fluoride uptake in bovine enamel and dentin from a fluoride-releasing composite resin. Quint Int, v.21, p.541-44, 1990.
- [5] ARGENTA, R.M.O.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, J.A. Eficácia remineralizante de uma formulação de dentifrício contendo NaF e CaCO₃. Pesqui Odontol Bras, v.16, Supl (Anais da 19^a Reunião Anual da SBPqO), Pc073, 2002.
- [6] ATTAR, N.; TURGUT, M.D. Fluoride release and uptake capacities of fluoride-releasing restorative materials. Oper Dent, v.28, n.4, p.395-402, 2003.
- [7] BALZAR-EKENBÄCK, S. *et al.* Effect of fluoride on glucose incorporation and metabolism in biofilm cells of *Streptococcus mutans*. Eur J Oral Sci, v.109, p.182-6, 2001.
- [8] BENELLI, E.M. *et al.* *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cements. Caries Res, v.27, p.280-4, 1993.

* Baseada na NBR-6023 de agosto de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

- [9] BOECKH, C. *et al.* Antibacterial activity of restorative dental biomaterials *in vitro*. Caries Res, v.36, n.2, p.101-7 Mar./Apr. 2002.
- [10] BOWDEN, G.H. The role of microbiology in models of dental caries: Reaction paper. Adv Dent Res, v.9, n.3, p.255-269, 1995.
- [11] BOYLE, E.L.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. The production of subsurface artificial caries lesions on third molar teeth. Caries Res, v.32, n.2, p.154-8, 1998.
- [12] BRATTHALL, D.; PETERSON, H.G.; SUNDBERG, H. Reasons for the caries decline: what do experts believe? Eur J Oral Sci, v.104, p.426-32, 1996.
- [13] CARVALHO, A.S.; CURY, J.A. Fluoride release from some dental materials in different solutions. Oper Dent, v.24, p.14-9, 1999.
- [14] CARVALHO, J.C.; THYLSTRUP, A.; EKSTRAND, K.R. Results after 3 years of non-operative occlusal caries treatment of erupting permanent first molars. Comm Dent Oral Epidmiol, v.20, n.4, p.187-92, Aug. 1992.
- [15] CURY, J.A. *et al.* *In situ* study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. Braz Dent J, v12, n.2, p.101-4, 2001.
- [16] CURY, J.A.; REBELO, M.A.; DEL BEL CURY, A.A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. Caries Res, v.31, p.356-60, 1997.
- [17] CURY, J.A. *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res, v.34, n.6, p.491-7, Dec. 2000.
- [18] DAVEY, H.P.; EMBERY, G.; CUMMINS, D. Interaction of zinc with a synthetic calcium phosphate mineral. Caries Res, v.31, p.434-40, 1997.
- [19] DELBEM, A.C.B.; CURY, J.A. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of *in vitro* enamel caries. Am J Dent, v.15, n.3, p.169-72, 2002.
- [20] DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the

- cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. J Dent Res, v.67, n.6, p.890-5, June 1988.
- [21] DIONYSOPOULOS, P. *et al.* Artificial secondary caries around two new F-containing restoratives. Oper Dent, v.23, p.81-6, 1998.
- [22] DONG, P. *et al.* In vitro fluoride release from aesthetic restorative materials following recharging with APF gel. Aust Dent J, v.45, n.3, p.198-203, 2000.
- [23] DONLY, K.J.; SEGURA, A. Fluoride release and caries inhibition associated with a resin-modified glass-ionomer cement at varying fluoride-loading doses. Am J Dent, v.15, p.8-10, 2002.
- [24] DOWNER, M.C. Caries prevalence in the United Kingdom. Int Dent J, v.44 (Suppl.1), p.365-70, Aug. 1994.
- [25] DOWNER, M.C. The caries decline: a comment in light of the UK experience. Eur J Oral Sci, v.104, p.433-35, 1996.
- [26] DUCKWORTH, R.M.; GILBERT, R.J. Intra-oral models to assess cariogenicity: evaluation of oral fluoride and pH. J Dent Res, v.71 (Spec Iss), p.934-944, Apr. 1992.
- [27] DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, v.28, n.3, p.350-6, Mar. 1956.
- [28] DUMMER, P.M.H.; EDMUNDS, D.H.; GREEN, R.M. Demineralization of human enamel by *Streptococcus mutans* NCTC 10832 using a sequential batch culture technique. Caries Res, v.16, p.193-6, 1982.
- [29] EDMUNDS, D.H.; WHITTAKER, D.K.; GREEN, R.M. Suitability of human, bovine, equine and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. Caries Res, v.22, p.327-36, 1988.
- [30] EKSTRAND, K.R. *et al.* Relationship between external and histologic features of progressive stages of caries in the occlusal fossa. Caries Res, v.29, n.4, p.243-50, 1995.
- [31] FDI/WHO. Changing patterns of oral health and implications for oral health manpower: Part I. Int Dent J, v.35, p.235-51, 1985.

