

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**MILENA MARIA PIERRE SANTOS CALDEIRA**

**Efeito anticariogênico de cimento de ionômero de  
vidro convencional pela dependência de  
dentifrício: estudo *in situ***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
APRESENTADA A FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA  
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRE EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA,  
NA ÁREA DE DENTÍSTICA.

**PROF. DR. LUÍS ROBERTO MARCONDES MARTINS**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. LUÍS ROBERTO MARCONDES MARTINS

---

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Sa59e Santos-Caldeira, Milena Maria Pierre, 1980-  
Efeito anticariogênico de cimento de ionômero de vidro  
convencional pela dependência de dentifrício: estudo "in situ". /  
Milena Maria Pierre Santos Caldeira. -- Piracicaba, SP : [s.n.],  
2011.

Orientador: Luís Roberto Marcondes Martins.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cárie dentária. 2. Desmineralização. 3. Flúor. I. Martins, Luís  
Roberto Marcondes. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** In situ anticariogenic effect of conventional glass ionomer  
cement by dentifrice dependence

**Palavras-chave em Inglês:**

Dental Caries

Deminerlization

Fluorine

**Área de concentração:** Dentística

**Titulação:** Mestre em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Luís Roberto Marcondes Martins [Orientador]

Fabiana Mantovani Gomes França

Giselle Maria Marchi Baron

**Data da defesa:** 15-04-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 15 de Abril de 2011, considerou a candidata MILENA MARIA PIERRE SANTOS CALDEIRA aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luis Roberto Marcondes Martins".

---

Prof. Dr. LUIS ROBERTO MARCONDES MARTINS

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fabiana Mantovani Gomes França".

---

Profa. Dra. FABIANA MANTOVANI GOMES FRANÇA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Giselle Maria Marchi Baron".

---

Profa. Dra. GISELLE MARIA MARCHI BARON

## *Dedicatória*

Dedico este trabalho primeiramente à **Deus** que me deu forças e condições de realizá-lo!

Dedico aos **professores** Prof. Dr. **Luís Roberto** Marcondes Martins e Profa. Dra. **Regina** Maria Puppim Rontani que, muito além de me orientarem durante o mestrado, foram exemplo de caráter e de valores, quais prezo e admiro! Obrigada pelo estímulo e paciência!

E, especialmente, dedico aos **meus pais, Carlos e Tania**, que sempre foram meu alicerce, que se privaram de tantas coisas para que eu realizasse o sonho de ser cirurgiã dentista, e que hoje me veem recebendo o título de mestre!

## *Agradecimentos Especiais*

Agradeço primeiramente a Deus, pois “com Ele faremos proezas!” E agradeço à Minha Mãe Especial Maria, Nossa Senhora, porque acredito que sempre intercedeu por mim e por esta vitória!

Principalmente, ao meu marido Frederico, obrigada!!! Obrigada por aceitar encarar este desafio comigo, mesmo nem sabendo o que estaria por vir. Obrigada por tentar não questionar minha escolha quando as coisas pareciam mais confusas do que o habitual. Obrigada por me dar forças quando as minhas acabavam. Obrigada pelo seu carinho em meus momentos de fraqueza e cansaço. Obrigada pela paciência quando eu mesma não tinha. Saiba que este título não valeria nada se eu perdesse o que temos!

Agradeço especialmente aos meus pais, Carlos e Tania, que são base de minha vida, exemplo de fé, esforço e especialmente amor incondicional, porque sei que ninguém faria por mim o que eles fizeram, me ajudando a passar cada dia desta etapa. Obrigada por me darem uma família, por me ensinarem a importância do valor da família e por me apresentarem Deus! Pois se hoje eu tenho fé, herdei de vocês!

Carlos, meu Pai, acreditamos que “tudo concorre para o bem daqueles que amam a Deus” e Ele sabe o que faz! Por isso creio que Ele tudo permitiu para que o senhor pudesse me acompanhar tantos dias em que precisei ir à Piracicaba e que, por causa do cansaço e da correria de horários, tínhamos receio de eu ir sozinha. Creio que Ele permitiu que o senhor estando comigo em Piracicaba conhecesse pessoas maravilhosas que se esforçavam também pelo mesmo objetivo que eu, assim o senhor pode compreender melhor minha função lá.

Tania, minha Mãe, minha melhor amiga e grande exemplo! Obrigada por cada desabafo, oração, companhia. Obrigada por não me deixar desistir. Obrigada por acreditar em mim e sempre estar ao meu lado para dar carinho, amor e atenção, mesmo, às vezes, faltando força para isso.

Pais, obrigada por hoje entenderem o significado desta pós-graduação para mim, mesmo tendo se preocupado tanto com minha vida, família e prioridades. Obrigada por caminharem comigo! Amo vocês!

Agradeço ao meu irmão Paulo, que mesmo nem entendendo o que eu estava fazendo, nunca questionou minha escolha e a presença de nossos pais ao meu lado. Obrigada por aceitar minhas ausências e mesmo assim tentar ser atencioso.

Ao meu professor orientador Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins, querido Prof. Beto, agradeço por ter me escolhido como orientada! Agradeço por ter me permitido estudar esta linha de pesquisa. Agradeço pela aceitação da conciliação de meus compromissos, seja profissionalmente, quanto pessoalmente. Mas, agradeço, principalmente, por toda compreensão, amizade, consideração e paciência que teve comigo, pois se não fosse isso, realmente não sei se conseguiria estar aqui hoje!!! E, obrigada, especialmente, por ser um professor que preza tanto, como prioridade, a família, e saiba que este foi seu maior exemplo para mim! Que Deus continue abençoando o senhor, sua esposa e cada um de seus filhos!

À Profa. Dra. Regina, agradeço muito sua disponibilidade em aceitar ser minha co-orientadora mesmo nem participando do mesmo programa de pós-graduação. Obrigada por ter aberto as portas do laboratório de Odontopediatria, o que facilitou em muito meu trabalho. Obrigada por cada conversa, cada ensinamento, cada orientação. Orientação que não era apenas profissional, mas, literalmente, a orientação do caminho a seguir quando eu me sentia perdida. Por tudo, obrigada pela amizade!

## *Agradecimentos*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior e do diretor associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

À Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora dos cursos de Pós-Graduação e ao Prof. Dr. Márcio de Moraes, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

A todos Professores de Clínica Odontológica especialmente da Área de Dentística: Prof. Dr. Luís Roberto M. Martins, Prof. Dr. Flávio H. Baggio Aguiar, Profa. Dra. Giselle Maria Marchi, Prof. Dr. Luis Alexandre M. S. Paullilo, Prof. Dr. José Roberto Lovadino, Prof. Dr. Marcelo Giannini e Profa. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima, pelos exemplos e conhecimentos transmitidos que contribuíram para meu crescimento profissional;

De modo especial, ao Prof. Dr. Flávio H. Baggio Aguiar, quem me convidou, em 2008, para inscrever-me na seleção do Mestrado; e à Profa. Dra. Giselle Maria Marchi, pela delicadeza de toda ajuda e por ter me emprestado materiais para minha pesquisa. Agradeço a ambos, por além de terem aceito participar de minha banca avaliadora, foram professores companheiros e participativos, durante estes 2 anos de mestrado, dividindo a sala com meu orientador e, conseqüentemente, me ajudando e orientando sempre solícitos!

Aos Professores Prof. Dr. Sérgio Luiz Pinheiro, Prof. Dr. Flávio H. Baggio Aguiar e Profa. Dra. Débora Alves Nunes Leite Lima, membros da banca examinadora de qualificação, pelas importantes sugestões e correções que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos voluntários para minha pesquisa por terem aceitado participar porque sem esta ajuda, este dia não existiria.

Aos companheiros da Dentística de Mestrado, Boniek, Carlos Eduardo (Kdú), Diogo, Giovana, Lucinha, Maria Beatriz, Natália, Paulo Vermelho e Robson; e de Doutorado, Adriano, Anderson, Cíntia, Giulliana, Maria, Marina e Thiane pela convivência e partilha na “nossa” dentística;

De modo especial, agradeço à Larissa e Lívia, que com sua amizade e companhia fizeram esta caminhada mais feliz!

E, principalmente, aos meus “irmãos de orientador”, Bruno, Gisele, Mayra, Priscila, e agora também Thiago. Obrigada por cada dia, cada momento (de riso ou não), toda força, toda ajuda, e perdão por não conseguir descrever em palavras tudo que vocês foram, e são, importantes para mim!

À Ana Flávia, amiga e companheira de estágio ouvinte na USP desde 2002. Obrigada por compartilhar os mesmos valores, expectativas e anseios. Obrigada por cada ensinamento, fundamentais para finalização de meu trabalho. Obrigada por tantos desabafos e apoio. Saiba que você foi fundamental nestes dois anos!

Ao Carlos Oliveira Júnior, parceiro de linha de pesquisa, laboratório, estudo de artigos e até análise estatística! Obrigada pela amizade e apoio, sua companhia e ajuda foi muito importante!

À Giovana Araújo. Obrigada pela companhia nas viagens (faculdades – Campinas), ensinamentos de laboratório, injeções de ânimo no cansaço, e alegria! Foi contagiante!

A todos colegas de pós-graduação, de outras áreas da FOP, que me ajudaram tanto com suas sugestões e solicitude, especialmente os amigos de materiais dentários e odontopediatria.



Aos funcionários da Área de Dentística, Mônica e Sr. Pedro, pelo carinho, ajudas e atenção para comigo e minha família, que às vezes “visitava” a Dentística.

À todos profissionais técnicos que foram essenciais para realização da parte laboratorial. Especialmente ao Marcelo C. Maistro, da Odontopediatria, que me aturou meses em seu ambiente de trabalho. Obrigada por toda orientação técnica e ensinamentos no laboratório! Ao Marcos Cangiani (Marcão), de Materiais Dentários, que sem suas dicas minha vida laboratorial seria muito mais difícil! E à Eliene O. N. Romani que mesmo em suas férias me ajudou nas microscopias!

À Profa. Dra. Roberta Basting e a Tatiana Ricci, responsáveis pelo laboratório de Ensaio de Materiais, da Faculdade de Odontologia São Leopoldo Mandic, pela autorização do uso do laboratório, onde consegui realizar parte de minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcelo Silva Oliveira, Área de Estatística e Experimentação Agropecuária da ESALQ, Universidade de São Paulo, pelo tempo dispensado, paciência e orientações estatísticas realizadas.

Aos meus antigos professores que foram exemplo e meus primeiros incentivadores à pesquisa e docência, Profa. Dra. Elda Pisaneschi, Prof. Dr. Carlos S. Bueno, e, principalmente, meus eternos orientadores de pediatria Prof. Dr. José Carlos P. Imparato, Profa. Dra. Daniela P. Raggio e Prof. Dr. Sérgio L. Pinheiro que ainda é um orientador incentivador.

Às minhas grandes amigas que já passaram pela experiência da pós-graduação e que sempre me apoiaram, incentivaram e ajudaram a entrar e percorrer este caminho, Fabiana M. G. França (Bia) e Roberta A. Araújo Arruda (Beta). Obrigada por tudo, tanto na vida pessoal quanto profissional. Não sei como

colocar em palavras tudo que tenho a agradecer. Vocês são amigas para vida inteira!

À minha família, especialmente meus tios Neusa e Bento que me acolheram em sua casa em Piracicaba, e minha tia Dé que sempre me mandava “seus carinhosos confeitos” para adocicar a caminhada e animar no cansaço!

Aos meus colegas do Exército, que me ajudaram a conciliar todas importantes responsabilidades de meu trabalho com meus estudos. Muito obrigada pelo apoio de vocês!

E a toda minha família e amigos que mesmo fora da Odontologia entenderam minha ausência, torcem por mim e vibram por mais essa conquista!

