Cristiane Franco Pinto
Cirurgiã-dentista

ANÁLISE DA UNIÃO E DOS TECIDOS DENTAIS (ESMALTE/DENTINA) ADJACENTES ÀS RESTAURAÇÕES COM SISTEMAS ADESIVOS CONTENDO FLUORETO APÓS DESAFIOS CARIOGÊNICOS IN SITU E IN VITRO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica- Área de Dentística
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Giannini

PIRACICABA
2010

i

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

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

P658a

Pinto, Cristiane Franco.
Análise da união e dos tecidos dentais (esmalte/dentina) adjacentes às restaurações com sistemas adesivos contendo fluoreto após desafios cariogênicos *in situ* e *in vitro*. / Cristiane Franco Pinto. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Marcelo Giannini.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cárie dentária. 2. Placas dentárias. 3. Microscopia. 4. Resistência à tração. 5. Dureza. I. Giannini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Analysis of adhesion and mineralized dental tissues (enamel/dentin) around restorations with fluoride-containing adhesive systems after cariogenic challenge *in situ* and *in vitro*

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental caries. 2. Dental plaques. 3. Microscopy. 4. Tensile strength. 5. Hardness

Área de Concentração: Dentística

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica
Banca Examinadora: Marcelo Giannini, Maria Betânia de Oliveira Garcia, Renato Hermann Sundfeld, Mario Alexandre Coelho Sinhoreti, Paulo Henrique dos Santos

Data da Defesa: 24-02-2010
Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata CRISTIANE FRANCO PINTO aprovada.

Prof. Dr. MARCELO GIANNINI

Profa. Dra. MARIA BETÂNIA DE OLIVEIRA GARCIA

Prof. Dr. RENATO HERMANN SUNDFELD

Prof. Dr. MARIO ALEXANDRE COELHO SINHORETI

Prof. Dr. PAULO HENRIQUE DOS SANTOS

Dedicatória

Acima de tudo, obrigada meu **Deus**, por estar presente a cada instante, em todas as dificuldades e todas as alegrias. Sei que só cheguei até aqui porque tive fé e acreditei.

Dedico...

Aos **meus pais Nico e Sueli** que fizeram que eu fosse capaz e mesmo diante das dificuldades não desanimasse. Obrigada por acreditarem no meu sonho e por estarem sempre presentes. Amo muito vocês.

Ao **meu marido e amor da minha vida Eduardo** que mostrou que um sonho sempre pode ser realizado. Obrigada pelo companheirismo e todo amor. Te amo infinito.

Agradecimentos especiais

À minha mãezinha, **Sueli**, companheira e amiga, que com seu jeito carinhoso e seu amor sempre me incentivou.

Ao meu paizão, **Nico,** pelo apoio incondicional que nunca deixou que nada me faltasse.

Ao meu irmão, **Adriano**, minha cunhada **Cris** e minha sobrinha **Lorena**, que sempre me deram apoio e forças para continuar.

Aos meus avós, **Angelina e Olívio**, **Sebastião (in memorian) e Cida** por estarem sempre presentes e por fazerem com que minha vida sempre fosse alegre.

Ao meu marido **Eduardo**, por todo apoio, toda luta e toda alegria que você me traz, a cada dia que passa, te amo infinitamente mais. Obrigada por me mostrar que trabalho e dedicação tornam as nossas vitórias ainda mais especiais.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP**, nas pessoas do seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, e do Diretor Associado Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim, pela oportunidade de realização deste Curso de pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior,** Coordenador do Curso de Pós-graduação da FOP-UNICAMP e ao **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica, pela atenção prestada.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Giannini** pela oportunidade de ingressar na carreira acadêmica. Exemplo de luta, paciência e muita dedicação, faz com que seus orientados sigam sempre pelo caminho do bem. Obrigada por todo ensinamento e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À **Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão de Bolsa Doutorado (Processo # 06/53828-2).

À **University of Illinois at Chicago** pela oportunidade da realização do estágio no exterior.

À Profa. Dra. **Ana Karina Bedran Russo**, pela oportunidade do estágio no exterior. Você é um exemplo de mulher que busca seus ideais e que nos mostra que a determinação torna os sonhos realizados. Obrigada por proporcionar momentos inesquecíveis, por ter me recebido tão bem e com tanta atenção.

Ao **Argonne National Institute** pela utilização do laboratório para realização de parte do experimento no exterior.

Aos companheiros durante o estágio no exterior **Carina, Cristina, Prof. Paulo, Sabrina, Sachin.** Em especial a **Sandrine** por todo apoio, ajuda e companheirismo durante esses meses. Obrigada pela agradável convivência.

À Profa. Dra. **Gláucia Maria Bovi Ambrosano**, pelas análises estatísticas, por toda sua ajuda e pela atenção. Obrigada por ser essa professora tão atenciosa e prestativa, exemplo de mulher.

Ao Prof. **Reginaldo Bruno Gonçalves** pela ajuda na parte microbiológica deste estudo.

Ao **Prof. Anderson T. Hara** pela colaboração na parte experimental no exterior.

Ao **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)** pela utilização Laboratório de Microfabricação. Agradeço aos responsáveis pelo Laboratório de Microfabricação Dr. **Ângelo Luís Gobbi e Maria Helena,** pela disposição em me ajudar.

Ao **Laboratório NAP-MEPA da Esalq -Universidade de São Paulo** pela utilização do Microscópio de Transmissão. **Ao Prof. Dr. E. W. Kitajima** pela disponibilização da utilização do laboratório. Ao aluno de Mestrado **Paulo Vermelho** pelo auxílio nas imagens em Microscopia eletrônica de Transmissão.

Ao **Laboratório de Materiais Dentários da FOP-UNICAMP** pela disponibilização do uso do laboratório durante toda a pesquisa. A aluna de Doutorado **Sandrine Bittencourt Berger** pelo auxílio na parte in situ.

Ao **Laboratório de Microbiologia Oral da FOP-UNICAMP** pela utilização deste durante as análises microbiológicas, ao aluno de doutorado **Sérgio Braga Cruz** pelo auxílio nas análises.

Ao **centro de Microscopia Eletrônica de Varredura** da FOP-UNICAMP e aos funcionários **Adriano e Eliene**, por toda a paciência que tiveram em me ensinar e me auxiliarem nas análises microscópicas.

À todos os meus **voluntários**, sem os quais esse trabalho não se concretizaria.

Aos Professores da minha banca de qualificação, **Prof. Dr. Flávio H. B. Aguiar, Profa. Dra. Vanessa Cavalli Gobbo, Profa. Dra. Vanessa Gallego Arias Pecorari** pelas sugestões que contribuíram com o enriquecimento deste trabalho. Ao **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz** suplente desta banca por ter aceito o convite.

Aos Professores da minha banca de defesa de tese, **Profa. Dra. Maria Betânia de Oliveira Garcia, Prof. Dr. Renato Hermann Sundfeld, Prof. Dr. Paulo**

Henrique dos Santos e Prof. Dr. Mario Alexandre Coelho Sinhoreti pelas correções e pela disponibilização em participar da minha banca e contribuir com meu trabalho.

Aos Professores da área de Dentística, **Prof. Dr. Flávio H. B. Aguiar, Profa. Dra. Giselle Maria Marchi Baron, Prof. Dr. José Roberto Lovadino, Prof. Dr. Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo e Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins ,** pelos ensinamentos e aprimoramento do meu conhecimento em Dentística.

Aos funcionários da Área de Dentística, **Pedro Justino e Mônica**, pela ajuda e companhia indispensáveis em todos esses anos juntos.

Aos meus queridos amigos do Doutorado, **Cecília, Larissa, Murilo, Paulo e Rodrigo**. Obrigada pela agradável companhia e por serem sempre solícitos! Desejo a vocês muito sucesso.

À todos os alunos que foram companheiros durante a minha orientação pelo Prof. Marcelo, em especial meus orientados de iniciação cientifica **Samira, Lilian, Henrique, Carlos Eduardo e Ana Paula**. Aos queridos amigos **Vanessa**

Cavalli, André Reis, César Arrais e Marcelo Tavares por todas as ajudas prestadas e companheirismo durante a pós-graduação.

Agradeço também aos meus colegas de mestrado e doutorado, **Adriano, André Mineiro, Cláudia, Débora, Fernanda, Giulliana, Leonardo, Lucinha, Maria, Marcelo Santista, Marina, Thaiane, Thiago,** aos que já se foram e aos que estão apenas começando...

Às amigas e companheiras de apartamento **Giulliana, Lucinha, Marina e Thaiane** por terem compartilhado todos os momentos em Piracicaba e por terem me ajudado quando precisei. Vocês são pessoas maravilhosas e muito especiais.

À amiga **Giulliana** pelas ajudas no laboratório durante todo meu trabalho, por fazer tudo de coração. Por ter me proporcionado uma verdadeira amizade, que esse laço continue e que nossa amizade continue para sempre. Você é uma pessoa iluminada.

Às minhas queridas amigas **Claudinha e Débora** pelo companheirismo e amizade durante todo curso, pelo apoio durante toda a jornada. Vocês são muito especiais.