- [32] FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res, v.17, p.385-91, 1983.
- [33] FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. In: LEACH, S.A. Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth. Oxford: IRL Press, p.23-34, 1986.
- [34] FEATHERSTONE, J.D.; MELBERG, J.R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. Caries Res, v.15, n.1, p.109-14, 1981.
- [35] FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem, v.LXVI, n.2, p.375-400, 1925.
- [36] FORSS, H.; SEPPÄ, L. Prevention of enamel demineralization adjacent to glass ionomer filling materials. Scand J Dent Res, v.98, n.2, p.173-8, Apr. 1990.
- [37] FRANCCI, C. *et al.* Fluoride release from restorative materials and its effects on dentin demineralization. J Dent Res, v.78, n.10, p.1647-54, Oct. 1999.
- [38] GALLAGHER, I.H.C.; PEARCE, E.I.F.; CUTRESS, T.W. Artificial caries produced by different oral bacterial cultures incubated with bovine dental enamel. Archs Oral Biol, v.28, n.4, p.317-25, 1983.
- [39] GILMOUR, A.S.M. *et al.* An *in vitro* study into the effect of a bacterial artificial caries system on the enamel adjacent to composite and amalgam restoration. Caries Res, v.27, p.169-75, 1993.
- [40] GILMOUR, A.S.M.; EDMUNDS, D.H. The polarized light microscope appearance of caries-like lesions adjacent to restored cavities in the crowns and roots of extracted human teeth. J Oral Rehab, v.25, p.929-39, 1998.
- [41] GILMOUR, A.S.M.; EDMUNDS, D.H.; DUMMER, M.H. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using an *in vitro* microbial caries system. J Oral Rehab, v.17, p.573-8. 1990.

- [42] GILMOUR, A.S.M.; EDMUNDS, D.H.; NEWCOMBE, R.G. Prevalence and depth of artificial caries-like lesions adjacent to cavities prepared in roots and restored with a glass ionomer or a dentin-bonded composite material. J Dent Res, v.76, n.12, p.1854-61, Dec. 1997.
- [43] GLASS, R.L., editor. The first international conference on the declining prevalence of dental caries. J Dent Res, v.61 (Spec Iss), p.1301-83, 1982.
- [44] GROSSMAN, E.S.; MATEJKA, J.M. Histological features of artificial secondary caries adjacent to amalgam restorations. J Oral Rehab, v.26, p.737-44, 1999.
- [45] GUGGENHEIM, B. *et al.* Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. J Dent Res, v.80, n.1, p.363-70, Jan. 2001.
- [46] GUHA-CHOWDHURY, N.; IWAMI, Y.; YAMADA, T. Effect of low levels of fluoride on proton excretion and intracellular pH in glycolysing streptococcal cells under strictly anaerobic conditions. Caries Res, v.31, p.373-8, 1997.
- [47] HAMILTON, I.R. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. J Dent Res, v.69 (Spec Iss), p.660-7, Feb. 1990.
- [48] HARA, A.T. *et al.* Cariostatic effect of Fluoride-containing restorative systems associated with dentifrices on root dentin. J Dent, v.30, p.205-12, 2002.
- [49] HARA, A.T. *et al.* Extent of cariostatic effect on root dentin provided by fluoride-containing restorative materials. Oper Dent, v.27, p.480-87, 2002.
- [50] HATTAB, F.N.; MOK, N.Y.C.; AGNEW, E.C. Artificially formed caries-like lesions around restorative materials. JADA, v.118, p.193-7, Feb. 1989.
- [51] HAYACIBARA, M.F. *et al.* Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. J Dent Res, v.82, n.4, p.267-71, Apr. 2003.
- [52] HERKSTRÖTER, F.M.; WITJES, M.; ARENDS, J. Demineralization of human dentine compared with enamel in a pH-cycling apparatus with a constant composition during de- and remineralization periods. Caries Res, v.25, p.317-22, 1991.