*“Tudo posso naquele que me fortalece”*

*(Fl 4: 13)*

## RESUMO

A presente pesquisa objetivou avaliar *in situ* o potencial anticariogênico de cimento de ionômero de vidro convencional na prevenção da desmineralização de esmalte e dentina, sozinho ou sob ação de dentifrício fluoretado. Foi realizado um estudo cego, cruzado, de indução de cárie, em blocos dentais obtidos a partir de terceiros molares humanos hígidos, pelo acúmulo de biofilme e exposição à sacarose, conduzido em 2 fases clínicas de 14 dias cada. O estudo foi fatorial 2 x 2 cruzado sendo: (1) Tratamento em 2 níveis, bloco dental com restauração de cimento de ionômero de vidro convencional (GI) e bloco dental hígido (ST); (2) Dentifrício em 2 níveis, fluoretado (FD) e não fluoretado (NF). Foi avaliado o efeito dos fatores nas variáveis de resposta: área de perda de dureza ( $\Delta S$ ) (quantitativamente) e microscopia de luz polarizada (qualitativamente), considerando esmalte e dentina individualmente. Os grupos experimentais foram obtidos pela associação dos fatores em estudo e atribuídos aos voluntários. Os voluntários utilizaram dispositivo intraoral com 2 blocos dentais referentes a cada tratamento, alternando, aleatoriamente, o tipo de dentifrício em cada fase. Os voluntários (n=7) foram considerados unidades experimentais para todas variáveis em estudo. Sobre as amostras no dispositivo intraoral foi acumulado biofilme dental e induzido alto desafio cariogênico pela exposição à solução de sacarose 20% sobre o biofilme 8x/dia, com os dispositivos fora da cavidade bucal. Após cada fase experimental foi avaliada, por microdureza longitudinal, a área de perda de dureza por  $\Delta S$ , em esmalte e dentina, e as amostras foram analisadas sob microscopia de luz polarizada quanto à desmineralização. Após análise estatística (ANOVA com arranjo fatorial dos níveis dos fatores, e Teste de Tukey), não foi encontrada interação dos fatores avaliados ( $p > 0,05$ ). Foi observada menor desmineralização em esmalte e dentina após o uso de FD do que NF ( $p < 0,05$ ). Quanto à comparação entre GI e ST, maior desmineralização para ST foi encontrada em esmalte ( $p < 0,01$ ), contudo não foram encontradas diferenças entre GI e ST para o

substrato dentinário ( $p>0,05$ ). A microscopia por polarização revelou maior porcentagem de sinais de desmineralização para ST+NF (64,28%) e GI+NF (50%), e menor porcentagem de desmineralização aparente para GI+FD (28,57%) seguido por ST+FD (42,85%). Concluiu-se que a presença de dentifrício fluoretado proporcionou menores áreas de desmineralização, proveu efeito anticárie sob todas condições estudadas, e, que a associação do cimento de ionômero de vidro convencional ao dentifrício fluoretado levou à menor porcentagem de desmineralização aparente nas imagens de microscopia de luz polarizada. Independente de dentifrício, restaurações de ionômero de vidro apresentaram efeito anticárie em esmalte.

**Palavras-Chaves:** Ionômero de vidro, Fluoreto, Dentifrício, Desmineralização, Prevenção de cárie.

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess *in situ* anticaries potential of conventional glass ionomer cement (GIC) to prevent enamel and dentine demineralization either alone or in combination with a fluoride (F) regimen. A randomized, blind, crossover design for caries induction was carried out in 2 phases of 14 days each. This study was a 2 x 2 cross-over factorial design as follows: (1) Material Treatment at 2 levels, dental slabs restored with glass ionomer cement (GI) and sound tooth slabs (ST); and (2) Dentifrice at 2 levels, F dentifrice (FD) and non-F dentifrice (NF). The effect of the factors on the response variables was evaluated: hardness loss area ( $\Delta S$ ) (quantitative assessment) and light polarized microscopy (qualitative), concerning enamel and dentine, individually. The experimental groups obtained from the association of those factors were assigned to the volunteers. In each experimental phase, volunteers used a palatal device loaded with two dental slabs from each treatment group, using FD or NF depending on the experimental phase. Volunteers (n=07) were considered experimental units for all variables being studied. Biofilm was allowed to accumulate on the slabs, and a high cariogenic challenge was provided by exposing the biofilm/slab sets to a 20 % sucrose solution 8 times/day extra-orally. After each experimental phase was evaluated the integrated area of hardness loss as a function of lesion depth ( $\Delta S$ ) in enamel and dentine by cross-sectional microhardness, and demineralization was observed by light polarized microscopy. After statistical analysis (ANOVA and Tukey test), for both dental substrates no significant interaction between the factors was found ( $p>0.05$ ). Also, for enamel and dentin FD provided lower demineralization than NF ( $p<0.05$ ). For material treatment, higher enamel demineralization was found for ST compared to GI ( $p<0.01$ ), but no differences were found between GI and ST in dentin substrate ( $p>0.05$ ). By PLM was observed that the largest percentage of apparent demineralization occurred in NF+ST group (64.28%) and GI+NF (50%), and lowest apparent demineralization percentage occurred in GI+FD (28.57%)

followed by ST+FD (42.85%). In concluded, fluoride dentifrice showed lower demineralization areas, and anticaries effect of FD was proven under all conditions studied. And, the association of conventional glass ionomer cement with fluoride dentifrice led to a lower percentage of apparent demineralization lesions in images of polarized light microscopy. Independent of dentifrice, glass-ionomer restorations showed anticaries effect on enamel.

**Key-words:** Glass ionomer, Fluoride, Dentifrice, Demineralization, Caries prevention.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. CAPÍTULO ÚNICO - “In situ anticariogenic effect of conventional glass ionomer cement by dentifrice dependence”</b>	<b>6</b>
<b>3. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	<b>27</b>
<b>4. CONCLUSÃO</b>	<b>35</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b>	<b>36</b>
<b>6. APÊNDICES</b>	<b>40</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>45</b>



## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

Apesar de todos os avanços da Odontologia preventiva e restauradora, a doença cárie ainda é considerada um problema de saúde pública no Brasil (Ministério da saúde, BRASIL, 2004), mesmo que estudos confirmem o declínio da prevalência da mesma (Ferreira, 2010).

A cárie dentária é uma doença localizada, causada pelo acúmulo de biofilme não perturbado mecanicamente e pela exposição a carboidratos fermentáveis (Cenci, 2008). O desenvolvimento desta é um processo dinâmico dos tecidos dentários duros que, eventualmente, resulta em cavitação (Fejerskov, 1997; Peris *et al.*, 2007; Fontana *et al.*, 2010). A abordagem terapêutica desta doença exige conhecimento de seus fatores biossociais determinantes, dos materiais e técnicas usados para controle ou paralisação da doença, bem como das possíveis respostas pulpares ao processo carioso (Ferreira, 2010). Contudo, lesões de cárie recorrentes, também denominadas lesões secundárias, ainda são consideradas a principal razão para substituição de restaurações (Itota *et al.*, 2002; Kidd *et al.*, 1992; Savarino *et al.*, 2004).

A doença cárie é um processo de dissolução de esmalte e/ ou dentina, causada por ação bacteriana na superfície dental e medida por um fluxo físico-químico de íons dissolvidos em água (Zero, 1999; Ferreira, 2010). A sua progressão é diretamente dependente de ácidos e enzimas produzidos pelas bactérias presentes no biofilme dental, cujos produtos incluem ácidos lácticos, acéticos e cítricos que reduzem o pH da superfície dental causando desmineralização dos tecidos duros (Featherstone, 1994; Peris *et al.*, 2007; Fontana *et al.*, 2010). Sua natureza multifatorial, classicamente descrita por Paul Keyes, na década de 60, relaciona-se com o desequilíbrio entre estrutura dentária e meio bucal, onde microbiota, dieta e hospedeiro são responsáveis pelo início e progressão da doença (Ferreira, 2010). Logo, a Odontologia continua pesquisando

medidas preventivas e restauradoras mais eficazes, que possam ser menos dependentes dos fatores etiológicos, para o controle da doença cárie.

Contemporaneamente, novas filosofias têm sido desenvolvidas com objetivo de controlar a doença cárie como a Odontologia Minimamente Invasiva (Minimally Invasive Dentistry, MID) (Ferreira, 2010; Fontana *et al.*, 2010). Dentro desta proposta, a técnica restauradora denominada Tratamento Restaurador Atraumático (TRA) ou ART (“Atraumatic Restorative Treatment”) foi desenvolvida com o objetivo de possibilitar o tratamento curativo e preventivo das lesões de cárie em populações desfavorecidas economicamente, com o conceito de remoção parcial de tecido cariado por meio de instrumentos cortantes manuais, seguida da restauração com material restaurador adesivo (Frencken *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 2006; Frencken *et al.*, 2004). O ART preconiza a remoção de dentina infectada, que é a camada superficial desmineralizada, irreversivelmente desnaturada e contaminada, conservando dentina afetada que é a camada mais profunda, reversivelmente desnaturada, mineralizada e não contaminada (Fusayama, 1979; Kidd, 2010) e posterior restauração com cimento ionomérico quimicamente ativado (Frencken & Holmgren, 2001). Tendo apresentado resultados clínicos longitudinais e laboratoriais satisfatórios, esta técnica restauradora passou a ser indicada também para situações clínicas em ambiente propício para realização de procedimentos restauradores, como consultórios odontológicos, para pacientes que apresentam atividade de doença cárie, propiciando a adequação do meio bucal do paciente (Frencken *et al.*, 2004; van 't Hof *et al.*, 2006; Prakki *et al.*, 2008; Zanata *et al.*, 2010).

Neste contexto, materiais odontológicos com atividade biológica são indicados dentro das filosofias atuais de tratamento da doença cárie baseadas em propriedades de remineralização e ação antimicrobiana. Devido à capacidade de indução da recuperação do remanescente dentário cariado, o uso destes materiais eliminaria a possibilidade de sobrevivência de microorganismos viáveis na dentina remanescente das lesões cariosas e, conseqüentemente, o crescimento

antibacteriano e injúria pulpar (Ferreira, 2010). O material restaurador cimento de ionômero de vidro (CIV) destaca-se como material biologicamente ativo, pela liberação de flúor, alumínio e zinco, com grande potencial de remineralização (Martins *et al.*, 1988; Mount, 1999; Pinheiro *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2006; Ngo, 2010).

Os CIVs foram criados por Wilson e Kent, em 1972, e desde então vêm sendo aprimorados. Estes materiais apresentam adesividade química à estrutura dentária, biocompatibilidade com os tecidos orais, e propriedades anticariogênicas conferidas por sua capacidade de liberação de flúor, o que protegeria a estrutura dentária adjacente dos ataques ácidos bacterianos (Martins *et al.*, 1988; Martins *et al.*, 2006; Ngo, 2010). Os cimentos ionoméricos também possuem coeficiente de expansão térmica linear semelhante ao dente, resultando em bom vedamento marginal (Mount, 1999; Anusavice, 2005). No entanto, como qualquer material restaurador, o CIV apresenta limitações como menor resistência mecânica comparado ao amálgama e resina composta, baixa resistência coesiva, sensibilidade à sinérese e embebição, tempo de presa inicial relativamente longo (Paulillo *et al.*, 1992; Mount, 1999; Martins *et al.*, 2006).

O flúor tem ação significativa na inibição do processo de desmineralização dos tecidos duros dentários, por meio de deposição mineral (Featherstone, 1994; Peris *et al.*, 2007). O íon de flúor, fluoreto (F<sup>-</sup>), diminui a desmineralização e ativa a remineralização do esmalte e da dentina (ten Cate & Van Duinen, 1995; Hara *et al.*, 2003; Pérís *et al.*, 2007). A diminuição da desmineralização diz respeito à precipitação de minerais na forma de fluorapatita, quando a hidroxiapatita da estrutura dental está sendo solubilizada pelo baixo pH gerado no biofilme dental exposto a carboidratos fermentáveis. A ativação da remineralização sugere que, quando o pH do biofilme dental volta a subir, ou quando este é removido pela escovação expondo a estrutura dental à capacidade remineralizadora da saliva, a precipitação de mineral nos locais onde ele foi perdido será ativada, se houver fluoreto presente no meio ambiente bucal (Tenuta

& Cury, 2008). Portanto, é bastante relevante afirmar que mais importante do que ter F incorporado à estrutura mineral do dente, na forma de fluorapatita, é ter fluoreto disponível na cavidade bucal, para ser incorporado à estrutura mineral do dente, quando o mineral mais solúvel hidroxiapatita está sendo dissolvido como consequência do processo de cárie. Pois, sendo menos solúvel, a fluorapatita é um mineral que tende a precipitar-se mais facilmente do que a hidroxiapatita em meio contendo cálcio e fosfato inorgânico, minerais presentes na saliva, no biofilme, e nos tecidos dentários, especialmente esmalte. Assim, havendo fluoreto presente na cavidade bucal, toda perda mineral que ocorrer sob o biofilme dental cariogênico tenderá a ser parcialmente revertida pela precipitação no dente do mineral menos solúvel, fluorapatita. Com isso, a perda mineral líquida é reduzida, uma vez que parte dos minerais perdidos é repostos novamente na estrutura dental. Logo, o mecanismo de ação do íon flúor é sempre o mesmo, independente do meio de utilização, seja por água fluoretada, dentifrícios fluoretados, ou materiais dentários que forneçam íons flúor para a cavidade bucal (Tenuta & Cury, 2008). Alguns autores afirmam que materiais liberadores de flúor são efetivos para inibição de cáries secundárias *in vitro* (Serra & Cury, 1992; Ten Cate & Van Duinen, 1995; Itota *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2006). Baseados nesta propriedade, muitos materiais restauradores que possuem liberação de flúor são usados na proposta de contribuir na prevenção de lesões de cárie secundárias (Peris *et al.*, 2007; Ten Cate & Van Duinen, 1995).