Às minhas queridas amigas **Alessandra, Ariane, Ana Cristina e Patrícia Bozola e Priscila Zani** *que sempre se preocuparam comigo e que mesmo distante acompanharam meu crescimento. Vocês são pessoas muito especiais.*

À todos que passaram em minha vida durante a pós-graduação e que direta ou indiretamente me ajudaram na conclusão deste trabalho, muito obrigada de coração...

Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.
(Fernando Pessoa)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar sistemas adesivos, tecidos dentais adjacentes (esmalte ou dentina) às restaurações e a união formada entre os adesivos e as estruturas dentais frente aos desafios cariogênicos *in situ* e *in vitro*. Para o estudo foram utilizados dentes bovinos e blocos dos tecidos dentais (esmalte e dentina) que foram restaurados com dois sistemas adesivos e resina composta. No estudo *in situ*; 11 voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo 2 amostras do grupo controle (substrato hígido sem preparo cavitário) de esmalte e dentina, e 6 amostras restauradas com os sistemas adesivos Clearfil Protect Bond (PB) ou One-Up Bond F Plus (OP) (em fases distintas) e com o compósito Filtek Z350. O desafio cariogênico consistiu de 2 fases (cada fase com um adesivo), sendo cada fase de 14 dias com intervalo de 10 dias entre elas. Os voluntários utilizaram solução de sacarose a 20%, 8X/dia e dentifrício fluoretado 3X/dia. Após cada etapa, o biofilme dental formado foi coletado e analisado. As amostras foram analisadas através de Microscopia de Luz Polarizada (MLP) e Microdureza Knoop para observação da extensão da lesão de cárie. Para o estudo *in vitro* foi realizado o preparo dos substratos e foram restaurados em esmalte e em dentina seguindo os grupos experimentais: 1-adesivo PB sem desafio cariogênico (DC); 2- adesivo PB com DC; 3- adesivo OP sem DC; 4- adesivo OP com DC. A partir dos blocos dentais restaurados foram obtidos espécimes para o ensaio de resistência da união com formato de paralelepípedos (palitos) e fatias para análise da interface da união em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os espécimes (palitos ou fatias) foram submetidos à ciclagem de pH durante 8 dias. O resultado do ensaio de microdureza em esmalte e dentina mostrou maiores valores para PB nas profundidades mais superficiais e as imagens de MLP mostraram uma menor extensão da área de desmineralização para o adesivo PB que para o adesivo OP. Na análise bacteriológica, o adesivo PB levou a menor quantidade de colônias de Streptococcus totais e do grupo mutans em esmalte. A resistência de união não foi afetada pela ciclagem de pH e

foi semelhante em esmalte para ambos adesivos, entretanto, em dentina, o adesivo PB apresentou maior resistência de união que o adesivo OP. Os adesivos produziram hibridização nos tecidos dentais, sem formações de fendas na interface de união. Concluiu-se que o adesivo PB produziu menor extensão de desmineralização dos substratos dentais após o desafio cariogênico e maior microdureza Knoop nas profundidades mais superficiais. Em algumas condições deste estudo, o adesivo PB reduziu a formações de colônias bacterianas. Embora a união formada pelos adesivos em esmalte foi semelhante, o adesivo PB mostrou maior resistência de união em dentina.

Palavras-chave: sistemas adesivos, fluoretos, esmalte dental, dentina.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate adhesive systems, mineralized dental tissues (enamel and dentin) around restorations and the bonding formed by adhesives and dental structures in conditions of cariogenic challenge *in situ* and *in vitro*. This study used dental blocks (enamel/ dentin) from bovine teeth, which were restored with adhesive systems and a resin composite. For the *in situ* study: volunteers (n=11) wore intra-oral appliance containing 2 dental fragments without restoration (enamel or dentin) and six dental blocks with restorations made with self-etching primers Clearfil Protect Bond (PB) or One-up Bond F Plus (OP) (in two phases) and the Filtek Z350 composite: The cariogênico challenge was performed in two phases of 14 days (each phase with one adhesive). The volunteers dropped 20% sucrose solution 8x/day and used fluoridated dentifrice 3x/day. After each phase, the biofilm was collected and analyzed. The samples were analyzed by cross-sectional microhardness and polarized light microscopy (PLM) to determine the demineralization depth. For the *in vitro* study, bovine were prepared and bonded in enamel and dentine with Clearfil Protect Bond (PB) or One-Up Bond F Plus (OP) and restored with Filtek Z-350 composite resin, according to the groups: 1- PB without CC; 2- PB with CC; 3- OP without CC; 4- OP with CC. Restored teeth were sectioned in order to obtain sticks for microtensile bond strength or slabs for transmission electron microscopy. The specimens were submitted to pH-cycling, which consisted of DE (8h/day) and RE (16h/day) cycles at 37ºC during 8 days. Microhardness analysis showed that the enamel and dentin around restorations PB had higher values in superficial depths, and the PLM showed that PB resulted in lower demineralization depth than OP. The biofilm investigation indicated that PB produced lower number of bacterial colony of Streptococcus totais and *mutans* in enamel. The results showed that the pH-cycling regimen did not affect the bond strength to enamel or dentin for both adhesives; however, the bond strength to dentin was higher for PB. The adhesives produced hybridization and no gaps formation in both dental tissues. In conclusion, PB adhesive may

result in lower enamel demineralization around restoration and higher microhardness in superficial depths. In some conditions, PB adhesive reduced the number of bacterial colony. Although the adhesives in enamel formed similar bonded interfaces, PB produced higher bond strength to dentin than OP.

Key-words: adhesive systems, fluoride, dental enamel, dentin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ---------- 01

2 REVISÃO DE LITERATURA---------- 03

3 PROPOSIÇÃO ---------- 15

4 MATERIAL E MÉTODOS ---------- 16

5 RESULTADOS---------- 36

6 DISCUSSÃO ---------- 51

7 CONCLUSÃO---------- 60

REFERÊNCIAS ---------- 61

ANEXOS---------- 76

1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas autocondicionantes de dois passos, o *primer* funciona como condicionador dental, infiltrando-se ao mesmo tempo nas estruturas mineralizadas. A habilidade dos sistemas adesivos que empregam *primers* autocondicionantes em promover união efetiva e duradoura ao esmalte dental tem sido um tópico controverso dentro da Odontologia Restauradora (Shimada *et al.,* 2003). Tal controvérsia tem sido atribuída à alta hidrofilia e menor "agressividade" dos monômeros ácidos quando comparados à técnica adesiva com separado ataque ácido. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado valores de resistência de união similares entre adesivos autocondicionantes e convencionais, embora a união dos autocondicionantes seja formada no nível nanométrico (Shimada *et al.,* 2002, 2003; Perdigão *et al.,* 1997; Hashimoto *et al.,* 2003; Cardoso *et al*., 2002; Ibarra *et al.,* 2002, Hannig *et al*., 2002).

Apesar de duvidosa ao esmalte, a união estabelecida em dentina pelos adesivos autocondicionantes de 2 passos tem sido considerada efetiva quanto à durabilidade (De Munck *et al*., 2003; Van Meerbeck *et al.,* 2003). Os sistemas adesivos têm sido utilizados para produzir união dos materiais restauradores às estruturas dentais, selando a interface dente-restauração. Devido a sua posição estratégica na restauração, muitas vezes o desempenho clínico da união reflete a indicação de substituição, reparo ou manutenção da restauração. Além do desempenho clínico estabelecido para os agentes de união, a composição desses materiais tem sido modificada para propiciar efeitos adicionais, com características anticariogênicas e antibacterianas.

Entretanto, pouco se sabe a respeito do efeito destes sistemas restauradores no controle da cárie dental. Sabe-se que a falta ou a perda da adesão aos tecidos dentais produz os primeiros danos ao elemento dental restaurado, pois ocorre o comprometimento do selamento marginal da restauração. A partir da infiltração marginal, facilita-se o desenvolvimento de cárie

recorrente, que pode ocorrer na superfície e/ou na parede interna da cavidade (Asmussen *et al.,* 1998).

Devido à alta freqüência de cáries recorrentes após o tratamento restaurador principalmente em dentina (Mijör, 1996; Wilson *et al*., 1997), muita atenção tem sido dada ao efeito terapêutico dos materiais restauradores diretos. A remineralização pela liberação de fluoretos é representativa, mas o efeito antibacteriano é uma propriedade importante, pois a inativação da bactéria representa uma estratégia direta para controlar a cárie dental (Imazato, 2003).

Alguns sistemas adesivos apresentam fluoreto, e mais recentemente brometo na formulação do monômero MDPB, resultado de uma linha de pesquisa de Imazato e McCabe (1994). A introdução do fluoreto está relacionada com a importância desse componente durante os processos de des- e remineralização (Featherstone *et al.,* 1986). O radical brometo foi inserido na molécula do monômero do adesivo com a finalidade de atuar como componente antibacteriano (Imazato *et al.,* 1994, 1999, 2001, 2003), efeito que ocorre através da desinfecção da cavidade e da inativação da bactéria (Imazato *et al.* 2003b).