- [53] HICKS, J. *et al.* Compomer materials and secondary caries formation. Am J Dent, v.13, p.231-34, 2000.
- [54] HICKS, J. *et al.* Fluoride-releasing resin bonding of amalgam restorations in primary teeth: *in vitro* secondary caries effect. Am J Dent, v.15, n.6, p.361-4, Dec. 2002.
- [55] HSU, C.Y. *et al.* Effects of Fluoride-containing restorative materials on recurrent root caries. J Dent Res, v.77, n.2, p.418-25, Feb. 1998.
- [56] ITOTA, T. *et al.* Effect of adhesives on the inhibition of secondary caries around compomer restorations. Oper Dent, v.26, p.445-50, 2001.
- [57] KASHKET, S.; YASKELL, T. Accumulation of enamel constituents in *Streptococcus mutans* plaque during intraoral demineralization. Caries Res, v.24, p.248-53, 1990.
- [58] KAWAI, K.; TAKAOKA, T. Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials. J Dent, v.29, p.119-22, 2001.
- [59] KIDD, E.A. Diagnosis of secondary caries. J Dent Educ, v.65, n.10, p.997-1000, Oct. 2001.
- [60] KIDD, E.A. Caries diagnosis within restored teeth. Oper Dent, v.14, n.3, p.149-58, 1989.
- [61] KIDD, E.A.; O'HARA, J.W. The caries status of occlusal amalgam restorations with marginal defects. J Dent Res, v.69, n.6, p.1275-7, Jun. 1990.
- [62] MARCENES, W.; FREYSLEBEN, G.R.; PERES, M.A.A. Contribution of changing diagnostic criteria toward reduction of caries between 1971 and 1997 in children attending the same school in Florianopolis, Brazil. Comm Dent Oral Epidemiol, v.29, p.449-55, 2001.
- [63] MARSH, P.D. The role of microbiology in models of dental caries. Adv Dent Res, v.9, n.3, p.244-54, 1995.
- [64] MARTHAELER, T.M.; O'MULANE, D.M.; VRBICK, V. The prevalence of dental caries in Europe 1990-1995. Caries Res, v.30, p.237-55, 1996.

- [65] MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res, v.79, n.6, p.1371-7, June 2000.
- [66] MAYER, I., APFELBAUM, F.; FEATHERSTONE, J.D.B. Zinc ions in synthetic carbonated hydroxyapatites. Archs Oral Biol, v.39, n.1, p.87-90, 1994.
- [67] MELBERG, J.R. Hard-tissues substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. J Dent Res, v.71 (Spec Iss), p.913-9, Apr. 1992.
- [68] MJÖR, I.A.; MOORHEAD, J.E.; DAHL, J.E.; Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. Int Dent J, v.50, p.361-6, 2000.
- [69] MJÖR, I.A.; TOFENETTI, F. Secondary caries: a literature review with case reports. Quint Int, v.31, n.3, p.165-79, Mar. 2000.
- [70] NADANOVSKY, P.; SHEIHAM, A. Relative contribution of dental services to changes in caries levels of 12-year-old children in 18 industrialized countries in the 1970s and early 1980s. Comm Dent Oral Epid, v.23, p.331-9, 1995.
- [71] NAGAMINE, M. *et al.* Effect of resin-modified glass ionomer cements on secondary caries. Am J Dent, v.10, n.4, p.173-8, Aug. 1997.
- [72] NAKAJIMA, M. *et al.* Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. J Dent Res, v.74, p.1679, 1995.
- [73] NOGUEIRA, E.C. *et al.* Avaliação cariostática de híbridos de ionômero de vidro/resina composta. Rev Paul Odont, ano XXIII, n.3, maio/junho 2001.
- [74] NARVAI, P.C.; FRAZÃO, P.; CASTELLANOS, R.A. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. Odontologia e Sociedade, v.1, n.1/2, p.25-9, 1999.
- [75] OPPERMAN, R. *et al.* Thiol groups and reduced acidogenicity of dental plaque in the presence of metal ions *in vivo*. Scand J Dent Res, v.88, p.389-96, 1980.