A problemática sobre o controle do desenvolvimento da doença cárie, sua prevenção e tratamento torna interessante a avaliação de materiais já consagrados na literatura, como o CIV, em associação à presença de fluoreto disponível na cavidade bucal por dentifrícios fluoretados. A formação do biofilme na margem da restauração pode causar lesões de cárie secundária ou recorrente, através dos ataques ácidos provindos da fermentação de açúcares pelas bactérias do biofilme retido no material restaurador ou na estrutura dentária adjacente, o que pode causar perda mineral a nível microscópico. Nessas condições, há

desequilíbrio entre desmineralização e remineralização modulado por condições críticas do pH ( $\text{pH} < 5,5$ ) que pode ser modificado pela liberação de fluoreto pelos cimentos ionoméricos e sua atividade antimicrobiana podendo influenciar, também, na microdureza da estrutura dental (Cavalli, 2007).

Sabe-se, também, que a mineralização da dentina marginal das restaurações é diferentemente afetada pela solução cariogênica artificial dependendo dos materiais restauradores, logo, a possibilidade de encontrar material, ou associação de materiais, que consigam diminuir ou prevenir a desmineralização do tecido dental e, conseqüentemente, o desenvolvimento de lesões de cárie secundária faz com que haja interesse em estudos *in situ*, ambiente mais próximo da realidade de estudos clínicos, com objetivo de avaliar esta relação com a prevenção do desenvolvimento da doença cárie.

Em função das descrições relevantes, a presente dissertação foi realizada com objetivo de avaliar a utilização de CIV indicado para ART, associado ou não à liberação de fluoreto à cavidade bucal pelo uso de dentifício, na prevenção da desmineralização dos substratos dentários, esmalte e dentina, após desafio cariogênico *in situ*, através das análises de desmineralização por teste de microdureza longitudinal e microscopia de luz polarizada.

## **2. CAPÍTULO ÚNICO**

### **“In situ anticariogenic effect of conventional glass ionomer cement by dentifrice dependence”\***

**Santos-Caldeira, M.M.P.<sup>a</sup>; Puppini-Rontani, R.M.<sup>a</sup>; Martins, L.R.M.<sup>a\*</sup>**

Milena Maria Pierre Santos-Caldeira – Department of Restorative Dentistry, Piracicaba School of Dentistry, State University of Campinas-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil

Regina Maria Puppini-Rontani - Department of Restorative Dentistry, Dental Materials Area, Piracicaba School of Dentistry, State University of Campinas-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil

\*Luís Roberto Marcondes Martins – Department of Restorative Dentistry, Piracicaba School of Dentistry, State University of Campinas-UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil

**\*Author to whom correspondence should be addressed. Present address:**

Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins

Departamento de Odontologia Restauradora – Área Dentística

Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP

Av. Limeira, 901 – Areião. CEP 13414-903, Piracicaba – SP, Brasil  
Tel.: +55-19-2106-5200. Fax: 55-19-3421-0144. E-mail: martins@fop.unicamp.br

## ABSTRACT

The aim of this study was to assess anticaries potential of conventional glass ionomer cement (GIC) to prevent enamel and dentin demineralization either alone or in combination with a fluoride (F) regimen. A randomized, blind, crossover design for caries induction was carried out in 2 phases of 14 days each. Seven volunteers wore palatal devices containing sound dental slabs (ST, control group) and dental slabs restored with GIC (GI). Biofilm were allowed to accumulate on the slabs, which were exposed extraorally to a 20% sucrose solution 8x/day. The volunteers used a non-F (NF) or an F (FD) dentifrice 3x/day, depending on the experimental phase. Then, enamel and dentin demineralization was analyzed by cross-sectional hardness and polarized light microscopy (PLM). For both dental substrate no significant interaction between the factors was found ( $p>0.05$ ). Also, for enamel and dentin, FD provided lower demineralization than NF ( $p<0.05$ ). For material, higher enamel demineralization was found for ST compared to GI ( $p<0.05$ ), but no differences were found between GI and ST in dentin substrate. By PLM was observed that the largest percentage of apparent demineralization occurred in NF+ST group and lowest apparent demineralization percentage occurred in GI+FD followed by ST+FD and GI+NF. Therefore, under cariogenic conditions independent of dentifrice, glass-ionomer restorations showed anticaries effect on enamel. The anticaries effect of fluoride dentifrice was proven under all cariogenic conditions studied.

Key-words: Glass ionomer, Fluoride, Dentifrice, Demineralization, Caries prevention.

## INTRODUCTION

The philosophy of minimally invasive dentistry (MID) and caries management by risk assessment (CAMBRA) approach are gaining popularity worldwide, prioritizing the new understanding that caries is lifestyle-associated bi-directional, multifactorial and biofilm-related disease (Fontana et al., 2010; Hara and Zero, 2010; Young and Featherstone, 2010).

In this context, dental materials and biological activity are included in the treatment of caries disease with the possibility of using GIC due to its remineralization and antimicrobial action abilities (Pinheiro et al., 2005). This material is indicated for high caries activity patients due to its property of ions release, including fluoride, which is important for dental demineralization control. In addition, the constant presence of fluoride in the oral cavity and hence in the biofilm provided by fluoride dentifrice is important for disease control.

Cenci et al. (2008) demonstrated *in situ* the significant interaction between the fluoride ions provided from fluoride dentifrice and resin modified glass ionomer cement, reducing dental substrates demineralization and showing the positive effect of this association. However, the study compared two restorative materials-based resin composites (resin modified glass ionomer cement and composite resin). However, for restorative treatment in high caries activity patients, conventional GIC has been recommended, as in the ART Technique.

*In situ* model studies have been used because they simulate clinical situations (Zero, 1995; Hara et al., 2003; Cenci et al., 2008). In addition, there is a consensus that human teeth are more relevant for *in situ* studies (Zero, 1995), despite the possibility of using bovine teeth (Hara et al., 2003). Moreover, this model proved to be adequate to evaluate caries in enamel or dentin, or even



adjacent to restorations as reported in previous studies (Hara et al. 2003; Paes Leme et al. 2004; Cenci et al. 2008 ; Sousa et al., 2009, Cury et al., 2010a). Therefore, this study aimed to evaluate the anticaries potential of the biologically active restorative material, GIC, to prevent the demineralization of enamel and dentin after *in situ* cariogenic challenges in a fluoride dentifrice regimen, analyzed by cross-section microhardness and polarized light microscopy. The hypothesis tested was that there is an association between GIC and fluoride dentifrice on enamel and dentin demineralization.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Ethical Aspects

The study was approved by the Research and Ethics Committee of Piracicaba Dental School (Process 002/2010). Seven volunteers (aged 23 to 30 years, of both genders) who fulfilled inclusion criteria (normal salivary flow rate, good general and oral health, ability to comply with the experimental protocol, not having used antibiotics during the 2 months prior to the study, not using fixed or removable orthodontic devices) were invited to take part in this research. All volunteers signed an informed written consent (Resolution No. 196 of the National Health Council, Health Ministry, Brasília, DF, BR, 10/03/1996).

## Experimental Design

The study involved a blind, crossover design for caries induction by biofilm accumulation and sucrose exposure, carried out in 2 phases of 14 days each. The blinding procedures involved the codification of the materials used during the experiment so that both the volunteers and the researcher could not identify them during the experimental and analyses stages. This study was a 2 x 2 cross-over factorial design as follows: (1) Material Treatment at 2 levels, dental slabs restored with glass ionomer cement (GI) and sound tooth slabs (ST); and (2) Dentifrice at 2 levels, non-fluoride dentifrice (NF) (placebo, silica-based, Malvatricids Baby, Daudt, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and fluoride dentifrice (FD) (1,450  $\mu\text{g}$  F/g as Sodium Monofluorophosphate, MFP, calcium carbonate-based, Colgate Tripla Ação, Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brazil). Therefore, the effect of those factors on the response variables was evaluated: hardness loss area ( $\Delta S$ ) (quantitative assessment) and light polarized microscopy (qualitative), concerning enamel and dentin, individually.

The experimental groups (Table 1) obtained from the association of those factors were assigned to the volunteers. In each experimental phase, volunteers used a palatal device loaded with two dental slabs from each group. Volunteers were randomly assigned in the first phase with four volunteers using FD while the three others used a NF dentifrice. They were assorted between groups using face-crown coin criteria. In the second phase, volunteers changed groups, characterizing a cross over design. Volunteers (n=07) were considered experimental units for all variables being studied. Biofilm was allowed to accumulate on the slabs, and a high cariogenic challenge was provided by exposing the biofilm/slab sets to a 20 % sucrose solution 8 times/day extra-orally. After each experimental phase was evaluated the integrated area of hardness loss as a function of lesion depth ( $\Delta S$ ) in enamel and dentin adjacent to the restorations by cross-sectional microhardness, and polarization microscopy was analyzed.

**Table 1.** Experimental groups resulting from the 2 x 2 cross-over factorial design.

<b>Material</b>	<b>X</b>	<b>Dentifrice</b>
<b>GI</b>	+	FD
<b>GI</b>	+	NF
<b>ST</b>	+	FD
<b>ST</b>	+	NF

### Sample Selecting

The standardization of the human third molar used in the study was performed by a surface microhardness test, using three indentations in the enamel on the cervical region of the buccal or lingual surface (flatter side) of each tooth, with a Vickers diamond (Future Tech FM-ARS, Future Tech Corp., Tokyo, Japan) under 250g load for 5s. From 64 human third molars without caries, 85 surfaces were obtained, and the average value of surface microhardness was calculated for each tooth. Those teeth that showed an individual average value outside the overall standard deviation value found were excluded from the experiment. Thus, 52 surfaces were assigned, and 14 of those surfaces were selected due to their flatter surface.

### Preparation of Enamel-Dentin Slabs

Enamel-dentin slabs (6 x 6 x 4 mm<sup>3</sup>) (Figure 1A) were prepared from the cervical region (3 mm above and 3 mm below the cementum-enamel junction) [Cenci et al., 2008]. The slabs were divided into two groups (n = 14), and only one group received cavities. Box-shaped standardized cavities (2 x 2 x 2 mm) were

prepared at the center of each slab, with diamond burs (# 1090, KG Sorensen, Barueri SP, Brazil, replaced after 5 preparations) at high-speed rotation and under water/air spray cooling. The occlusal margin of the cavity was located in enamel, while the gingival margin was located in dentin. The slabs were sealed with red acid-resistant nail varnish (Colorama, CEIL, São Paulo, SP, Brazil) except 1 mm from each margin (4 x 4 mm) [Cenci et al., 2009]. The specimens were kept moist during the experiment.

#### Sterilization of Dental Slabs

Prior to restorative procedures, all enamel-dentin slabs were sterilized by Gamma irradiation in a gamma radiation chamber (Gammacell 220 Excel, GC-220E; MDS Nordion, Ottawa, Canada) for 33 h and 58 min at 27°C with a 14.5 kGy dose in a glass container (Carvalho et al., 2009a; Carvalho et al., 2009b).

#### Preparation of the Palatal Devices

A custom-made acrylic resin intraoral palatal device was made for each volunteer. It contained two lateral cavities on each side, in which two slabs of the same group were placed.

#### Restorative Procedures

Before restorations placement, all cavities and slabs surfaces were cleaned with rotating brushes with NF and washed with deionized water.

The GIC used is indicated for ART technique (Ketac Molar Easy Mix, 3M ESPE, St. Paul, Minn., USA). The cavities were restored according to manufacturer's recommendations immediately before being placed in the palatal device and installed on the volunteers to simulate the clinical situation. Next, ART restorative procedures were carried out (Frencken & Holmgren, 2001): washing the cavity with water, drying cavity with cotton, conditioning cavity with Ketac Molar Liquid for 10 s, copious washing of the cavity with cotton soaked in water, drying cavity with cotton, manipulation of material according to the manufacturer's instructions, insertion of material into the cavity with a slight excess, digital pressure for 10 s with the index finger smeared with petroleum jelly making movements alternating in a mesio-distal and bucco-lingual direction to distribute the material over the entire cavity ("finger press technique"), removal of excess, and the final protection of material surface with petroleum jelly.

After 5 min of initial cure, each restoration was brushed manually for 10 s, with a soft brush to remove petroleum jelly excess. Immediately after each restoration, two dental slabs of each group were fixed in the palatal device (Figure 1B). Plastic meshes were fixed, leaving a 1mm space for accumulation of dental biofilm on the slabs (Hara et al., 2003) (Figure 1C). Then, the palatal device was installed on the volunteer's oral cavity, and the slabs did not receive any more dental hygiene. Thus, the restorations have established the setting time on the oral cavity of volunteers.