Segundo Çehreli *et al.* (2003), os adesivos autocondicionantes são capazes de produzir efeito antibacteriano *in vitro* em dentina. Outro estudo (Itota *et al*., 2002) mostrou que a combinação de adesivos e materiais restauradores contendo fluoreto podem ser utilizados para inibir cáries secundárias. Estudos *in vitro* (Nagamine, 1997; Ten Cate & Van Duimim, 1995) mostraram que materiais contendo fluoreto são efetivos para inibição de cárie secundária. Além disso, pesquisas mostraram que o fluoreto pode inibir o metabolismo de muitos microorganismos (Hamilton & Bowden, 1988), reduzindo o transporte de açúcar, da atividade glicolítica e da tolerância ácida de muitas espécies Gram Positivas (Marsh & Bradshaw, 1990). Diante destes aspectos são necessários estudos objetivando observar a efetividade destes materiais dentro da Odontologia Restauradora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Os substratos dentais

2.1.1- Esmalte dental

O esmalte dental é o tecido mais mineralizado do corpo humano (Gwinnett, 1967) e é constituído de 96% de componentes minerais e 4% de material orgânico e água (Sharawy & Yager, 1989). O conteúdo inorgânico é de fosfato de cálcio cristalino conhecido como hidroxiapatita, que também é encontrado nos ossos, na cartilagem calcificada, na dentina e no cemento (Sharawy & Yager, 1989). A parte orgânica é composta por proteínas denominadas de enamelinas que ocupam os espaços entres os cristais (Ten Cate, 1994).

O esmalte é formado por estruturas em formato de fechadura denominadas de prismas (Meckel *et al*., 1965). Os prismas tem uma largura media de 5 µm e próximo à dentina não existem prismas. O esmalte aprismático também ocorre nos 30 µm mais superficiais do esmalte de todos os dentes decíduos e no terço gengival do esmalte dos dentes permanentes (Gwinnett, 1967).

Devido ao alto conteúdo inorgânico, a dureza do esmalte, expressa em relação à deformação, varia entre 200 a 500 Knoop sendo um tecido extremamente duro (Cadwell *et al*., 1957). O esmalte apresenta um alto módulo de elasticidade e uma resistência à tração relativamente baixa, mostrando-se ser uma estrutura friável (Tyldesley, 1950), com necessidade da proteção dentinária resiliente.

O esmalte dental bovino possue um padrão de orientação dos prismas de esmalte semelhante ao esmalte humano (Reis *et al*., 2004), podendo ser utilizado em pesquisas cientificas em substituição aos dentes humanos.

2.1.2- Dentina

A dentina é um complexo biológico hidratado cuja composição e propriedades variam com a localização. A dentina é modificada por processos fisiológicos e patologias criando diferentes formas desse tecido. A dentina primaria é formada durante o desenvolvimento dental. É composta de cerca de 50% de mineral na forma de carbonato, apatita e 30% de material orgânico, sendo a maior parte de colágeno do tipo I. Apresenta cerca de 20% de fluidos, similares ao plasma (Mjor & Fejerskov, 1979) e outras proteínas não-colagenosas e outros componentes orgânicos que estão presentes em menor quantidade (Marshall Jr *et al*., 1997).

Os túbulos dentinários representam faixas deixadas pelas células odontoblásticas. A densidade dos túbulos e orientação varia com a localização. O numero de túbulos é menor na junção amelo-dentinaria e maior próxima a câmara pulpar. Uma baixa densidade de túbulos é encontrada na raiz. Os túbulos são separados pela dentina intertubular composta de matriz colagenosa do tipo I reforçado por apatita. A quantidade de dentina também varia com a localização. Os cristais de apatita são menores do que os encontrados no esmalte e contem 4-5% de carbonato (Marshall Jr *et al*., 1997).

A dentina secundária resulta em gradual estreitamento da polpa e é caracterizada pela sua estrutura tubular regular que é similar a dentina primária, com uma mudança na orientação dos canalículos (Ten Cate, 1994).

A dentina terciária, também chamada de reparativa ou reacional (Cox *et al*., 1992) é depositada em áreas localizadas dentro da câmara pulpar como resultado de uma injúria, como abrasão ou cárie. Parece ser uma resposta protetora e com estrutura pouco regular, com poucos ou nenhum túbulo alinhado (Avery, 1990; Marshall Jr *et al*., 1997).A dentina esclerótica é usada para referir-se a dentina que teve a mineralização alterada como resultado de um processo carioso ou trauma (Marshall Jr *et al*., 1997).

2.2- A lesão de cárie

2.2.1- Cárie em esmalte

O biofilme e o açúcar são respectivamente necessários e determinantes para manifestação da doença cárie. A bactéria precisa se acumular sobre a superfície dental e ser freqüentemente exposta a uma dieta cariogênica (Cury & Tenuta, 2009).

Em condições fisiológicas, os fluidos orais (saliva) tem cálcio e fosfato em concentrações supersaturadas em relação á composição mineral do esmalte. Portanto, os íons são constantemente depositados na superfície do esmalte ou nas áreas do esmalte onde são perdidas (Cury & Tenuta, 2009).

A desmineralização ou remineralização do esmalte é um processo físico-químico, que ocorre quando bactérias orais formam um biofilme na superfície do esmalte e este é exposto a carboidratos fermentáveis diariamente, sendo a sacarose o mais cariogênico. O açúcar penetra no biofilme e é convertido em ácidos pelo metabolismo bacteriano, a saliva fica subsaturada em relação ao esmalte e ocorre a desmineralização. Quando o pH é restabelecido e as condições de supersaturação são restauradas, certa quantidade de mineral perdido pode ser reposto no esmalte, obtendo assim, a remineralização do esmalte. Isto ocorre por ação da saliva e pela remoção do biofilme com a escovação (Cury & Tenuta, 2009).

Atualmente, sabe-se que, a ação do fluoreto é local interferindo com o processo de cárie (Cury & Tenuta, 2008). Se o fluoreto está presente no fluído do biofilme e o pH é menor que 4,5, ocorre a saída de certos íons do esmalte, enquanto acontece a incorporação de íons fluoreto. Isso resulta numa diminuição da dissolução do esmalte em desafios cariogênicos, mesmo com certa quantidade de cálcio e fosfato da hidroxiapatita perdidos. Este ganho mineral de fluoreto durante a queda de pH não é considerado remineralização, mas a importância do

fluoreto é no controle e redução da desmineralização (Cury & Tenuta, 2009). Se o esmalte desmineralizado é limpo pela escovação, a saliva é capaz de remineralizá-lo (Edgar & Higham, 1995), mas na presença do fluoreto este efeito é aumentado (Dijkman *et al.,* 1990).

2.2.2- Cárie em dentina

A cárie em dentina é classicamente descrita como uma estrutura de várias camadas alteradas, com a camada mais externa de cárie denominada de camada infectada. Além dessa, tem-se a camada interna de cárie e a camada de dentina afetada. Na camada externa, a maior parte da estrutura é obliterada, mas na camada interna pode haver um número de zonas chamadas por Fusayama (Marshall Jr *et al*., 1997) de camada descolorida, a zona transparente e a zona subtransparente. Presumi-se que há uma dentina inalterada abaixo da camada subtransparente. A dentina transparente é esclerótica ou mais dura que a dentina normal, é hipermineralizada devido à oclusão dos túbulos e age como uma barreira para a penetração de substâncias (Avery, 1990). Ogushi e Fusayama (1975) mostraram diferenças básicas entre as camadas internas e externas de dentina cariada. Estruturas de bandas cruzadas de colágeno permanecem na camada interna, mas não na externa, essas estruturas são essenciais para a remineralização (Marshall Jr *et al*., 1997).

2.3- Adesão ao substrato dental

Desde o sucesso de Buonocore em 1955, no processo de adesão ao esmalte dental (Buonocore *et al*., 1955), muitas pesquisas tem sido realizadas para o desenvolvimento de um agente de união com excelência em adesão e longevidade clínica (Breschi *et al*., 2007). Os sistemas adesivos atuais interagem com o substrato utilizando duas diferentes técnicas ou estratégias. A primeira

consiste na remoção total da *smear layer* (técnica de ataque ácido prévio ou separado) com remoção mineral da superfície de 4 a 10 µm em profundidade. A segunda dissolve parcialmente a *smear layer* e a incorpora na formação da hibridização (técnica autocondicionante) (Tay & Pashley, 2002; Van Meerbeek *et al*., 2003).

2.3.1- Adesivos autocondicionantes

A técnica de agentes autocondicionantes consiste na simultânea desmineralização e infiltração de monômeros ácidos nos tecidos dentais através da smear layer (Breschi *et al*., 2007). Os adesivos autocondicionantes podem ser de dois passos ou de passo único dependendo se o *primer* ácido é separado do agente hidrofóbico ou combinado ao adesivo, permitindo um procedimento simplificado (Van Meerbeek *et al*. 2003).

Recentes achados mostraram que os adesivos autocondicionantes de dois passos (com acidez moderada e pH próximo 2), podem estabilizar as cadeias químicas entre carbonos específicos ou grupos fosfatos de monômeros funcionais e cristais de hidroxiapatita residuais ainda presentes no colágeno (Yoshida *et al*., 2004). Esta interação com os monômeros adesivos no substrato descalcificado leva a um aumento na estabilidade da união através do tempo (De Munck *et al*., 2003).

2.3.2- Componentes dos sistemas adesivos

Os sistemas adesivos são formados por diversos compostos, como monômeros resinosos, fotoiniciadores, água ou outros solventes, partículas de carga e pigmentos.