- [76] ÖZER, I.; THYLSTRUP, A. What is known about caries in relation to restorations as a reason for replacement? A review. Adv Dent Res, v.9, n.4, p.304-402, Dec. 1995.
- [77] PAES LEME, A.F. *et al.* Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. Am J Dent, v.16, p.91-5, 2003.
- [78] PARSELL, D.E. *et al.* The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. J Dent Educ, v.62, n.3, p.260-3, Mar. 1998.
- [79] PENG, D. *et al.* *In vitro* fluoride release from aesthetic restorative materials following recharging with APF gel. Aust Dent J, v.45, n.3, p.198-203, 2000.
- [80] PEREIRA, P.N.R.; INOKOSHI, S.; TAGAMI, J. *In vitro* secondary caries inhibition around fluoride releasing materials. J Dent, v.26, p.505-10, 1998a.
- [81] PEREIRA, P.N.R. *et al.* Microhardness of *in vitro* caries inhibition zone adjacent to conventional and resin-modified glass ionomer cements. Dent Mater, v.14, p.179-85, June 1998b.
- [82] PETERSON, H.G.; BRATTHALL, D. The caries decline: a review of reviews. Eur J Oral Sci, v.104, p.436-43, 1996.
- [83] PIGMAN, W.; ELLIOTT, H.C.; LAFFRE, R.O. An artificial mouth for caries research. J Dent Res, v.31, p.627-33, 1952.
- [84] PIMENTA, L.A.F. *et al.* Inhibition of demineralization *in vitro* around amalgam restorations. Quint Int, v.29, p.363-7, 1998.
- [85] PIMENTA, L.A.F.; NAVARRO, M.F.L.; CONSOLARO, A. Secondary caries around amalgam restorations. J Prosth Dent, v.74, p.219-22, 1995.
- [86] PRESTON, A.J. *et al.* The recharge of esthetic dental restorative materials with fluoride *in vitro* – two years' results. Dent Mater, v.19, p.32-7, 2003.
- [87] RANKINE, C. *et al.* Plaque fluid biochemical comparison between tooth and acrylic surfaces. J Dent Res, v.70 (Spec Iss), Abstract 2484, 1991.
- [88] RODRIGUES, L.K.A. *et al.* Validação de uma dose para esterilização dental usando radiação gama e análise de seu efeito na microdureza do esmalte.

- Pesqui Odontol Bras, v.17, Supl.2 (Anais da 20ª Reunião Anual da SBPqO), H010, 2003.
- [89] ROSE, R.K.; DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. J Dent Res, v.72, p.78-84, 1993.
- [90] SCHILLING, K.M.; BOWEN, W.H. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infect Immun, v.60, n.1, p.284-95, Jan. 1992.
- [91] SERRA, M.C. Estudo *in vitro* do desenvolvimento de cárie em esmalte adjacente a materiais restauradores contendo flúor. Bauru, 1995. 65f. Tese (Doutorado em Dentística) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- [92] SERRA, M.C.; CURY, J.A. The *in vitro* effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. Quint Int, v.23, n.2, p.143-7, 1992.
- [93] SERRA, M.C.; PIMENTA, L.A.F.; PAULILO, L.A.M.S. In: KRIGER, L. *et al.* Promoção de Saúde Bucal, cap.11, p.201-253, 1999.
- [94] SHINKAI, R.S.; CURY, A.A.D.B.; CURY, J.A. *In vitro* evaluation of secondary caries development in enamel and root dentin around luted metallic restoration. Oper Dent, v.26, p.52-9, 2001.
- [95] SPENCER, A.J. Skewed distribution: New outcome measures. Comm Dent Oral Epid, v.25, p.52-9, 1997.
- [96] TANTBIROJN, D.; DOUGLAS, W.H.; VERSLUIS, A. inhibitive effect of a resin-modified glass ionomer cement on remote enamel artificial caries. Caries Res, v.31, p.275-80, 1997.
- [97] TEN BOSCH, J.J; BOOIJ, M. A quantitative comparison of methods measuring fluoride in solutions or in enamel. J Dent Res, v.71 (Spec Iss), p.945-48, Apr. 1992.
- [98] TEN CATE, J.M. *In vitro* studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. J Dent Res, v.69, Spec Iss, p.614-9, 1990.