### Clinical Phase

Before and throughout each experimental phase, volunteers followed a 1-week lead-in period using the phase-designed dentifrice: FD (Sousa et al., 2009) or NF dentifrice (Cenci et al., 2008).

Cariogenic challenge to the restored specimens was provided by dripping a 20 % sucrose solution onto all slabs, 8 times a day (Sousa et al., 2009) (Figure 1C). Volunteers were instructed to remove the devices from the oral cavity, to remove the excess of saliva with gauze, and drip one drop of the solution onto each slab at 8.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00 and 22.00 h. Reinsertion of the device was carried out 5 min after dripping the solution to allow sucrose diffusion through the biofilm. The volunteers were instructed to wear the devices all the time, including at night. During mealtimes, devices were kept moist in plastic boxes. Volunteers brushed their teeth and the device with the assigned dentifrice 3 times a day, after main mealtimes. The device was cleaned by brushing with the dentifrice, except for the area containing the slabs. Volunteers lived in an optimally water fluoridated city (0.7 mg F/L for the region). No restriction was made with regard to the diet of the volunteers. After each experimental phase, a 1-week wash-out period was allowed before the commencement of the new phase (Cenci et al., 2008; Sousa et al., 2009; Cury et al., 2010) (Figure 1D).

#### Enamel and Dentin Demineralization Analyses

After each experimental phase, the integrated area of hardness loss was evaluated, by cross-sectional microhardness, as a function of lesion depth ( $\Delta S$ ) in enamel and dentin adjacent to the restorations. The similar regions on ST group slabs were analyzed. So, the plastic meshes over the enamel-dentin slabs were removed with a scalpel blade, and the biofilm was collected using a sterile spatula, on each group.

Each enamel-dentin slab was kept in 100% relative humidity sterile ependorf. Subsequently, they were longitudinally sectioned through the middle of the slab with diamond disc (Isomet 1000 Precision Saw, Buehler, Lake Bluff, Ill.,

USA), resulting in two hemi-blocks, containing restorative material and/or center of the dentin-enamel junction (Figure 1E).

One hemi-block of each treatment from each volunteer was embedded in acrylic resin, leaving the cut surface exposed, and then serially polished for 3 min with 320, 600, 1200 and 2000 grit silicon carbide (SiC) under water cooling and felt disc with a suspension of 1 micron alumina. Cross-sectional microhardness measurements were made with a microhardness tester (Future Tech FM-100, Future Tech Corp., Tokyo, Japan) with a Knoop diamond under a 25 g load for 5 s (Sousa et al, 2009; Cury et al., 2010).

Three lanes of 13 indentations each were made from the tooth-restoration interface, or in the case of control group (ST), 1 mm of each substrate from enamel-dentin junction. The lanes were repeated every 50  $\mu\text{m}$  for enamel and 120  $\mu\text{m}$  for dentin, determined in a previous study. The indentations were made at the following depths: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, and 200  $\mu\text{m}$  from the outer surface of each hemi block (Figure 1F).

The average hardness values of the three lanes at each distance from the surface of each substratum were then calculated and expressed as a Knoop hardness number. The area of hardness  $\times$  lesion depth ( $\Delta S$ ) was obtained by numerical integration using the trapezoidal rule by the difference between the area under the curve ( $\text{kg mm}^{-2} \times \mu\text{m}$ ) of the sound substrate (enamel or dentin) minus the area of the demineralized one (Sousa et al, 2009; Cury et al., 2010).

#### Polarized Light Microscopy (PLM)

For analysis by PLM, a hemi-block of each treatment from each volunteer was sectioned with diamond disc (Isomet 1000 Precision Saw, Buehler,

Lake Bluff, Ill., USA), resulting in three slices of about 500  $\mu\text{m}$  each. The slices' surfaces were polished under water cooling with 600, 1200, and 2000 grit SiC obtaining polished slices of 190  $\mu\text{m}$  (+ - 20  $\mu\text{m}$ ), using a polishing machine.

The specimens were observed in a light polarized microscope (DMLP Leica Polarizer Microscope, Leica, Wetzlar, Germany), immersed in deionized water, and placed on glass slides and under a cover slip. The enamel demineralization was analyzed at 5x magnification. All generated images were captured using a digital camera (Leica DFC 280, Leica, Wetzlar, Germany) coupled to a polarized light microscope and analyzed with the image capture software by Leica Application Suite (LAS - Version 2.8.1, Leica, Wetzlar, Germany) Specifications included Exposition 57.7, Saturation 1.45, Gamma 0.42, and Light intensity 3.5.

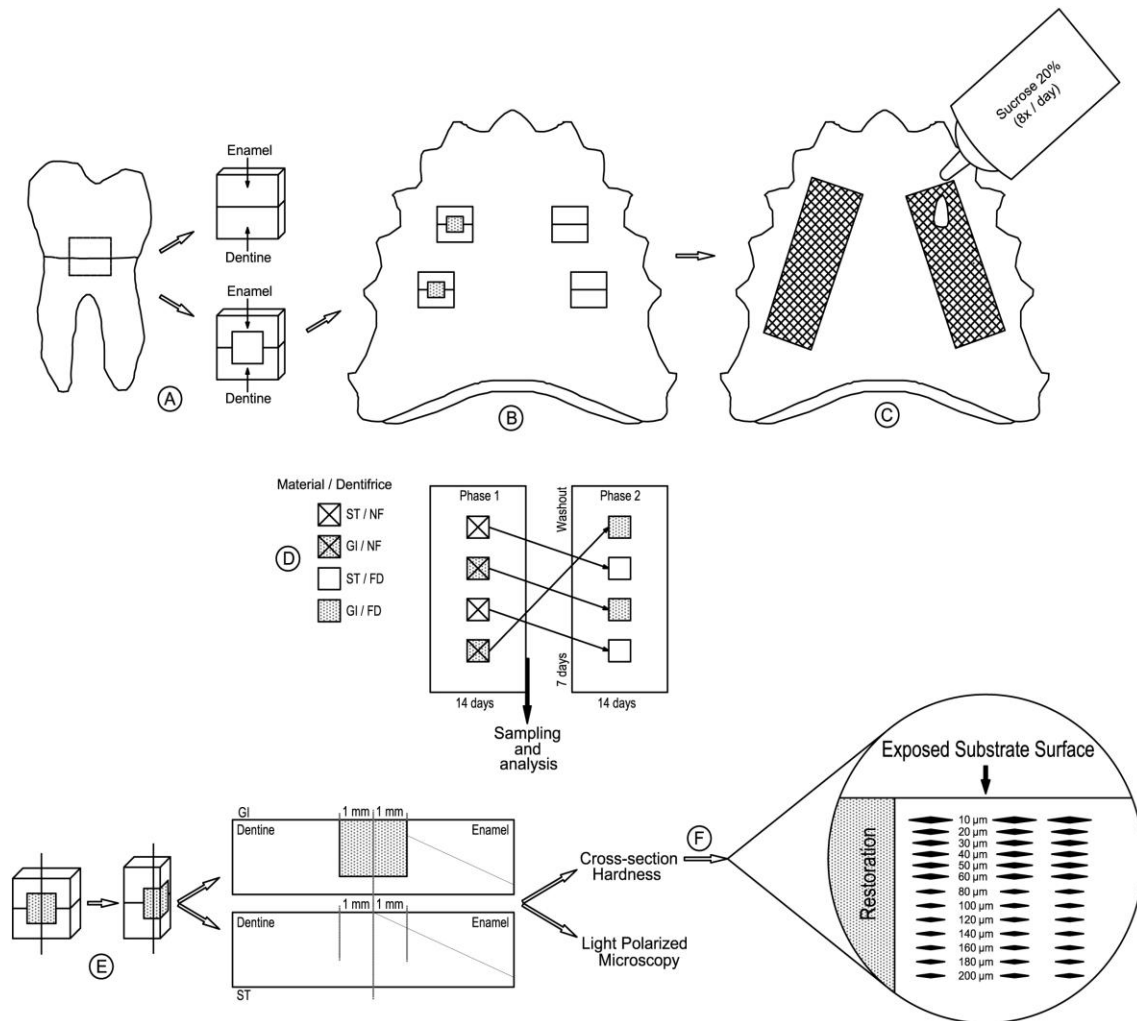
The images were first observed with an analyzer filter (5x) and secondly with a polarizing filter. For staining, a polarizing filter and lambda filter ( $\lambda$ ) were used because with  $\lambda$  filter, only areas of enamel demineralization, cavitated or not, are characterized by brown or blackish patches. Registered images were standardized in image size for subsequent microscopic descriptive analysis of the presence of substrate organization (Not Lesion: NL) or no substrate organization (Apparent Lesion: AL) that means apparent demineralization, after the cariogenic challenge *in situ*. Blinding was accomplished by coding the slices, which not allow the groups' identification.

### Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using analysis of variance for randomized experiment in factorial arrangement of levels of fluoride and material factors. A Tukey test was used for multiple comparisons of means. A randomized block



design was used for the statistical analyses, considering the volunteers as statistical blocks, and type of dentifrice and type of material as factors. Enamel and dentin demineralization were analyzed individually. SAS System 9.2 software (SAS Institute) was used for all tests. The significance level was set at 5 %.



**Fig. 1.** Illustration of experimental design.

## RESULTS

### **Analysis of enamel and dentin demineralization by cross-sectional microhardness**

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for each variable, and assumption violation was not found.

For both dental substrates studied, enamel and dentin, no significant interaction between the factors material treatment and dentifrice was found ( $p=0.2588$ ), observed by cross-sectional hardness.

ANOVA of **enamel** data showed that the presence of fluoride dentifrice provided statistically significant lower  $\Delta S$  values than NF dentifrice ( $p<0.05$ , Table 2). Also, GI provided statistically significant lower  $\Delta S$  values than ST ( $p<0.01$ , Table 2).

ANOVA of the data of **dentin** showed significant effect for dentifrice such that the presence of fluoride dentifrice provided statistically significant lower  $\Delta S$  values than NF dentifrice ( $p<0.01$ , Table 3), but not for material treatment ( $p>0.05$ , Table 3).

**Table 2.** Area of hardness loss ( $\Delta S$ , kg mm<sup>-2</sup> x  $\mu\text{m}$ ) in ENAMEL according to Dentifrice (FD and NF) and Material Treatment (GI and ST).

Dentifrice	$\Delta S$ Mean/ Std Dev	Upper 95% CL for Mean	Lower 95% CL for Mean	p value
FD	4155.04± 1404.99 <sup>A</sup>	4966.25	3343.82	0.0225
NF	5808.93± 2330.39 <sup>B</sup>	7154.46	4463.40	
Material	$\Delta S$ Mean/ Std Dev	Upper 95% CL for Mean	Lower 95% CL for Mean	p value
GI	4016.86± 1102.21 <sup>A</sup>	4653.26	3380.47	0.0093
ST	5947.10± 2378.35 <sup>B</sup>	7320.32	4573.88	

Different capital letters represent statistically significant differences for dentifrice and material separately.

**Table 3.** Area of hardness loss ( $\Delta S$ , kg mm<sup>-2</sup> x  $\mu\text{m}$ ) in DENTIN according to Dentifrice (FD and NF) and Material Treatment (GI and ST).

Dentifrice	$\Delta S$ Mean/ Std Dev	Upper 95% CL for Mean	Lower 95% CL for Mean	p value
FD	1038.84 ± 439.93 <sup>A</sup>	1292.85	784.82	0.0027
NF	1762.91 ± 870.52 <sup>B</sup>	2265.54	1260.29	
Material	$\Delta S$ Mean/ Std Dev	Upper 95% CL for Mean	Lower 95% CL for Mean	p value
GI	1185.79 ± 680.06 <sup>A</sup>	1578.45	793.13	0.0537
ST	1615.96 ± 819.46 <sup>A</sup>	2089.11	1142.82	

Different capital letters represent statistically significant differences for dentifrice and material separately.