Para assegurar uma boa ligação covalente entre adesivo e resina, os adesivos contem monômeros resinosos que são similares aos dos materiais

restauradores. Os metacrilatos são os mais comuns, sendo pouco sensíveis a inibição pelo oxigênio, mas são vulneráveis a degradação (Van Landuyt *et al*., 2007).

O monômero HEMA é um monômero pequeno com boa biocompatibilidade, mas quando o polímero não está polimerizado é altamente alergênico. Este monômero é diluído em água, etanol ou acetona, mas só é capaz de evaporar-se em pequena quantidade (Van Landuyt *et al*., 2007). Devido à característica de hidrofilicidade, este monômero promove uma adesão excelente com o molhamento da dentina, com altos valores de resistência de união (Nakaoki *et al*., 2000).

O monômero Bis-GMA possui alto peso molecular e baixa contração de polimerização, promovendo a formação de um polímero com boas qualidades mecânicas (Peutzfeldt, 1997).O MDPB é um monômero patenteado pela Kuraray que foi sugerido por Imazato e McCabe (1994), que contem um componente antibacteriano denominado brometo dodecilpiridíneo. O mecanismo do efeito antibacteriano acredita-se ser devido à ligação catiônica e hidrofílica com os componentes da parede celular que destroem a função da membrana e, subseqüentemente, induzem ao vazamento do material citoplasmático (Scheie, 1989; Kourai *et al*., 1994). Embora a maioria dos monômeros funcionais seja hidrófila, essa molécula é altamente hidrófoba (Van Landuyt *et al*., 2007).

O monômero 10-MDP foi sintetizado pela Kuraray e utilizado em adesivos autocondicionantes, devido ao grupo de dihidrogenofosfato, que pode dissociar-se em água para formar dois prótons (Hayakawa *et al*., 1998). Estruturalmente, apresenta uma longa cadeia de carbonos que faz desse monômero um componente hidrófobo. Como conseqüência, os solventes mais apropriados são o etanol e a acetona. O 10-MDP é relativamente estável a hidrólise, mantendo a água à distância (Van Landuyt *et al*., 2007). Yoshida *et al.* (2004) mostrou que este monômero é capaz de formar cadeias iônicas fortes com o cálcio resultando em sais de cálcio na camada híbrida. Como Clearfil Protect

Bond contém 10-MDP, os resultados favoráveis podem ser atribuídos a intensa adesão química com o tecido dental (Van Landuyt *et al*., 2007).

MAC10 (11-metacriloixi-10 ácido decanodicarbolixílico) é um monômero ácido encontrado nos produtos da empresa japonesa Tokuyama. Poucas informações na literatura são encontradas, mas as propriedades podem ser deduzidas através da sua estrutura química. Como o 10-MDP, o MAC10 consiste de uma longa cadeia de carbonos, fazendo com que este monômero também seja hidrófobo e refletindo na sua limitada dissolução em água (Van Landuyt *et al*., 2007).

Componentes antibacterianos têm sido adicionados aos sistemas adesivos com intuito de prevenir a recorrência de cárie. Um exemplo destes componentes é a presença do brometo no monômero MDPB como citado anteriormente. Outros componentes podem ser citados, como os fluoretos descritos posteriormente e os parabenos presentes no adesivo Adper Prompt-L Pop da empresa 3M-ESPE (Van Landuyt *et al*., 2007).

Alguns fabricantes adicionam corantes ao adesivo autocondicionante (One-Up Bond F Plus- Tokuyama, Tyrian SPE- Bisco), com o objetivo de melhorar a visualização da mistura dos componentes e sua aplicação (Van Landuyt *et al*., 2007).

As partículas de carga podem ser adicionadas por diversas razões. Alguns autores defendem que a adição de carga pode aumentar a resistência da camada híbrida e do adesivo (Kim *et al*., 2005). Os fabricantes freqüentemente adicionam carga para modificar a viscosidade dos adesivos (Van Landuyt *et al*., 2007).

O tamanho das partículas de carga é o fator principal para as partículas penetrarem nos túbulos dentinários. Após o ataque ácido, os espaços interfibrilares do colágeno sem o mineral ao seu redor é de aproximadamente 20 nm, por isso as partículas devem ter tamanho menores que essa medida. Por isso, a sílica coloidal de tamanho nanométrico é a partícula mais utilizada (Van Landuyt *et al*., 2007).

Os sistemas adesivos podem conter fluoreto em várias formas como sais inorgânicos, vidros ou fluoreto orgânico. No entanto, não somente a quantidade de liberação de fluoreto, mas o tipo e tamanho das partículas fluoretadas, a solubilidade do material podem ser importantes fatores que contribuem para a liberação de fluoreto. Essa liberação aumenta com a hidrofilicidade e as características ácidas dos monômeros (Wiegand *et al.*, 2006). Três diferentes abordagens para o desenvolvimento de materiais que liberam fluoreto têm sido discutidas incluindo a adição de sais solúveis como o NaF ou SnF_2 (Clearfil Protect Bond), sistemas com partículas de carga que liberam fluoreto ou fluoreto ligado a matriz (Arends *et al.,* 1995). A incorporação de fluoreto inorgânico, como o NaF adicionado ao adesivo PB, tem resultado no aumento da liberação de fluoretos. A dispersão dos vidros lixiviáveis ou sais solúveis de fluoretos no monômero permitem a difusão dos fluoretos solúveis em água do material para o meio local. O fluoreto é liberado durante e após a reação de polimerização, seguida por uma pequena quantidade de fluoreto liberado ao longo do tempo (Wiegand *et al.*, 2006).

Vidros de silicato contendo fluoretos são muitas vezes adicionados com a intenção de liberar fluoretos, como presentes no adesivo One-Up Bond F Plus. Sabe-se que os monômeros ácidos funcionam na água como doadores de prótons, que podem reagir com o fluoraluminosilicato seguido por uma típica reação ácido-base do cimento de ionômero de vidro. Subseqüentemente, a adesão química entre o fluoroaluminosilicato e a resina pode ser formada e o fluoreto liberado (Van Landuyt *et al.*, 2007).

2.4- Efeito dos materiais restauradores diretos

Devido à alta freqüência de cárie recorrente após o tratamento restaurador, principalmente, em dentina (Mijör, 1996; Wilson *et al.*, 1997), muita atenção tem sido dada ao efeito terapêutico dos materiais restauradores diretos. A remineralização pela liberação de fluoretos é representativa, mas o efeito

antibacteriano é uma propriedade importante porque a inativação da bactéria representa uma estratégia direta para eliminar uma das causas da cárie dental (Imazato, 2003), tendo em vista que a carie é uma doença multifatorial.

Sistemas adesivos apresentam fluoreto e, mais atualmente, brometo na forma de MDPB em sua composição (Imazato e Mc Cabe, 1994). A introdução do fluoreto está relacionada com a importância desse componente durante os processos de desmineralização e remineralização como descrito anteriormente (Featherstone *et al.,* 1986). O brometo foi inserido na molécula do monômero do adesivo com a finalidade de atuar como componente antibacteriano (Imazato *et al.,* 1994, 1999, 2001, 2003a, 2003b, 2005), agindo na desinfecção da cavidade e da inativação da bactéria (Imazato, 2003).

2.5- Estudo *in vitro* através de 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; Herkstroter *et al*., 1991). Nesse modelo, lesões subsuperficiais com 100 μm a 250 μm de 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).

Para esse modelo, o substrato dental é exposto a volumes previamente calculados de solução ácida tamponada (Featherstone *et al*., 1986; Shinkay *et al*., 2001), contendo quantidades conhecidas de íons cálcio, fosfato e, algumas vezes, fluoreto (Vieira *et al*., 2005), durante um período curto, geralmente 3 a 6 horas, dependendo da proposta do estudo (Ten Cate & Duijsters, 1982; Featherstone *et al*., 1986; White, 1995). A substituição dessa solução pode ser diária ou em intervalos de tempo 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).

Como se sabe do potencial cariostático do fluoreto, as ciclagens de pH passam por diversas modificações para tentar comprovar sua eficácia. Para a análise do efeito do fluoreto na remineralização do esmalte, a adição de fluoreto nas soluções desmineralizante e remineralizante, pode proporcionar um modelo de ciclagem eficaz na simulação do desenvolvimento de cárie (Vieira *et al.*, 2005). Assim, o íon fluoreto pode ser utilizado de maneiras associadas durante ciclagens de pH. Além disso, o dentifrício fluoretado pode determinar uma menor perda mineral (Hara *et al*., 2002) e, quando associado aos bochechos de fluoreto de sódio, obtém-se uma completa proteção contra a desmineralização (Featherstone *et al*., 1986).

Os materiais restauradores também podem conter fluoretos em sua composição, como os materiais ionoméricos e, mais recentemente, introduzidos nos sistemas adesivos (Imazato & Mc Cabe, 1994). Estudos mostram que o cimento de ionômero de vidro é capaz de inibir a desmineralização da dentina adjacente à restauração (Hara *et al*., 2005, Cenci *et al*., 2009). A alta liberação de fluoreto nos materiais ionoméricos pode resultar em um aumento superficial na remineralização da dentina desmineralizada (Exterkate *et al*., 2005). Para restaurações realizadas em resina composta, durante ciclagens de pH não se observaram efeito cariostático (Serra & Cury, 1992; Serra*,* 1995; Hara *et al*., 2002).