- [99] TEN CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; DAMEN, J.J.M. The effects of GIC restorations on enamel and dentin demineralization and remineralization. Adv Dent Res, v.9, n.4, p.384-8, 1995.
- [100] TEN CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. Caries Res, v.16, n.3, p.201-10, 1982.
- [101] TEN CATE, J.M.; MUNDORFF-SHRESTHA, S.A. Working group report 1: laboratory models for caries (*in vitro* and animal models). Adv Dent Res, v.9, n.3, p.332-4, Nov. 1995.
- [102] TORII, Y. *et al.* Inhibition of artificial secondary caries in root by fluoride-releasing restorative materials. Oper Dent, v.26, p.36-43, 2001.
- [103] VALENZUELA, V.S. *et al.* *In vitro* inhibition of marginal caries-like lesions with fluoride-containing amalgam. Oper Dent, v.19, p.91-96, 1994.
- [104] VAN LOVEREN, C. Antimicrobial activity of fluoride and its *in vivo* importance: identification of research questions. Caries Res, v.35, Suppl 1, p.65-70, 2001.
- [105] VEHKALAHTI, M. *et al.* Decrease in and polarization of dental caries occurrence among child and youth populations, 1976-1993. Caries Res, v.31, p.161-5, 1997.
- [106] WAHAB, F.K.; SHELLIS, R.P.; ELDERTON, R.J. Effects of low fluoride concentrations on formation of caries-like lesions in human enamel in a sequential-transfer bacterial system. Archs Oral Biol, v.3, n.11, p.985-95, 1993.
- [107] WHITE, J.M. The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth. Adv Dent Res, v.9, n.3, p.175-93, 1995.
- [108] WHITE, J.M.; EAKLE, W.S. Rationale and treatment approach in minimally invasive dentistry. JADA, v.131, p.13S-19S, 2000.

- [109] WHITFORD, G.M.; REYNOLDS, K.E. Plasma and developing enamel fluoride concentrations during chronic acid-base disturbances. J Dent Res, v.58, n.11, p.2058-65, Nov. 1979.
- [110] ZANIN, I.C.J. *et al.* Potencial cariogênico de biofilmes de estreptococos formados sobre blocos de esmalte dental. Pesqui Odontol Bras, v.17, Supl.2 (Anais da 20ª Reunião Anual da SBPqO), Pc100, 2003.

ANEXO I – Descrição dos materiais utilizados.

MATERIAL	FABRICANTE	CARACTERÍSTICAS	LOTE
SCOTCHBOND CONDITIONER	3M Dental Products, St Paul, MN, USA	Gel de ácido fosfórico 37%	2YF
PERMITE C	S.D.I. Australia	Liga de amálgama de prata	803257
SINGLE BOND	3M Dental Products, St Paul, MN, USA	Sistema adesivo monocomponente	2GY
FILTEK™ Z250 (A2)	3M Dental Products, St Paul, MN, USA	Resina composta microhíbrida	2TA
GC FUJI II (21 pale Yellow)	GC Corp., Tokyo, Japan	Cimento de Ionômero de Vidro Restaurador	P: 0205291 L: 0205141
VITREMER (A3,5)	3M Dental Products, St Paul, MN, USA	Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina Composta	Pr: 1AP P: 1AB L: 1AM FG: 1AN
PRIME & BOND® NT	Dentsply DeTrey, Konstanz	Sistema adesivo monocomponente	0108001495
DYRACT AP (A2)	Dentsply DeTrey, Konstanz	Resina composta modificada por poliácidos	0109000849
COLTOSOL®	Colténe, Vigodent, RJ, Brasil	Material provisório à base de óxido de zinco	LG88

ANEXO II – Descrição dos procedimentos restauradores considerando cada material, segundo a recomendação dos fabricantes.