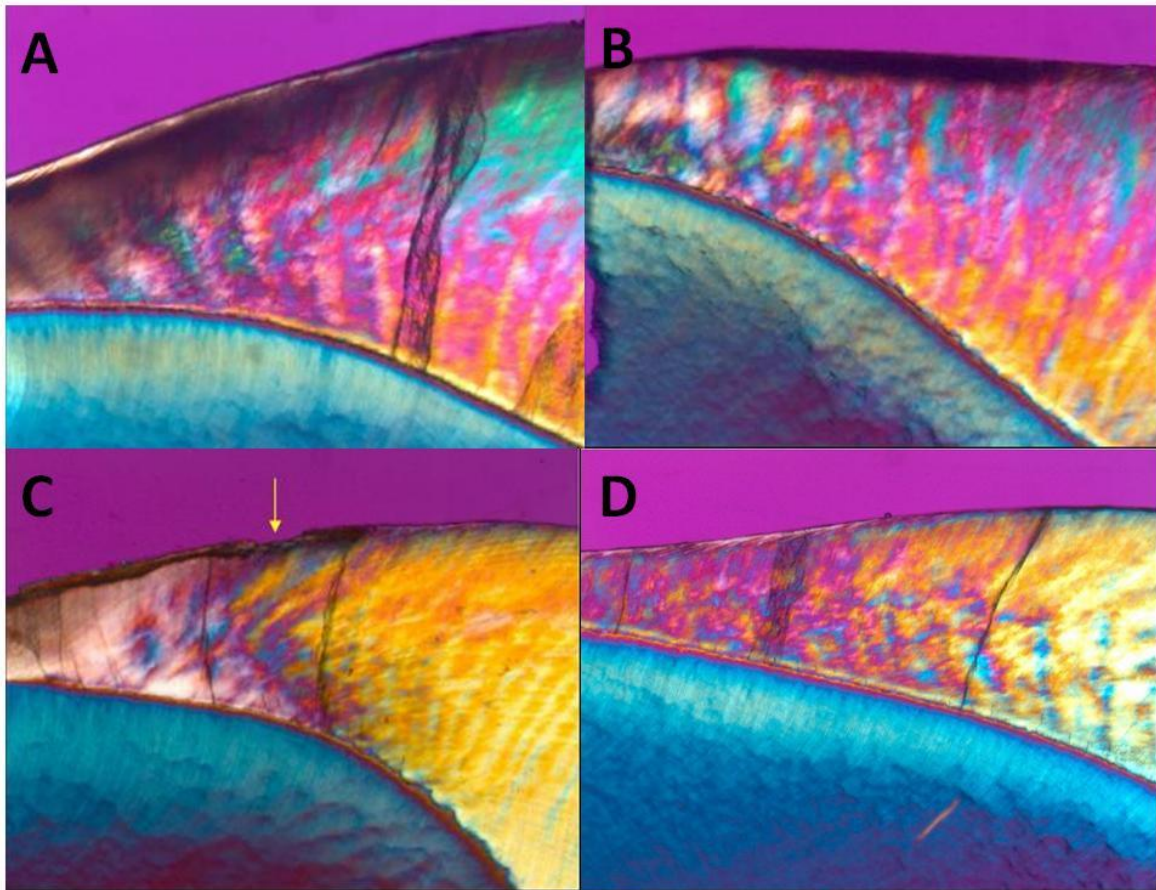
## **Analysis and identification of enamel demineralization by Polarized Light Microscopy (PLM)**

It was observed that the largest percentage of AL occurred in the NF+ST group (64.28%) and lowest AL percentage occurred in GI+FD (28.57%), followed by ST+FD (42.85%) and GI+NF (50%) (Table 4).

**Table 4.** Percentage for NL or AL observed by PLM.

<b>Group</b>	<b>% NL</b>	<b>% AL</b>
<b>GI + FD</b>	71.2%	28.57%
<b>ST + FD</b>	57.14%	42.85%
<b>GI + NF</b>	50%	50%
<b>ST + NF</b>	35.71%	64.28%

The analysis by PLM revealed areas of surface enamel demineralization that were not cavitated and were characterized by brown spots (Figure 2A) or blackish spots (Figure 2B), which corresponded to the clinically pigmented whitish, opaque macroscopic feature of incipient caries lesions (Silva et al., 2009a; Silva et al., 2009b). There were also significant areas of erosion in enamel that had cavities (Figure 2C). Samples that were not characterized as described before were considered as NL (Figure 2D).



**Fig. 2. A.** Noncavitated enamel surface, characterized by dark brown infiltration spots and accentuated transverse striations of the enamel. **B.** Typical demineralization showing a format similar to a blackish half-moon shape in incipient caries lesions. **C.** Enamel demineralization, characterized by dark brown infiltration spots already cavitated (arrow). **D.** Typical enamel and dentin without caries lesion, exhibiting permanent organization of dental substrates.

## DISCUSSION

The hypothesis of this study was not accepted. There is no interaction between material treatment and fluoride dentifrice presence in enamel and dentin.

The present findings are categorical when individually comparing the relevance F availability in the oral cavity in GI x ST and FD x NF. For both dental substrates studied, enamel and dentin, FD showed significant difference in inhibiting demineralization compared to NF after the cariogenic challenge established, regardless of the material of enamel-dentin slabs. These results corroborate previous *in situ* model studies described in the literature (Hara et al., 2003; Cenci et al., 2008).

For enamel demineralization, GI exhibited significant difference compared to ST in decreasing demineralization attributed to the high cariogenic challenge. Indeed, the GIC effect to inhibit caries lesions has been previously shown under *in situ* (ten Cate and van Duinen, 1995; Cenci et al., 2008; Sousa et al., 2009) and *in vitro* conditions (Serra and Cury, 1992; Martins et al., 2006; Cenci et al., 2009). Some authors attribute the good performance of GIC to some antibacterial effect due to fluoride release (Cenci et al., 2009); however, others believe that the highest fluoride release of conventional GIC might not be reflected in a greater inhibition of pH drop, suggesting that other additional factors, such as the aluminum release, acid reduction, and/or fluoride recharge, may be involved (Hara et al., 2003, Sousa et al., 2009). However, there is evidence that adjacent to GIC restorations, higher demineralization was found far from the cavity wall than closer to it. Smaller demineralization next to GIC restorations can be explained by the higher fluoride concentration in biofilm in this area. As described in the literature, higher fluoride concentration was found in biofilm formed on GIC than on composite resin when non-fluoride dentifrice was used (Cenci et al., 2008). The

present study showed that GI, when used with FD, provided the lowest percentage of apparent caries lesions (28.57%) illustrated by the images of polarized light microscopy. Thus, GI provided extra fluoride availability in the oral cavity as well as FD. As reported in some studies, the effects of fluoride from other sources, such as dentifrice and dental materials, are effective in inhibiting the caries lesion development (Hara et al., 2006; Cenci et al., 2008, Cenci et al., 2009; Sousa et al. 2009).

The presence of fluoride in the oral cavity reduces demineralization when the tooth hydroxyapatite is solubilized by the low pH that is generated in the biofilm exposed to fermentable carbohydrates and when there is precipitation of minerals in the form of fluorapatite (Cury et al., 1997). Therefore, most important is the available fluoride in the oral cavity, released by FD or GI, to be incorporated into the mineral structure of teeth when the more soluble mineral is dissolved as a result of caries process.

Among the means of fluoride release, dentifrice is the most rational as it links biofilm disorganization and fluoride exposure in the oral cavity. Therefore, the use of fluoride dentifrice seems as important as the choice of restorative material in the control of enamel secondary caries (Sousa et al., 2009). The existing scientific evidence for fluoride dentifrice anticaries activity is based on studies using conventional dentifrice, with fluoride concentrations between 1000 to 1500 ppm F (Cury et al., 2010a). The anticaries effectiveness of these dentifrices is independent of the fluoride compound type added to them, whether NaF or MFP (Fejerskov and Kidd, 2007; Cury et al., 2010b).

However, for dentin demineralization is no significant difference between GI and ST. Probably the fluoride released by GI was not enough to decrease dentin demineralization. The chemical composition of cementum-dentin represents approximately 5 % of its weight in carbonate mineral. However, carbonate apatite

is much more reactive than the hydroxyapatite, so it makes the dentin mineral more soluble (Hoppenbrouwers et al., 1986; Featherstone, 1994).

The results for the cariogenic challenge and the presence of GI was different for enamel and dentin because they are different dental substrates with different composition and solubility. This is very relevant when considering that sound root dentin mineral volume is approximately 47%; therefore, a 10% loss in weight represents 1/4 of dentin total mineral volume, much more than the enamel layer, where the same percentage of volume loss would represent only 1/8 of mineral loss (Featherstone, 1994). Additionally, hydroxyapatite is presented in higher concentrations in enamel than dentin, and carbonate apatite is represented by 5% dentin chemical composition against 3-2% for enamel (Featherstone, 1994). So, the rate of mineral and physical integrity in root dentin is far greater than in enamel. Consensus in literature shows that minerals are more soluble in dentin than in enamel (Shellis et al. 2010).

Based on these results and discussion, for cavities of carious lesions located in enamel, conventional GIC restorative material is indicated by the development demineralization process success. However, carious lesions ending on root dentin are more susceptible to demineralization. Hence, the fluoride sources association as fluoride dentifrice and GIC is the best indication.

It is important to state that without dental hygiene, such as the methodology used (Zero, 1995, Hara et al., 2003; Cenci et al., 2008, Cury et al., 2010a), biofilm accumulates. When they are exposed to fermentable carbohydrates, even in fluoride presence by fluoride dentifrice or GIC, acids are produced and dental mineral substrates tend to demineralize. Thus, to focus preventive measures on the fluoride use without controlling for other dental caries risk factors is insufficient because fluoride alone does not prevent dental substrate demineralization development. Therefore, longitudinal randomized clinical trials are



required to evaluate the anticaries effect of fluoride dentifrice association with fluoride-releasing restorative materials as the conventional GIC.

Based on the present findings, the association of conventional glass ionomer cement with fluoride dentifrice led to a lower percentage of apparent demineralization lesions in images of polarized light microscopy. Therefore, under cariogenic conditions independent of dentifrice, glass-ionomer restorations showed anticaries effect on enamel. The anticaries effect of fluoride dentifrice was proven under all cariogenic conditions studied.

## REFERENCES

Carvalho FG, Fucio SB, Pascon FM, Kantovitz KR, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. Effect of gamma irradiation on fluoride release and antibacterial activity of resin dental materials. *Braz Dent J* 2009;20:122-6.

Carvalho FG, Gonçalves LS, Carlo HL, Soares CJ, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. Influence of sterilization method on the bond strength of caries-affected dentin. *Braz Oral Res* 2009;23:11-6.

Cenci MS, Tenuta LM, Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, Cury JA. Effect of microleakage and fluoride on enamel-dentine demineralization around restorations. *Caries Res* 2008;42:369-79.

Cenci MS, Pereira-Cenci T, Cury JA, Ten Cate JM. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries Res* 2009;43:97-102.

Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997;31:356-60.

Cury JA, do Amaral RC, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci* 2010a;118:370-5.

Cury JA, Oliveira MJ, Martins CC, Tenuta LM, Paiva SM. Available fluoride in toothpastes used by Brazilian children. *Braz Dent J* 2010b;21:396-400.

Featherstone JD. Fluoride, remineralization and root caries. *Am J Dent* 1994;7:271-4.

Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: SANTOS; 2007. p. 49-68.

Fontana M, Young DA, Wolff MS, Pitts NB, Longbottom C. Defining dental caries for 2010 and beyond. *Dent Clin North Am* 2010;54:423-40.

Frencken JE, Holmgren CJ. ART: a minimal intervention approach to manage dental caries. *Dent Update* 2004;31:295-8, 301.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003;37:339-44.

Hara AT, Turssi CP, Ando M, González-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL Jr, Serra MC, Cury JA. Influence of fluoride-releasing restorative material on root dentine secondary caries in situ. *Caries Res* 2006;40:435-9.

Hara AT, Zero DT. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dent Clin North Am* 2010;54:455-67.

Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The vulnerability of unexposed human dental roots to demineralization. *J Dent Res* 1986;65:955-8.

Martins LRM, Silva ALF, Cury JA, Francischone CE. Fluoride release of glass ionomer restorations and its enamel incorporation after demineralization / remineralization cycles. *Rev Odonto Ciênc* 2006;21: 30-36.

Ngo H. Glass-ionomer cements as restorative and preventive materials. *Dent Clin North Am* 2010;54:551-63.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 2004;83:71-5.

Pinheiro SL, Simionato MR, Imparato JC, Oda M. Antibacterial activity of glass-ionomer cement containing antibiotics on caries lesion microorganisms. *Am J Dent* 2005;18:261-6.

Serra MC, Cury JA. The in vitro effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. *Quintessence Int* 1992;23:143-7.

Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, Addy M. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci* 2010;118:475-82.

Silva AR, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. *Caries Res* 2009;43:43-9.

Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrão HC, Rodrigues LK. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. J Dent 2009;37:44-51.

ten Cate JM, van Duinen RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. J Dent Res 1995;74:1266-71.

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

Young DA, Featherstone JD. Implementing caries risk assessment and clinical interventions. Dent Clin North Am 2010;54:495-505.

Zero DT. In situ caries models. Adv Dent Res. 1995;9:214-30.