Os adesivos que contem fluoretos em sua composição provocam um efeito adicional benéfico induzido pelo fluoreto na inibição da desmineralização em casos de microinfiltração (Ithagarun *et al*., 2001). Estes adesivos são efetivos na prevenção da lesão de parede, mas exibem pouca inibição da lesão (Itota *et al*., 2002). Estudos comprovam a eficácia destes adesivos na liberação de fluoretos (Hara *et al*., 2005, Itota *et al*., 2002), porém eles não são capazes de inibir o desenvolvimento da cárie secundária como os cimentos de ionômero de vidro (Hara *et al*., 2005; Lobo *et al*., 2005; Peris *et al*., 2007; de Carvalho *et al.,* 2009),

embora ocorra uma menor perda mineral no substrato ao redor das restaurações (de Carvalho *et al.,* 2009). Quando se verifica a capacidade destes adesivos de inibir o crescimento bacteriano, resultados positivos vem sendo encontrados (Walter *et al.,* 2007; Walter *et al*., 2008).

2.6-Estudos *in situ* através de alto desafio cariogênico

Modelos de estudo intra-orais são utilizados para a compreensão do equilíbrio dinâmico da desmineralização e da remineralização entre os dentes e fluidos circundantes (Koulorides & Chien, 1992) e para a eficácia dos fluoretos na prevenção da cárie (Koulorides *et al*., 1974, Dijkman, Benelli *et al*., 1993). Modelos *in situ* relacionam os estudos laboratoriais à experiência clínica e podem ser considerados mais realistas que modelos *in vitro* (Ten Cate, 1992). Quando materiais restauradores são inseridos no meio oral, suas superfícies são também expostas aos fluidos bucais, a mudanças de pH, ao biofilme dental, ao potencial abrasivo de comidas e bebidas e à abrasão por escovação. Portanto, os modelos de estudo *in situ* podem ser utilizados como um método pré-clínico para avaliar as propriedades físicas, químicas e mecânicas dos materiais antes de sua inserção na cavidade restauradora ou para analisar seus comportamentos quando inseridos na cavidade bucal (Basting *et al*., 2002).

A presença de sacarose é fundamental para o desenvolvimento de cárie *in situ*. A solução de sacarose a 20% apresenta maior cariogenicidade quando comparada à solução de glicose a 10% associada à frutose a 10% gotejada oito vezes ao dia. Isso ocorre devido à maior concentração de polissacarídeos extracelulares, promovendo uma maior perda mineral e, conseqüentemente, uma maior extensão da lesão de cárie (Cury *et al*., 2000).

As freqüências de exposição aos carboidratos também interferem na determinação do desafio cariogênico. Quando blocos de esmalte são expostos à

sacarose a 20% 8 vezes ao dia, promovem uma menor concentração de F, P e Ca, 3 vezes mais glucanos insolúveis e uma maior perda mineral quando comparados à freqüência de 2 a 4 vezes ao dia (Cury *et al*, 1997; Cury *et al*., 2001). O uso do dentifrício fluoretado também é capaz de modificar o desafio cariogênico. De acordo com Cury (2001), a eficácia do flúor é maior quanto menor a perda mineral. Desse modo, a eficiência do dentifrício fluoretado assenta-se na regularidade de escovação, uma vez que o flúor interfere na dinâmica do processo de cárie. Assim, ao mesmo tempo em que a placa dental é desorganizada periodicamente, diminuindo seu potencial patogênico, o flúor ajuda a saliva a repor os minerais perdidos ao dente (Cury, 2001). Essa associação promove uma menor perda mineral quando comparados ao uso de dentifrícios não fluoretados (Murrer *et al*.,1994; Nobre dos Santos *et al*., 1998).

O uso de materiais restauradores que liberam fluoreto, como os cimentos de ionômero de vidro, promove um aumento na concentração de flúor no biofilme dental (Benelli *et al*., 1993; Tenuta *et al*., 2005; Cenci *et al*., 2009) e uma menor quantidade de *Streptococcus mutans* formados (Benelli *et al*., 1993). Observa-se, também, uma maior concentração de fluoreto ao redor de restaurações com cimentos de ionômero de vidro (Yamamoto *et al*., 2005, Tenuta *et al*., 2005). A dureza dos tecidos dentais ao redor de materiais ionoméricos aumenta quando comparada às restaurações em resinas compostas, sugerindo apresentarem um potencial anticariogênico (Basting *et al*., 2002; Tenuta *et al*., 2005) e promovendo uma menor perda mineral (Yamamoto *et al*., 2005). Quando se utiliza adesivos contendo fluoreto e brometo promove-se uma menor desmineralização ao redor das restaurações (Pinto *et al*., 2009).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos do uso de sistemas adesivos autocondicionantes contendo fluoretos na união e nos tecidos dentais adjacentes (esmalte dental e dentina) em condições orais com alto risco à cárie dental após desafio cariogênico *in situ* e *in vitro.*

No estudo *in situ* foram avaliados:

1- A microdureza longitudinal Knoop do esmalte e dentina ao redor das restaurações;

2- A extensão/profundidade da desmineralização do esmalte e dentina próxima às restaurações de compósitos, utilizando microscopia de luz polarizada;

3- A microbiota de Streptococcus totais e do grupo *mutans* e Lactobacilos formados sobre os blocos dentais restaurados ou não.

No estudo *in vitro* foram avaliados:

1- A resistência de união por micro-tração dos adesivos em esmalte e dentina, sendo os espécimes submetidos ou não a ciclagem de pH. O padrão de fratura dos espécimes testados foi analisado de acordo com o grupo experimental;

2- A área de união resina-esmalte ou dentina para ambos adesivos estudados, utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Capítulo I - Experimento *in situ*

Delineamento do estudo

Delineamento experimental: inteiramente ao acaso em esquema fatorial 9X2X3.
Unidades experimentais: 11 voluntários.
Fatores em estudo:
Sistemas adesivos, em 2 níveis: One-Up Bond F Plus e Clearfil Protect Bond;
Profundidade em relação à superfície, em 9 níveis: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 µm;
Distância da restauração, em 3 níveis: 60, 160 e 260 µm.
Variáveis de resposta:
Microdureza Knoop;
Extensão da desmineralização;
Quantidade de Streptococus totais; S. *mutans* e Lactobacilus.

Obtenção e secção das amostras e preparo cavitário

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Anexo 1).

Para este estudo foram utilizados 112 incisivos bovinos, obtidos junto ao frigorífico Angelelli (Santa Teresinha – Piracicaba, SP, Brasil). Os dentes bovinos foram limpos através de raspagem para remoção de restos teciduais com curetas periodontais Duflex (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a profilaxia foi feita com pedra-pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água utilizando escovas de Robinson (KG Soresen, Barueri, SP, Brasil) montadas em contra-ângulo em baixa rotação (Kavo do Brasil, Joinville, SC, Brasil). Após a limpeza os

dentes foram selecionados, excluindo os dentes com presença de trincas, e armazenados à temperatura ambiente em timol 0,1% pH 7 (Hara *et al.*, 2004), durante 30 dias para desinfecção.

As amostras de dentina e esmalte (dimensões 5 X 5 X 3 mm) foram obtidas por secção com disco diamantado (11-4243, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) a partir de 112 dentes incisivos bovinos. Nessa amostras foram realizados preparos cavitários circulares com dimensões de 2 X 2 mm (diâmetro e profundidade) que foram confeccionados com pontas diamantadas 3097 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em alta rotação (Kavo do Brasil, Joinville, SC, Brasil) e com refrigeração spray ar/água tanto para esmalte, quanto para dentina (Figura 1).

Esterilização, aplicação dos sistemas adesivos e restauração das amostras

As amostras foram esterilizadas em autoclave (Odontoplas, São Paulo, SP, Brasil) à 121º C durante 20 minutos. Os sistemas adesivos Clearfil Protect Bond (Kuraray Medical Inc., Kurashiki, Japão) e One-Up Bond F Plus (Tokuyama, Tokyo, Japão) foram aplicados de acordo com as instruções dos fabricantes (Tabela 1 e 2). Em seguida, foi aplicada a resina composta Filtek Z350 (3M ESPE St. Paul, MN, EUA) (Tabela 1), com auxílio de uma espátula de inserção nº 1 (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) pela técnica incremental horizontal (Reis *et al.,* 2003; Santos *et al*., 2004) com dois incrementos de 1 mm cada. Cada camada foi fotoativada por 20 segundos com intensidade de luz 550 mW/cm^2 (Curing Light XL 3000, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). Em seguida, foi realizado o acabamento inicial com discos de óxido de alumínio (Sof-lex 3M ESPE St. Paul, MN, EUA). Após 24 horas, foram realizados o acabamento final e o polimento das restaurações com discos sequênciais impregnados com óxido de alumínio (Sof-lex 3M ESPE St. Paul, MN, EUA). Após o polimento, as margens das restaurações

foram observadas em lupa estereoscópica (MEIJI 2000, MEIJI TECHNO, Tokyo, Japão) para verificar possíveis remanescentes ou excessos de material restaurador além da cavidade (Figura 2 e Figura 3). Essas amostras foram inseridas na mesma sequência nos dispositivos palatinos após 24 horas do acabamento e polimento. Vale ressaltar que todas as amostras foram restauradas 48 horas antes do início do experimento e permaneceram em 100% de umidade relativa (TFA, Haar-Synth-Hygro).