PERMITE C	Ativar a cápsula pré-dosada e iniciar a amalgamação mecânica por 8s*. Inserir o material na cavidade. Condensar manualmente. Brunir antes da escultura. Esculpir. Brunir após a escultura. Realizar o acabamento e polimento depois de 24 horas.
FILTEK™ Z-250	Aplicar o condicionador ácido <i>3M Scotch Bond</i> em esmalte e dentina por 15s. Lavar por 15s e retirar o excesso de água com papel absorvente**. Aplicar duas camadas consecutivas de <i>3M Single Bond™</i> com pincel saturado de adesivo para cada camada. Secar levemente por 2-5 segundos. Fotopolimerizar por 10s. Inserir a resina na cavidade e fotopolimerizar por 40s, sob tira matriz de poliéster***.
GC FUJI II	Manipular Pó/Liq (1:1). Inserir na cavidade com seringa <i>Centrix</i> . Aguardar a polimerização química sob tira matriz de poliéster. Aplicar o <i>Finishing Gloss</i> e fotopolimerizar por 20s.
VITREMER	Aplicar o condicionador ácido <i>3M Scotch Bond</i> em esmalte e dentina por 15s. Lavar por 15s e retirar o excesso de água com papel absorvente. Aplicar o <i>primer</i> e esperar 30s. Secar levemente por 2-5s. Fotopolimerizar por 20s. Manipular Pó/Liq (1:1). Inserir o material na cavidade com seringa <i>Centrix</i> . Fotopolimerizar por 40s sob tira matriz. Aplicar o <i>Finishing Gloss</i> e fotopolimerizar por 20s.
DYRACT AP	Aplicar o <i>Prime& Bond NT</i> em esmalte e dentina por 20s e secar levemente por 5s. Observar uma aparência brilhante. Fotopolimerizar por 10s. Inserir o material na cavidade com seringa <i>Centrix</i> e fotopolimerizar por 30s sob tira matriz de poliéster.
COLTOSOL	Inserir o material na cavidade e condensar. Aguardar a presa sob tira matriz de poliéster.

Nota: Os materiais foram inseridos sob a técnica de incremento único.

* Amalgamador Ultramat 2 – S.D.I.

** Filtro de papel Melita – Celupa Industrial Celulose e papel Guaíba Ltda.

*** K-Dent Quimidrol, Joinville, SC

Grupo	peso placa mg
Dyract AP	3,1
	1,8
	11,3
	13,3
	3,7
	3,6
	12,2
	11,9
	3,0
	17,1
MÉDIA	8,1
DP	5,6

Grupo	peso placa mg
Permite C	14,4
	3,9
	8,9
	7,9
	6,2
	11,2
	11,1
	9,0
	9,4
	5,4
Média	8,7
DP	3,1

Fuji II	10,7
	12,3
	9,1
	10,9
	8,0
	11,2
	7,2
	3,7
	5,6
	8,4
Média	8,7
DP	2,7

Vitremer	12,4
	7,2
	8,6
	10,9
	10,6
	11,2
	14,7
	15,3
	6,9
	13,4
Média	11,1
DP	2,9

Filtek Z250	4,7
	6,1
	8,2
	4,3
	9,0
	3,0
	8,5
	4,7
	4,4
	11,1
Média	6,4
DP	2,6

Coltosol	6,8
	8,1
	2,7
	5,9
	6,6
	8,1
	8,2
	7,5
	3,3
	6,0
Média	6,3
DP	1,9

QUADRO DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA

1. PORCENTAGEM DE VOLUME MINERAL

Indução Biológica

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
GRUPO	6	98.6	16.4	24.8	0.00001
RESIDUO (A)	63	41.6	0.6		
PARCELAS	69	140.3			
DIST	3	4.5	1.5	11.3	0.00001
GRU*DIS	18	6.7	0.3	2.8	0.00040
RESIDUO (B)	189	25.1	0.1		
SUBPARCELAS	279	176.7			
PROF	2	118.6	59.3	580.3	0.00001
GRU*PRO	12	27.9	2.3	22.8	0.00001
DIS*PRO	6	0.9	0.1	1.6	0.13922
GRU*DIS*PRO	36	4.2	0.1	1.1	0.24500
RESIDUO (C)	504	51.5	0.1		
TOTAL	839	380.2288505			