### **3. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

#### **Aspectos metodológicos**

A odontologia minimamente invasiva é uma realidade palpável atualmente, oferecendo ao clínico a possibilidade de novas visões sobre prevenção e tratamento da doença cárie, sugestionando uma abordagem mais racional, individual e menos mecânica e objetiva em relação ao seu paciente. Dentro desta filosofia, provavelmente a Odontopediatria e a Dentística sejam áreas que mais tenham avaliado seus paradigmas. Esta dissertação almejou estudar uma metodologia com esta possível tendência atual, tentando casualizar desafio cariogênico *in situ*, atual e de considerada maior relevância do que testes laboratoriais, com material restaurador com capacidade de prevenção do desenvolvimento de doença cárie, o cimento ionomérico convencional indicado para Tratamento Restaurador Atraumático (Atraumatic Restorative Treatment – ART).

Consequentemente, dentro da metodologia escolhida modelo *in situ* foi realizado, pois o valor de ensaios tipo *in vitro* já foi questionado (Zero, 1995). A principal crítica aos estudos *in vitro* consiste na dificuldade de extrapolação dos dados para situações *in vivo* devido, principalmente, à falta de condições naturais de formação de película sobre as superfícies e acúmulo de biofilme sob influência dos fatores salivares e mecânicos presentes na cavidade bucal (Zero, 1995). Cenci *et al.* (2008) afirmaram que a maioria dos modelos *in vitro* são mais agressivos do que as situações *in situ* ou *in vivo* para estudos sobre doença cárie.

Em contrapartida, estudos sobre cárie secundária *in vivo* apresentam outros tipos de limitações, tais como: (1) não é possível, por motivos éticos, fixar fatores ou induzir condições para, por exemplo, permitir acúmulo de biofilme sob

condições controladas para se estudar prospectivamente desenvolvimento de lesões cárias; (2) não podem ser utilizados métodos precisos para avaliação quantitativa da perda mineral por serem destrutivos; (3) a alta variabilidade entre indivíduos requereria a inclusão de muitos sujeitos em um ensaio clínico, aumentando consideravelmente seu custo e dificuldade de execução; (4) no caso de estudos clínicos retrospectivos, haveria dificuldades para diferenciar as “novas” lesões de cárie secundária e as “velhas” lesões de cárie remanescentes, dificultando a interpretação dos resultados (Zero, 1995; Cenci 2008).

No entanto, modelo *in situ* apresenta as seguintes vantagens segundo Zero (1995): (1) modelos *in situ* podem ser conduzidos intra-oralmente, permitindo a inclusão de fatores salivares e acúmulo natural de biofilme; (2) estes estudos facilitam controle das variáveis experimentais em relação aos ensaios clínicos; (3) estes modelos facilitam integração de diversas técnicas analíticas, aumentando a sensibilidade e validade científica da metodologia; (4) o curto período de duração envolvido normalmente evita a implicação de problemas éticos relacionados a estudos clínicos; (5) custo de modelos *in situ* é geralmente muito mais baixo do que de ensaios clínicos. Assim, modelos *in situ* podem ser considerados o estágio intermediário entre estudos *in vitro* e *in vivo*, somando controle de condições clínicas com desenvolvimento de cárie (Zero, 1995; Hara et al., 2003). Ainda, estudos prévios demonstraram que o modelo utilizado é adequado para estudar cárie em esmalte, dentina, ou mesmo adjacente a restaurações (Hara et al., 2003; Paes Leme et al., 2004; Cenci et al., 2008; Sousa et al., 2009; Cury et al., 2010a).

### **Substratos dentais**

Para o desenvolvimento do desafio cariogênico *in situ*, optou-se por blocos dentais contendo esmalte e dentina. Assim, foi analisada a reação de cada substrato, dentro do mesmo fator em estudo, por voluntário. Escolheu-se utilizar a

região cervical de dentes humanos porque, normalmente, cavidade de lesão de cárie é constituída de esmalte e dentina, havendo portanto, maior aplicabilidade clínica do que a avaliação de bloco dental com apenas um substrato.

### **Material restaurador**

Foi escolhido como material foco deste estudo cimento de ionômero de vidro indicado para ART, em função de seu emprego em situações clínicas de adequação do meio bucal e ART. Ambas ocorrem normalmente em cavidades bucais com atividade e alto risco à cárie.

Não foi avaliado comportamento de resina composta, material de escolha para controle em vários estudos *in situ*, considerando-se que este material restaurador tem camada híbrida muito eficiente quando nova e ótima união ao esmalte, logo seria injusta a comparação com cimentos ionoméricos, além de que, resina composta não é material restaurador de escolha em alto risco à cárie e não é indicada para pacientes com atividade de cárie.

### **Aleatorização por blocos**

A seleção dos blocos para cada grupo e confecção das restaurações foi feita por tipo de dente, superior ou inferior, e face de dente, vestibular ou lingual, para cada grupo. Os dentes utilizados, terceiros molares humanos hígidos, tiveram estas faces selecionadas em função de serem, anatomicamente, as faces mais planas dos molares.

### **Teste de Dureza Vickers**

O teste de Dureza Vickers foi escolhido para padronização dos terceiros molares hígidos utilizados no presente estudo considerando-se a dureza superficial média dos dentes selecionados, para evitar maior variabilidade de respostas, porque um modelo de estudo com utilização de voluntários, consequentemente de possível grande variabilidade, foi desenvolvido.

Em função dos resultados obtidos no presente estudo, considerou-se que a padronização dos dentes para pesquisa, pelo teste de microdureza superficial, foi de essencial relevância, permitindo que obter-se valor de desvio padrão razoável, em relação às médias, durante a análise das variáveis de resposta, o que indica validação dos resultados numéricos.

### **Preparos cavitários**

Para confecção dos preparos cavitários optou-se pela ponta diamantada 1090 por ser uma ponta cilíndrica fina, de extremo plano, para facilitar a realização e padronização dos preparos cavitários que foram avaliados com sonda milimetrada. Optou-se pela ponta diamantada cilíndrica para confecção de preparos cavitários, em forma quadrangular, para que a partir da cavidade quadrada restaurada conseguiu-se as secções para análise dos diferentes testes.

### **Microdureza Longitudinal**

Diminuição da microdureza dos tecidos dentais duros implica em sua dissolução e degradação (Cavalli, 2007). Devido ao alto conteúdo inorgânico, a dureza do esmalte, expressa em relação à deformação, varia entre 200 a 500



Knoop. Essa variação ocorre devido aos diferentes planos do esmalte utilizados nos testes de dureza, o que implica na mensuração dos prismas em diferentes orientações (Cavalli, 2007). A dureza determina a capacidade de deformação do substrato dentário mensurado. No esmalte, os valores de dureza correlacionam-se com a resiliência mecânica do esmalte os quais são definidos pela combinação do conteúdo inorgânico cristalino e da matriz orgânica (proteínas e lipídeos) (Featherstone *et al.*, 1983).

Todavia, uma limitação da microdureza de superfície está relacionada à localização das indentações realizadas no substrato dentário. Nesta técnica de mensuração superficial, as indentações são realizadas na superfície do substrato, portanto, não pode ser utilizada para fornecer detalhes das mudanças da microdureza na subsuperfície, e nem em diferentes zonas do corpo da lesão (Featherstone *et al.*, 1983).

Dessa maneira, a microdureza interna foi correlacionada com conteúdo mineral da subsuperfície do esmalte tratado, observando que microdureza interna está diretamente relacionada com a concentração de cálcio local no substrato (Featherstone *et al.*, 1983). Essa relação foi comprovada através da correlação entre valores de microdureza interna e mensuração do conteúdo mineral fornecido pela microrradiografia de contato, que fornece a determinação quantitativa da densidade mineral observada através do raio-X (Featherstone *et al.*, 1983; Cavalli, 2007). Por muito tempo, valores de microdureza eram revertidos em porcentagem de volume mineral por  $\mu\text{m}$  (Featherstone *et al.*, 1983), e também por  $\Delta Z$  referente a conteúdo mineral (Hara *et al.*, 2003; Cenci *et al.*, 2008). Recentemente, entende-se que sendo porcentagem de volume uma medida tridimensional, logo, é mais real comparar a mensuração pela microdureza com uma medida bidimensional, assim,  $\Delta S$  que é relação de área exprime perda de dureza (Sousa *et al.*, 2009).

Logo, o teste de microdureza longitudinal foi o teste de escolha por possibilitar a avaliação das mudanças da microdureza de subsuperfície, e, em diferentes zonas do corpo da lesão (Featherstone *et al.*, 1983). Além de que, a avaliação dos resultados expressa por  $\Delta S$  é atual e bem indicada.

No teste de microdureza longitudinal foram realizadas 3 fileiras de 13 identações sendo as 6 primeiras identações a cada 10  $\mu\text{m}$  e as sete identações seguintes a cada 20  $\mu\text{m}$ , até que se completasse 200  $\mu\text{m}$  de superfície, obtendo-se 13 identações por fileira, sendo 36 por substrato, logo 78 identações por amostra. Consequentemente, para análise quantitativa foram realizadas 10920 identações.

A média, e desvio padrão, de microdureza de cada distância longitudinal foi calculada por amostra. O valor médio de cada distância foi tabelado para análise e obtenção de gráfico que evidencia a partir de qual identação daquele substrato começa a existir uma constante de valores. Esta constante de valores representa o valor de microdureza para substrato hígido. Valores inferiores são referentes ao substrato desmineralizado.

Ao se calcular a diferença entre área total e área hígida, obtemos valor referente à área desmineralizada. A área pode ser calculada porque o teste de microdureza resulta em uma imagem de dados bidimensionais, e área é uma medida bidimensional, diferentemente de  $\Delta Z$  que diz respeito ao volume, que é uma medida tridimensional.

Obtido o valor referente a área desmineralizada de cada amostra, por hemi bloco, foi obtida a média das 2 amostras de cada grupo por voluntário. Esta média é o valor final, de área desmineralizada por grupo, para cada voluntário, considerado bloco estatístico.

## **Microscopia por Polarização**

Para entender-se microscopia por luz polarizada (MLP) são relevantes alguns conceitos. Microscopia de polarização é uma técnica laboratorial que traz informações sobre histologia, ultra-estrutura e organização molecular de células e tecidos. Esse tipo de microscopia óptica permite a pesquisa e a determinação das anisotropias ópticas, dentre elas, a birrefringência (Silva, 2008).

Define-se anisotropia óptica como um fenômeno de dupla refração, consistindo na ocorrência da divisão de um raio de luz não polarizada em dois componentes polarizados e com velocidades distintas, sendo refletidos e refratados com ângulos diferentes (Moreira, 2007). Ao contrário, isotropia é a propriedade que caracteriza substâncias que possuem as mesmas propriedades físicas independentemente da direção considerada.

A birrefringência consiste em efeito provocado pela anisotropia óptica do objeto. Assim, ocorre a partir da divisão de um raio de luz polarizada em dois, com velocidades distintas e com distintos ângulos de refração. Pode-se dizer que consiste na diferença dos distintos índices de refração. Quanto maior essa diferença, mais birrefringente é o objeto. Quando ocorre modificação no padrão normal de birrefringência de um objeto, significa que está ocorrendo desorganização na estrutura macromolecular (Moreira, 2007).

A birrefringência é a propriedade anisotrópica que reflete alto grau de organização em nível molecular, com possível relevância funcional. Portanto, é plausível inferir que alterações no brilho de birrefringência da matriz orgânica do esmalte secretório possam refletir certo grau de desordem molecular, que por sua vez represente um ponto de partida para alterações na fase mineral do esmalte (Espírito Santo, 2008).

Os materiais cristalinos revelam propriedades anisótropicas perante à luz. O esmalte dental maduro é constituído por cristais de hidroxiapatita incluídos em pequena quantidade de material orgânico, sendo assim, um substrato anisotrópico (Espírito Santo, 2005).

Correlacionando à perda mineral a nível microscópico, a microscopia de luz polarizada é capaz de evidenciar os estágios mais precoces do processo de desmineralização. É considerada uma técnica simples, precisa e adequada para avaliação das alterações no esmalte frente a diferentes tratamentos, especialmente, da avaliação dos processos cariosos. Através da análise do conteúdo mineral em microrradiografias foi constatada a correlação linear entre os valores de refração óptica e o conteúdo mineral calculado. Tal correlação evidencia o conteúdo inorgânico do esmalte (Cavalli, 2007).

O fotomicroscópio de polarização possui dois prismas: um polarizador e outro analisador. A luz ao penetrar em estruturas como as citadas se desdobra em duas. O prisma deixa passar uma das vibrações luminosas mas não a outra, de modo que as estruturas que forem isotrópicas serão canceladas e no seu lugar ficará escuro. As estruturas anisotrópicas produzirão um tipo de vibração luminosa que passará e deixará a estrutura brilhante e o restante do material escuro (Moreira, 2007; Silva, 2008).