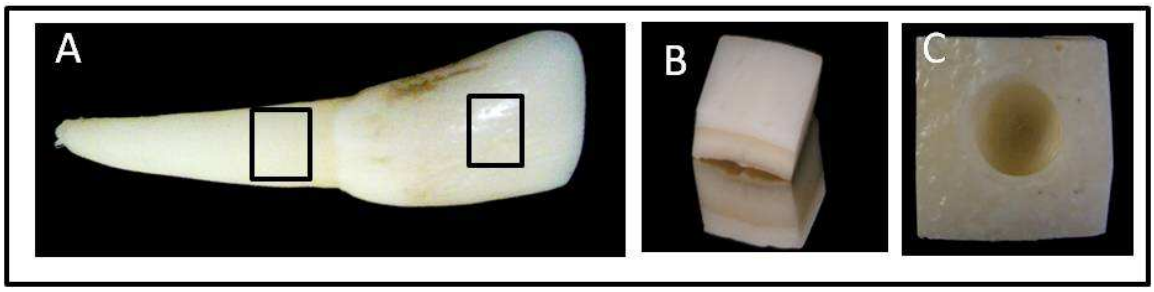


Figura 1- A- Dente bovino com as delimitações das regiões (esmalte/dentina radicular) a serem seccionadas para a obtenção dos blocos dentais. **B-** Bloco dental; **C-** Preparo cavitário (2mm de diâmetro X 2 mm de profundidade).

Tabela 1- Materiais utilizados no estudo descrevendo o fabricante, composição e número do lote.

Abreviatura	Material (Fabricante)	*Bonding A*	Bonding B	nº lote
OP	One-up Bond F Plus (Tokuyama, Tokyo, Japão)	MAC 10, fotoiniciador, metacriloalquilfosfato acido, monomeros multifunctional acrilico	MMA, HEMA, água, fluoroaluminiosilicato, fotoiniciador	555
		Primer	**Adesivo**	
PB	Clearfil Protect Bond (Kuraray Medical Inc., Kurashiki, Okayama, Japão)	MDPB, MDP, HEMA,dimetacrilato hidrofilo, fotoiniciador e água	MDP, HEMA, Bis-GMA, dimetacrilato hidrófilo, fotoiniciador, silica coloidal, NaF	00042A
Z 350	Filtek Z350 (3M-ESPE) Cor A2	Carga, bisfenol A polietienoglicol diéter dimetacrilato, diuretano dimetacrilato, bisfenol a di-glicidil éter dimetacrilato, trietilenoglicol dimetacrilato e pigmento		7GL/ 7HL

(HEMA: 2-hidroxietilmetacrilato; Bis-GMA: bisfenol-A glicidil metacrilato; MDP: 10 – metacriloxidecil di-hidrigênio fosfato; PAA: copolímero do ácido polialquenóico; MAC 10- 11 metacriloiloxi-10 ácido decanodicarboxilico).

Tabela 2- Aplicação dos sistemas adesivos segundo orientações dos fabricantes.

Adesivos (Fabricantes)	Aplicação segundo instruções dos fabricantes
One-Up Bond F Plus (Tokuyama)	Misturar uma gota de cada frasco. Aplicar com um pincel. Aguardar por 20 segundos. Fotopolimerizar por 10 segundos.
Clearfil Protect Bond (Kuraray)	Aplicar o *primer* por 20 segundos nas estruturas dentais secas. Secar com um jato de ar. Aplicar o *bond*. Aplicar um leve jato de ar. Fotopolimerizar por 10 segundos.

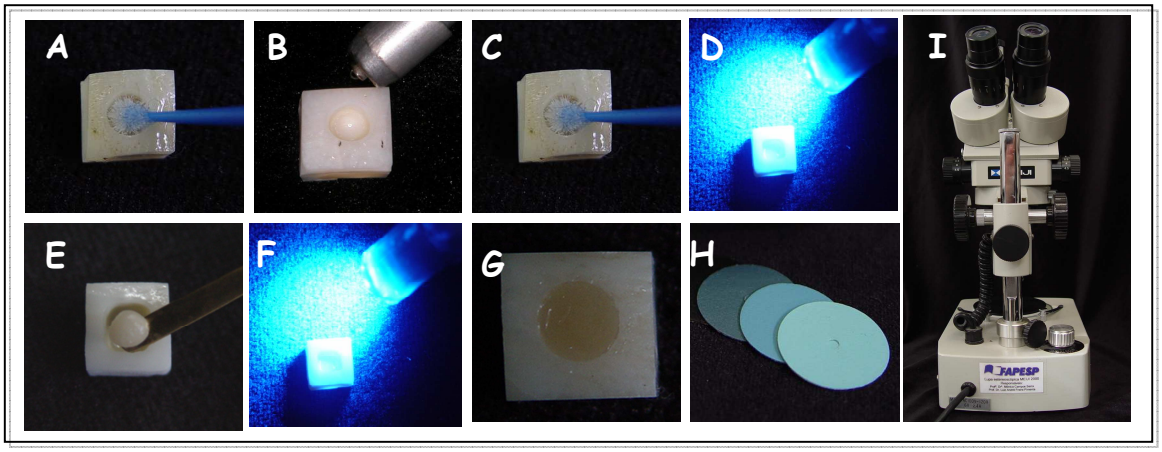


Figura 2- Aplicação do sistema adesivo Clearfil Protect Bond segundo as recomendações do fabricante. **A-** Aplicação do *primer* (20s); **B-** leve jato de ar; **C-** aplicação do adesivo; **D-** fotopolimerização (10s); **E-** inserção do material restaurador; **F-** fotopolimerização; **G-** restauração finalizada; **H-** sistema para acabamento e polimento Sof-lex (3m-ESPE); **I-** Lupa estereoscópica. O mesmo procedimento foi realizado em esmalte e em dentina.

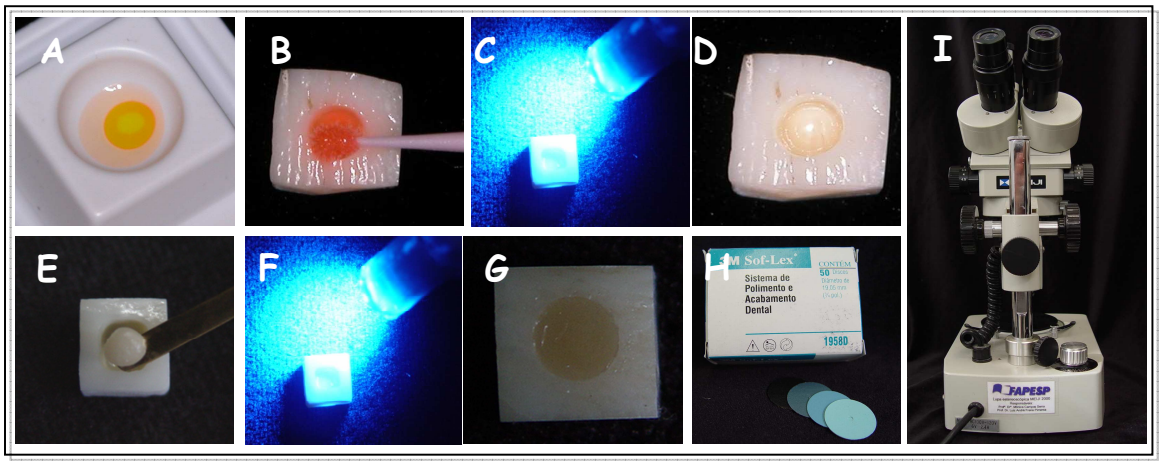


Figura 3- Aplicação do sistema adesivo One-up Bond F Plus. **A-** Mistura do *bonding* A e do *bonding* B; **B-** aplicação do sistema adesivo; **C-** fotopolimerização; **D-** adesivo polimerizado; **E-** inserção do material restaurador; **F-** fotopolimerização; **G-** restauração finalizada; **H-** sistema para acabamento e polimento Sof-lex (3M-ESPE); **I-** Lupa estereoscópica. O mesmo procedimento foi realizado em esmalte e dentina.

Fase clínica

Foram selecionados 17 voluntários adultos para participarem desta pesquisa, de acordo com a contagem de S. *mutans* (>10^5 ufc/mL de saliva, de acordo com Köhler e Bratthall, 1979) e determinação do fluxo salivar não estimulado (mínimo de 0,2 mL/min, de acordo com Zero *et al.* 1995 (Tabela 3). Observamos os voluntários clinicamente e estes não apresentavam atividade de carie. Após a seleção inicial realizou-se uma nova seleção seguindo os critérios (Anexo 2): apresentar bom estado de saúde geral e oral; não ter tomado antibióticos nos últimos dois meses, pois afetam a microbiota oral e, com isso, a resposta ao modelo adotado; não serem fumantes; não ter tomado medicamentos que afetem o fluxo salivar (Zero, 1995). Após essa nova seleção, 11 preencheram os requisitos para participarem da pesquisa. Os voluntários de numero 12 a 17 (Tabela 3) não preencheram os requisitos exigidos e foram excluídos da pesquisa.