MEDIA GERAL = 5.288809

COEFICIENTE DE VARIACAO (A) = 4.440 %

COEFICIENTE DE VARIACAO (B) = 3.979 %

COEFICIENTE DE VARIACAO (C) = 6.047 %

Indução Química

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
GRUPO	6	646.8	107.8	33.4	0.00001
RESIDUO (A)	63	203.2	3.2		
PARCELAS	69	850.0			
DIST	3	39.7	13.2	31.8	0.00001
GRU*DIS	18	24.5	1.3	3.2	0.00008
RESIDUO (B)	189	78.7	0.4		
SUBPARCELAS	279	993.2			
PROF	2	53.7	26.8	96.1	0.00001
GRU*PRO	12	44.6	3.7	13.3	0.00001
DIS*PRO	6	3.3	0.5	1.9	0.06408
GRU*DIS*PRO	36	6.8	0.1	0.6	0.92039
RESIDUO (C)	504	140.9	0.2		
TOTAL	839	1242.8936338			

MEDIA GERAL = 4.323106
 COEFICIENTE DE VARIACAO (A) = 11.994 %
 COEFICIENTE DE VARIACAO (B) = 8.623 %
 COEFICIENTE DE VARIACAO (C) = 12.234 %

2. PROFUNDIDADE DAS LESÕES DE CÁRIE

Indução Biológica

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
MATERIAL	5	71993.9	14398.7	3.1	0.01340
RESIDUO (A)	54	243385.4	4507.1		
PARCELAS	59	315379.4			
DIST	3	1371.4	457.1	2.4	0.06066
MAT*DIS	15	5538.3	369.2	2.0	0.01698
RESIDUO (B)	162	29684.1	183.2		
TOTAL	239	351973.3			

MEDIA GERAL = 91.425003
 COEFICIENTE DE VARIACAO (A) = 36.716 %
 COEFICIENTE DE VARIACAO (B) = 14.806 %

Indução Química

	DF	SQUARES	MEAN SQUARE	F VALUE	PR > F
MODEL	77	398262.1	5172.2	14.15	<.0001
ERROR	162	59231.3	365.6		
CORRECTED TOTAL	239	457493.4			

R-SQUARE COEFF VAR ROOT MSE PROFGQ MEAN
 0.870531 12.91361 19.12134 148.0713

3. ANÁLISE DO BIOFILME DENTAL

Flúor

	DF	SQUARES	MEAN SQUARE	F VALUE	PR > F
MODEL	5	0.482	0.096	1.63	0.1671
ERROR	54	3.189	0.059		
CORRECTED TOTAL	59	3.671			

R-SQUARE	COEFF VAR	ROOT MSE	FLUOR MEAN
0.131334	26.79178	0.243041	0.907149

Polissacarídeo Insolúvel em Água

	DF	SQUARES	MEAN SQUARE	F VALUE	PR > F
MODEL	5	0.384	0.076	1.33	0.2669
ERROR	52	3.013	0.057		
CORRECTED TOTAL	57	3.398			

R-SQUARE	COEFF VAR	ROOT MSE	PILOG MEAN
0.113242	12.86095	0.240744	1.871902

Fósforo Inorgânico

	DF	SQUARES	MEAN SQUARE	F VALUE	PR > F
MODEL	5	7.3	1.4	6.71	<.0001
ERROR	47	10.2	0.2		
CORRECTED TOTAL	52	17.5			

R-SQUARE	COEFF VAR	ROOT MSE	FOSFORO MEAN
0.416667	13.91194	0.466512	3.353323