De modo complementar, técnicas convencionais de microscopia baseadas na iluminação comum, recorrem-se com frequência às propriedades da luz polarizada, pelo fato de que podem orientar de modo mais específico a diferenciação e identificação de áreas com estruturas diferentes em um mesmo tecido. MLP é uma técnica sensível que pode mostrar alterações em tecidos duros, e que, quando bem indicada, pode mostrar qualitativamente perda ou ganho mineral. Uma limitação desta técnica é que a qualidade das imagens obtidas é dependente do método de preparação dos espécimes (Silva, 2008).

Para análise descritiva por MLP é importante relatar que apesar de alguns autores (Espírito Santo, 2005; Silva 2008) considerarem uma técnica simples para observação de desmineralização ou não, existiram dúvidas em algumas amostras pela observação direta pelo filtro polarizador. Conseqüentemente, para melhor padronização e avaliação imediata e posterior das amostras, as mesmas foram observadas em determinados filtros presentes do fotomicroscópio de luz polarizada, e foram registradas as imagens em cada filtro para todas amostras. Primeiramente, foi feita observação apenas com filtro analisador (5x). Após registro da imagem inicial, foi feito registro com filtro polarizador. E, finalmente, foi observada e registrada a imagem com utilização também do filtro Lambda ( $\lambda$ ), através do qual as possíveis dúvidas obtidas por imagens apenas com filtro polarizador foram sanadas, já que com filtro  $\lambda$  somente áreas de desmineralização superficial em esmalte não cavitado ou que já sofreu erosão (Figure 2C) eram caracterizadas por manchas de cor castanha (Figure 2A) ou enegrecidas (Figure 2B). Notou-se também relação direta com a presença de sinais clínicos de lesão de cárie incipiente em esmalte, manchas brancas, com presença de desmineralização analisado por MLP. Com estes achados pode-se indicar MLP como fator esclarecedor para futuras análises de substratos dentários.

#### **4. CONCLUSÃO**

Diante dos objetivos e metodologia empregada, após análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A utilização de dentifrício fluoretado proporcionou menores áreas de desmineralização, provendo efeito anticárie sob todas condições estudadas.

Independente do tipo de dentifrício, restaurações de ionômero de vidro apresentaram efeito anticárie em esmalte.

A associação do cimento de ionômero de vidro convencional a dentifrício fluoretado levou à menor porcentagem de desmineralização aparente nas imagens de microscopia de luz polarizada.

## **5. REFERÊNCIAS**

Anusavice KJ. Phillips Materiais Dentários. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 312-341.

Cavalli V. Influência de formulações de agentes clareadores nas propriedades físicas e químicas do esmalte e dentina. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.

Cenci MS. Avaliação da associação entre infiltração marginal e cárie adjacente a restaurações dentárias. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2008.

Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN. Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades. São Paulo: Santos; 2001. p. 31-68.

Espírito Santo AR. Birrefringência da matriz orgânica do esmalte dentário. [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Espírito Santo AR. Efeitos das alterações genéticas e ambientais sobre a birrefringência da matriz orgânica do esmalte dentário. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2008.

Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res. 1983; 17(5): 385-91.

Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. Características clínicas e histológicas da cárie dentária. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos; 2007. p. 71-96.

Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997 Feb; 25(1): 5-12.

Ferreira JMS. Avaliação clínica e radiográfica do cimento antibacteriano em lesões cáries profundas de molares decíduos: ensaio clínico randomizado. [tese]. Camaragibe: Universidade de Pernambuco/Faculdade de Odontologia; 2010.

Frencken JE, Pilot T, Songpaisan Y, Phantumvanit P. Atraumatic restorative treatment (ART): rationale, technique, and development. *J Public Health Dent.* 1996; 56(3): 135-40; 161-3.

Frencken JE, Holmgren CJ. Tratamento restaurador atraumático (ART) para a cárie dentária. São Paulo: Santos; 2001.

Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979; 4(2): 63-70.

Itota T, Nakabo S, Iwai Y, Konishi N, Nagamine M, Torii Y. Inhibition of artificial secondary caries by fluoride-releasing adhesives on root dentin. *J Oral Rehabil.* 2002 Jun; 29(6): 523-7.

Kidd EA, Toffenetti F, Mjör IA. Secondary caries. *Int Dent J.* 1992 Jun; 42(3): 127-38.

Martins LRM, Navarro MFL, Francischone CE, Lovadino JR, Almeida JV. Restauração mista associando-se cimento de ionomérico e resina composta. *Rev Odont USP.* 1988; 2(4): 229-232.

Ministério da saúde. Condições de saúde bucal na população brasileira 2002-2003. Resultados Principais. Brasília, 67p, 2004 [acesso 2010 Dez 12]. Disponível em: [http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/04\\_0347\\_M.pdf](http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/04_0347_M.pdf)



Moreira DM. Análise por microscopia de polarização e microscopia eletrônica de varredura da estrutura dentinária de dentes bovinos frente a diferentes substâncias químicas auxiliares de uso endodôntico. [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.

Mount GJ. Glass ionomers: a review of their current status. *Oper Dent*. 1999 Mar-Apr; 24(2): 115-24.

Paulillo LAMS, Lovadino JR, Martins LRM, Serra MC, Sartini Filho R. Cimento de ionômero de vidro – resistência ao deslocamento com diferentes tipos de tratamento em dentina. *RBO* 1992; 2: 8-11.

Peris AR, Mitsui FH, Lobo MM, Bedran-russo AK, Marchi GM. Adhesive systems and secondary caries formation: Assessment of dentin bond strength, caries lesions depth and fluoride release. *Dent Mater*. 2007 Mar; 23(3): 308-16.

Pinheiro SL. Análise microbiológica e em microscopia de varredura da dentina infectada selada com cimento antibacteriano. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo/FOUSP; 2004.

Prakki A, Nunes MC, Cefaly DF, Lauris JR, Navarro MF. Six-year evaluation of the atraumatic restorative treatment approach in permanent-tooth Class III restorations. *J Adhes Dent*. 2008; 10(3): 233-7.

Savarino L, Breschi L, Tedaldi M, Ciapetti G, Tarabusi C, Greco M, Giunti A, Prati C. Ability of restorative and fluoride releasing materials to prevent marginal dentine demineralization. *Biomaterials*. 2004 Mar; 25(6): 1011-7.

Silva ARS. Análise morfológica e conteúdo mineral da cáeria de radiação. Estudo por microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura. [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2008.

Tenuta LMA, Cury JA. Evidências para uso de fluoreto na Odontologia. *Jornal ABO* 2008; 115:24-25; 116: 14-15.

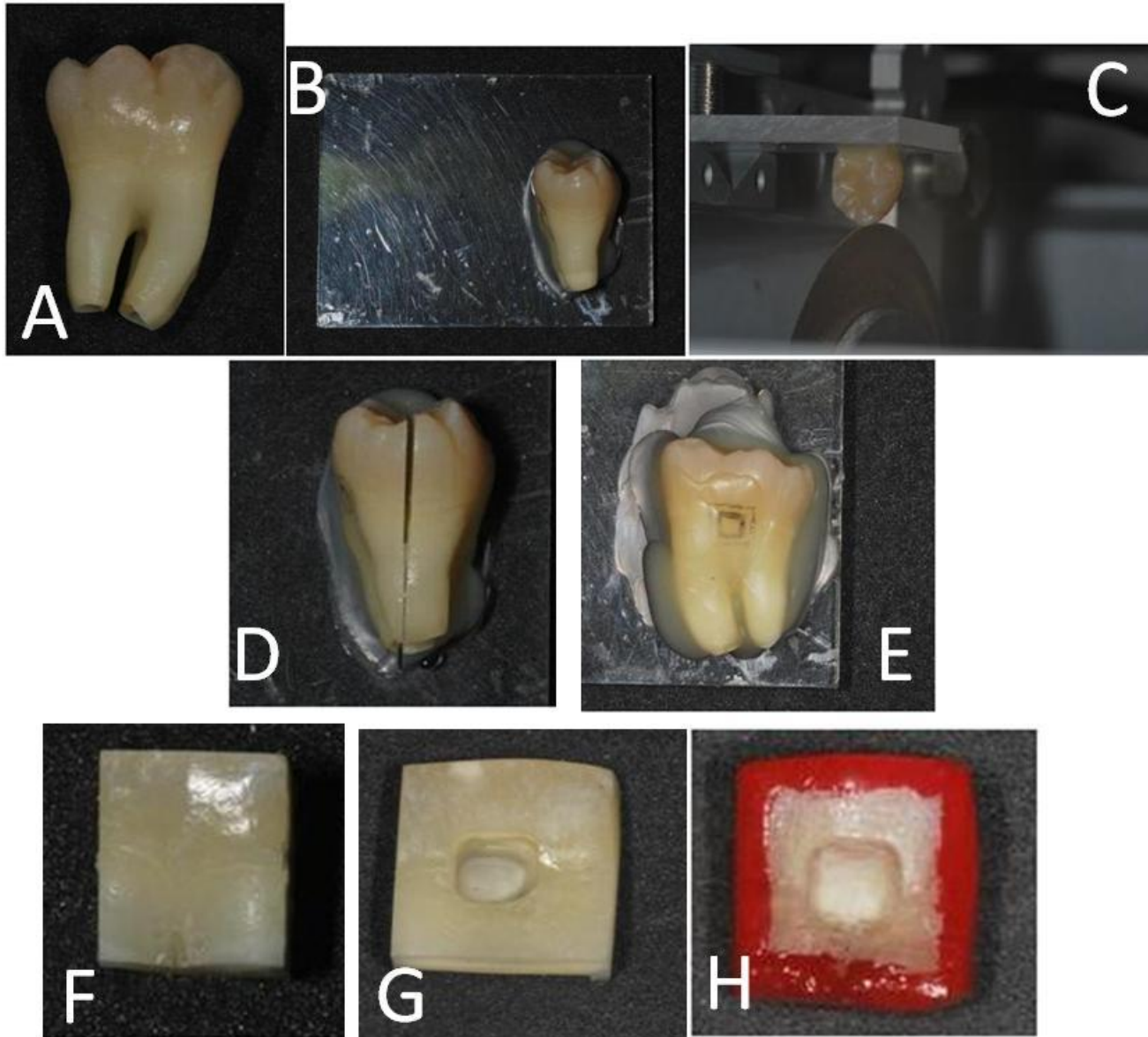
van 't Hof MA, Frencken JE, van Palenstein Helderma WH, Holmgren CJ. The atraumatic restorative treatment (ART) approach for managing dental caries: a meta-analysis. *Int Dent J.* 2006; 56(6): 345-51.

Zanata RL, Fagundes TC, Freitas MC, Lauris JR, Navarro MF. Ten-year survival of ART restorations in permanent posterior teeth. *Clin Oral Investig.* 2011; 15(2): 265-71.

Zero DT. Dental caries process. *Dent Clin North Am.* 1999 Oct; 43(4): 635-64.

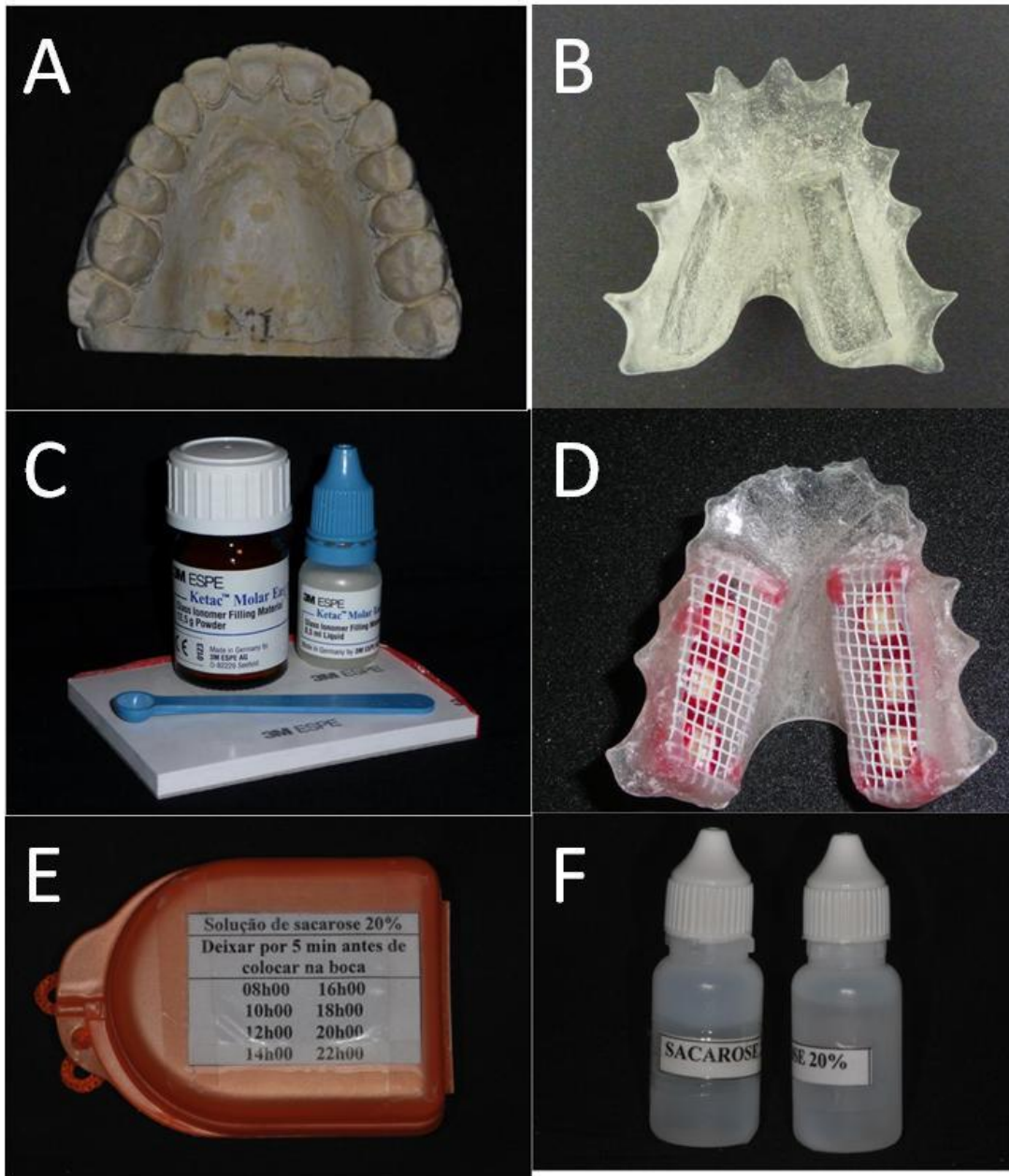
## 6. APÊNDICES

### APÊNDICE 1



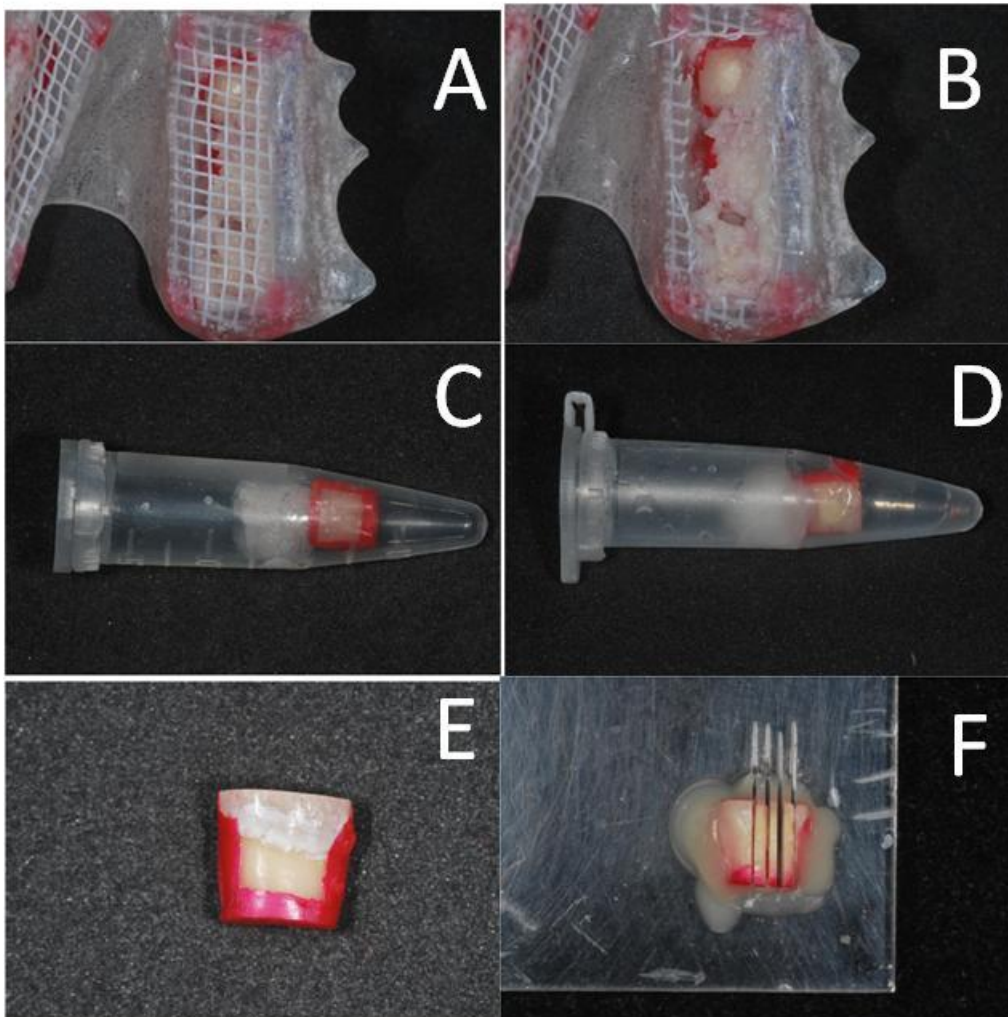
**A.** Exemplar de 3º. Molar selecionado. **B.** Fixação de 3º. Molar para corte longitudinal. **C.** 3º. Molar posicionado em cortadeira de precisão. **D.** 3º. Molar seccionado. **E.** Fixação de dente seccionado para obtenção dos blocos. **F.** Bloco dental. **G.** Bloco dental com preparo cavitário. **H.** Bloco dental com impermeabilização com verniz ácido-resistente vermelho.

## APÊNDICE 2



**A.** Modelo para confecção de dispositivo. **B.** Base do dispositivo intra-oral. **C.** Cimento de ionômero de vidro utilizado no estudo (Ketac Molar Easy Mix – 3M ESPE). **D.** Dispositivo intra-oral com blocos dentais e redes fixadas. **E.** Caixa plástica com horários para aplicação de sacarose 20%. **F.** Frascos de sacarose 20%.

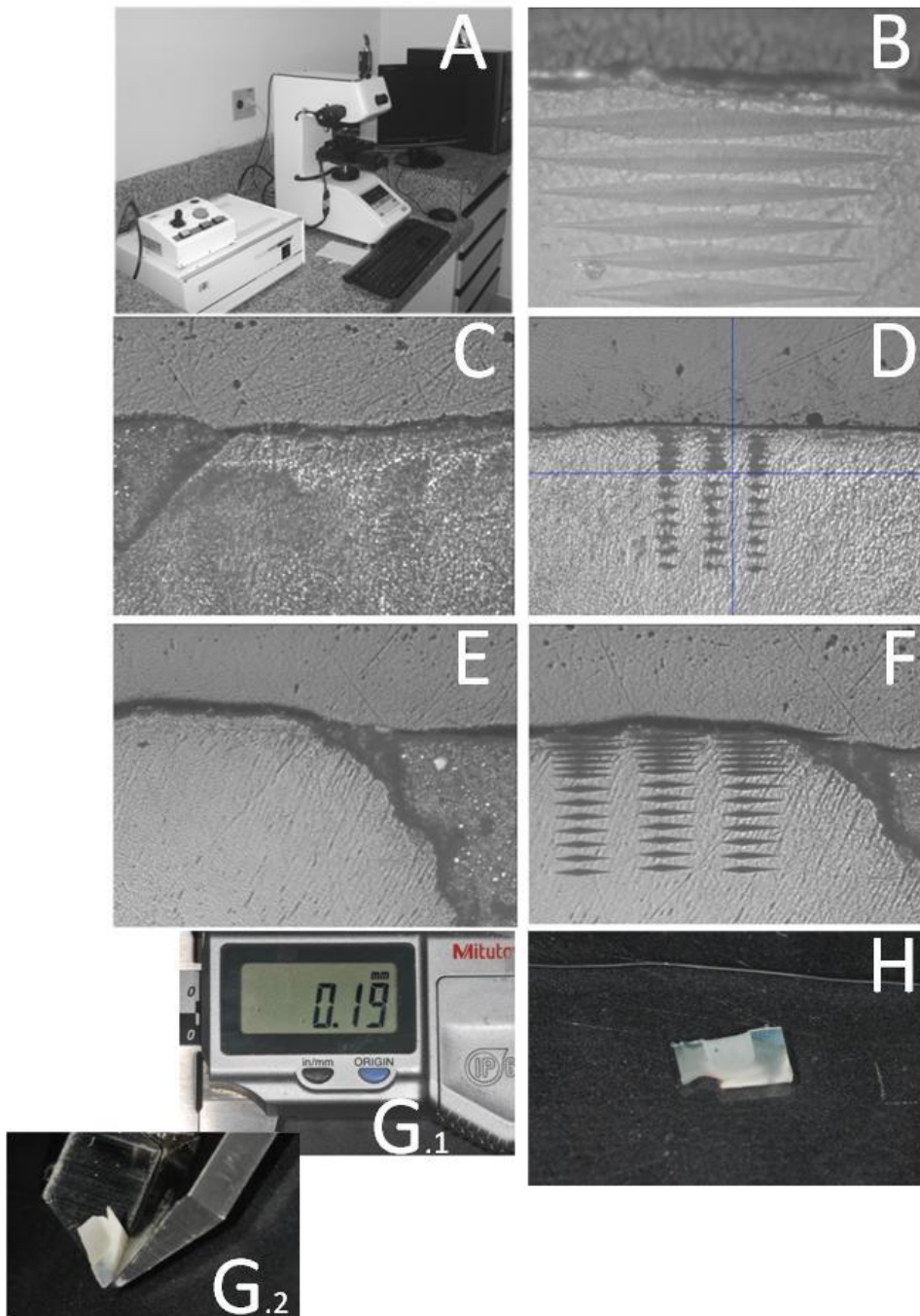
### APÊNDICE 3



**A.** Dispositivo intra-oral com acúmulo de biofilme após 14 dias in situ. **B.** Remoção da tela plástica para retirada dos blocos dentais. **C.** Armazenamento de bloco do grupo ST para fase laboratorial. **D.** Armazenamento de bloco do grupo GI para fase laboratorial. **E.** Amostra com mancha branca de esmalte apenas na região não impermeabilizada. **F.** Seccionamento da amostra para fase laboratorial.



## APÊNDICE 4



**A.** Microdurômetro utilizado no teste de Microdureza longitudinal. **B.** Início de fileira de identações (50x). **C.** Esmalte adjacente à restauração (10x). **D.** Fileiras

de identações em esmalte a cada 50  $\mu\text{m}$  (10x). **E.** Substrato dentinário adjacente à restauração (10x). **F.** Fileiras de identações em dentina a cada 120  $\mu\text{m}$  (10x). **G.1 e G2.** Conferência da espessura da fatia para observação em microscopia de luz polarizada. **H.** Amostra sobre lâmina de vidro embebida em água deionizada para observação em microscopia de luz polarizada.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1

	<p><b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> <b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA</b> <b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b></p>	
<h3>CERTIFICADO</h3>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "<b>Avaliação in situ do potencial anticariogênico de cimentos ionoméricos convencional e contendo antibacterianos</b>", protocolo nº 002/2010, dos pesquisadores Luis Roberto Marcondes Martins e Milena Maria Pierre Santos Caldeira, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 10/02/2010.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "<b>Anticariogenic potential of convencional ionomeric cement and containing antibacterial agents: An in situ study</b>", register number 002/2010, of Luis Roberto Marcondes Martins and Milena Maria Pierre Santos Caldeira, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 02/10/2010.</p>		
		
<p><b>Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas</b> Secretário CEP/FOP/UNICAMP</p>	<p><b>Prof. Dr. Jacks Jorge Junior</b> Coordenador CEP/FOP/UNICAMP</p>	
<p><small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>		



## Anexo 2



Dear Ms. Santos-Caldeira:

Thank you for submitting your manuscript entitled "In situ anticariogenic effect of conventional glass ionomer cement by dentifrice dependence" to "Caries Research"; the submission number is: 2544. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

If you have any queries please send an email to: [david.beighton@kcl.ac.uk](mailto:david.beighton@kcl.ac.uk).

With kind regards,

Editorial Office

---

This email has been scanned by the MessageLabs Email Security System.  
For more information please visit <http://www.messagelabs.com/email>

---