Todas as recomendações e informações sobre os procedimentos a serem realizados durante o experimento foram impressos e entregues aos voluntários (Anexo 3), atendendo a resolução nº 196 de 10/03/1996 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Os voluntários assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4) e receberam recomendações e orientações por escrito: a) utilizar o dispositivo intra-oral palatino diariamente, inclusive para dormir; b) remover o dispositivo intra-oral durante as refeições ou consumo de qualquer bebida ácida, que pode levar a desmineralização (Fushida & Cury, 1999) para padronizar o desafio cariogênico, ou chá preto que pode conter flúor (Haiacibara *et al.* 2004). Porém, ao removê-lo da boca devem conservá-lo dentro do recipiente fornecido com algodão umedecido, com o objetivo de manter as bactérias da placa viáveis e impedir o ressecamento dos blocos; c) durante o experimento utilizar apenas o dentifrício fornecido pela pesquisadora; d) não utilizar substâncias fluoretadas ou antimicrobianas.

Os voluntários foram orientados a não escovar diretamente as amostras e somente a região do dispositivo em contato com o palato. Quando fossem

enxaguar o dispositivo não deveriam colocá-los diretamente embaixo da água. Os voluntários receberam um estojo que contendo uma escova dental com cerdas macias e cabeça pequena, um dentifrício Sorriso Fresh (1100 ppmF com NaF) (Contendo 1.100 µgF/g, como NaF) (Colgate-Palmolive Ind. Com. Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), um fio dental, um frasco da sacarose a 20% e um recipiente com algodão umedecido, onde os voluntários conservaram o dispositivo durante as refeições (Figura 4).

Tabela 3- Determinação do fluxo salivar e contagem de Streptococcus mutans dos voluntários.

Voluntários	**Fluxo Salivar (mL/min)**	***S. mutans* (ufc/mL)**
01	0,5	$1,85.10^5$
02	1,0	$1,43.10^5$
03	0,25	$1,95.10^6$
04	1,0	$5,87.10^5$
05	1,0	$1,35.10^5$
06	0,5	$1,03.10^6$
07	0,7	$7,6.10^5$
08	0,5	$2,72.10^5$
09	0,5	$3,5.10^5$
10	1,0	313.10^6
11	0,7	$5,07.10^5$
12	0,9	$1,08.10^5$
13	1,0	$0,208.10^5$
14	2,0	$0,022.10^5$
15	1,25	$0,157.10^5$
16	0,5	$0,004.10^5$
17	2,0	$0,011.10^5$

Os valores mínimos de referencias foram: S. *mutans* $>10^5$ ufc/mL de saliva e fluxo salivar não estimulado= 0,2 mL/min.

Figura 4- Estojo fornecido aos voluntários, contendo uma escova de cerdas macias e cabeça pequena, dentifrício fluoretado, solução de sacarose a 20%, estojo para armazenar o dispositivo palatino devidamente identificado.

Preparo do dispositivo intra-oral palatino

Os dispositivos intra-orais palatinos foram confeccionados em resina acrílica autopolimerizável (Jet, Clássico, São Paulo, SP, Brasil) a partir do molde da arcada superior dos voluntários. Cada dispositivo continha no total 8 espaços localizados na região de molares, sendo 4 de cada lado. Três espaços foram destinados para as amostras restauradas e 2 espaços para as amostras de esmalte ou dentina sem cavidades (controle). Telas foram sobrepostas sobre as amostras deixando um espaço de 1 mm entre a tela e a superfície dental para o acúmulo de placa bacteriana ou biofilme (Figura 5).

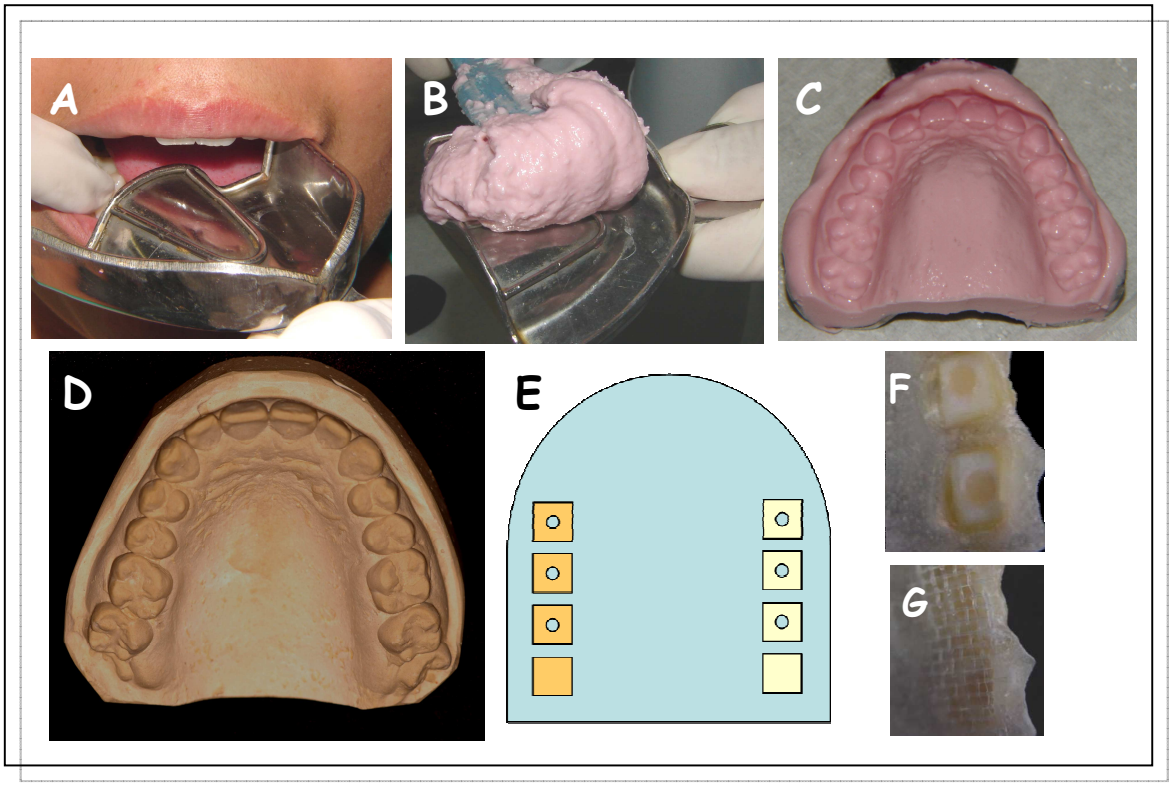


Figura 5- A- Seleção da moldeira; **B-** Inserção do material de moldagem (alginato) na moldeira selecionada; **C-** Molde confeccionado; **D-** Modelo do voluntário em gesso pedra; **E-** Esquema do dispositivo intra-oral palatino mostrando do lado direito amostras de esmalte dental e do lado esquerdo amostras de dentina; **F-** Detalhe das amostras inseridas no dispositivo com espaço de 1mm; **G**- Detalhe da tela posicionada.

Fase laboratorial

Os voluntários participaram do experimento que foi realizado em 2 fases. Eles utilizaram o dispositivo palatino por 14 dias em uma fase que correspondeu à avaliação de um sistema adesivo e após 10 dias utilizaram por mais 14 dias com outro adesivo. Durante o desafio cariogênico foram utilizados substratos de esmalte e de dentina sem cavidades restauradas, para avaliação apenas dos substratos isoladamente. Os voluntários utilizaram os dispositivos palatinos contendo 8 amostras, sendo 6 amostras (3 de esmalte e 3 de dentina)

restauradas com um sistema adesivo em cada fase e 2 amostras contendo somente uma superfície de substrato dental (sendo uma de esmalte e outra de dentina). No lado esquerdo do dispositivo palatino foram inseridas as amostras de dentina, e do lado direito amostras de esmalte.

Os voluntários gotejaram solução de sacarose 20% oito vezes ao dia às 8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00 e 21:00. O voluntário foi orientado para colocar cada gota da solução exatamente na superfície da tela plástica da amostra inclusive para a amostra do grupo controle, sem tocá-la e mantendo o dispositivo no recipiente contendo algodão umedecido durante 5 minutos antes de levá-lo à boca. Todos os voluntários escovaram os dentes com dentifrício fluoretado Sorriso Fresh três vezes ao dia.

Análise microbiológica da placa dental

Diluição, dispersão e incubação

Após o desafio cariogênico, com uma espátula plástica esterilizada foram coletadas 2 mg de placa dental formada, sendo imediatamente transferida para tubos criogênicos pré-pesados esterilizados. Ao tubo foi adicionada solução salina (NaCl 0,9%) na proporção de 1 mL/mg de placa, agitando até desfazer os grumos de placa e levado ao sonicador (Vibra Cell, Sonics & Materials Inc., Danbury,Conn., EUA) (Rosalen *et al*., 1996). Este tubo passou por processo de diluição seriada em câmara de fluxo laminar, partindo-se da diluição 10^0 até 10^3. Foi semeada (Spiral Plater, DW Scientific Ltda, Shipley, West Yorkshire, Inglaterra), em meio Ágar Mitis Salivarius a diluição 10^1 até 10^3 e, em meio Ágar Mitis Salivarius Bacitracina, a diluição 10^0 até 10^2, sendo todas semeadas em duplicada. Lavou-se o sistema da Spiral Plater® por oito vezes com hipoclorito de sódio 0,5% titulado com água destilada e deionizada esterilizada em placas de Petri. Após a dispersão, as placas de Petri permaneceram na bancada para

impedir o escorrimento da dispersão e logo após foram incubadas em estufa com atmosfera de 10% de CO_2 a 37º C por 48 horas.

Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a contagem de Streptococcus totais foi o Agar Mitis Salivarius- MAS, para contagem dos Streptococcus do grupo mutans foi o meio Agar Mitis Salivarius Bacitracina- MSB e para Lactobacilus foi o meio Rogosa Agar. Após todos os procedimentos de preparo dos meios, placas de Petri descartáveis foram identificadas e, em seguida, distribuídas 20 mL de meio em cada uma. Após a solidificação, foram incubadas em estufa (IG 150, Jouan) com atmosfera de 10% de CO_2 a 37º C por 24 horas para controle da esterilidade.

Contagem das colônias

Após o período de incubação, as Unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas com auxílio do contador de colônias. A placa de Petri foi posicionada no contador de colônias, que apresenta divisórias circulares de setores (Figura 6). Foram analisadas as bactérias totais, Streptococcus do grupo mutans, Streptococcus totais e Lactobacilos.

Após análise exploratória dos dados e constatação de que os mesmos violam os pressupostos de uma análise paramétrica, foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

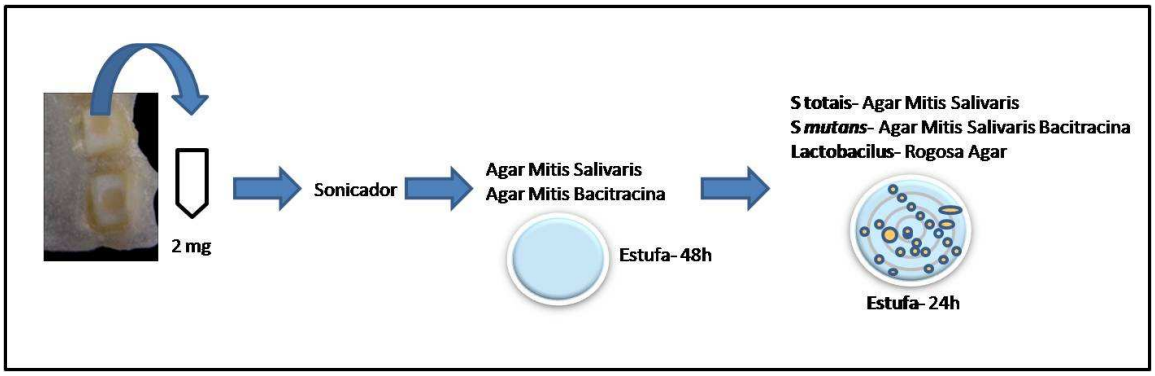


Figura 6- Esquema mostrando a coleta de 2 mg de biofilme dental que era levador ao sonicador. Em seguida, o biofilme era colocado em placas de Petri e semeado com Agar Mitis Salivaris e Agar Mitis Bacitracina e permanecendo por 48 h em estufa. Logo após, os meios determinados para cada tipo de bactéria eram preparados e levados novamente em estufa. A contagem de bactérias era feitas através do auxilio de um contador de colônias, que dividia a placa de Petri em setores.

Determinação da extensão da lesão de cárie

Ao final do desafio cariogênico, as telas plásticas foram removidas com lâminas de bisturi nº 15 (Paramount, Paramount Surgimed Ltd., New Delhi, India), e as amostras removidas, limpas com escova, e água destilada e deionizada (dd). Todas as amostras foram fixadas em placas de acrílico e seccionadas ao meio em cortadeira de precisão (Isomet 2000, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) com disco diamantado de alta concentração (11-4243, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) na região central da restauração. Uma parte da secção das amostras foi incluída em resina de poliestireno para serem novamente seccionadas serialmente, obtendo-se fatias dentais de aproximadamente 400 µm de espessura. Essas amostras foram lixadas em politriz elétrica e giratória (APL-4, Arotec, Cotia, SP, Brasil) sob refrigeração com lixas abrasivas de óxido de alumínio de granulação 600 e 1200 (Carburundum Abrasivos, Recife, PE, Brasil) até se obter a espessura final de 0,1 ± 0,01 mm, a qual foi aferida com um paquímetro digital (Starret 727-6/150,

Starret, São Paulo, SP, Brasil). As amostras foram embebidas em água, dispostas em lâminas de vidro seladas com lamínulas, e visualizadas em microscópio de luz polarizada (Leica, DMLSP, Leica Microsystems, Heerbrug, Suiça) com uma câmera acoplada. As imagens foram captadas em lentes com 20 X de aumento, sendo então, transferidas para o monitor de um computador, através do software Image-Pro Plus (Versão 4.1 para Windows, Media Cybernetics). Foram feitas, as medidas da lesão de cárie, considerando como desmineralização a faixa contínua, em 5 distâncias da restauração utilizando uma ferramenta de medida linear do programa de computador (Figura 7).

Após análise exploratória dos dados e constatação de que os mesmos violam os pressupostos de uma análise paramétrica, foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon pareado.

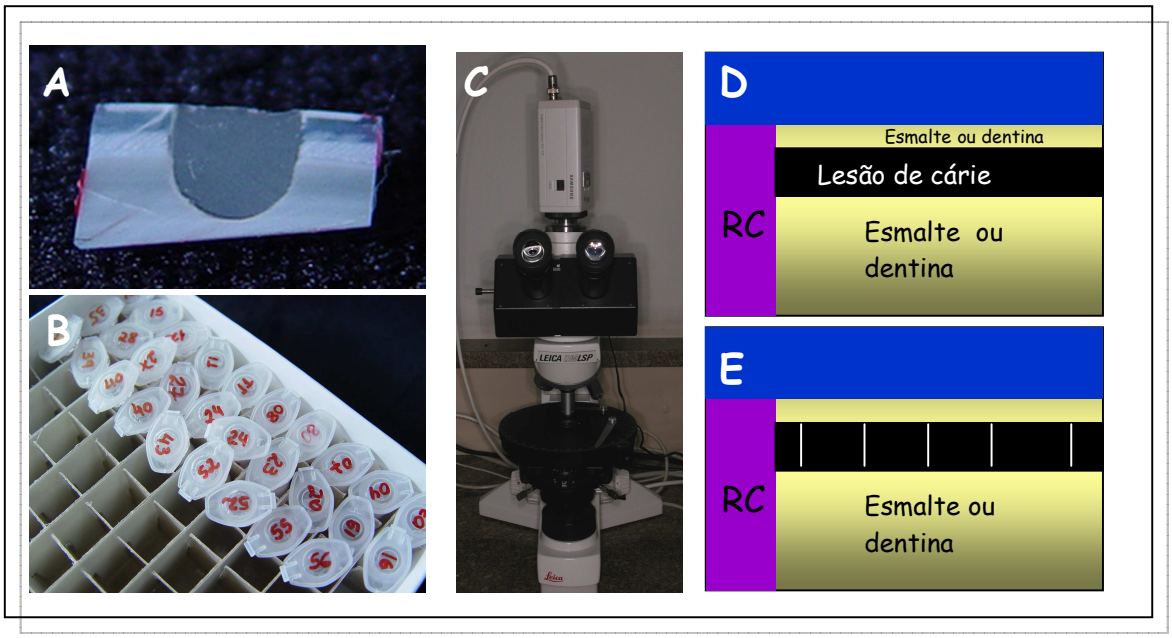


Figura 7- A- Fatia obtida após desafio cariogênico (100 ± 10 µm); **B-** Amostras armazenadas em tubos "eppendorfs"; **C-** Microscópio de Luz Polarizada; **D-** Esquema da lesão de cárie; **E-** Esquema mostrando as medidas da lesão de cárie em relação à restauração. (RC=resina composta).

Determinação da Microdureza Knoop

A outra metade das amostras seccionadas foram incluídas em cilindros de resina epóxica (Buehler, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) de maneira que a superfície interna do substrato permanecesse exposta. As superfícies das amostras foram polidas para posterior leitura da microdureza. Foram utilizadas lixas de Al_2O_3 de granulação 320, 600 e 1200 (Carburundum Abrasivos, Recife, PE, Brasil) em politriz (APL-4, Arotec, Cotia, SP, Brasil) sob refrigeração com água. Para o polimento final foram utilizados discos de feltro (Polishing Cloth Buelher nº 40-7618, Lake Bluff, IL, EUA) e pasta de diamante de 1 μm e ¼ μm (Arotec, Cotia, SP, Brasil) (Figura 8). Entre os procedimentos de polimento, as amostras foram colocadas em aparelho de ultrassom (Odontoplas, São Paulo, SP, Brasil) com água destilada e deionizada (dd) para remoção das partículas de lixa e para não prejudicar o polimento seguinte. Em seguida, as amostras foram lavadas em água dd corrente e armazenadas em recipientes plásticos fechados, cobertos com papel absorvente umedecido em água dd e conservados em geladeira a 4ºC. As mensurações de microdureza Knoop (Future Tech, FM 1E, Tokyo, Japão) foram realizadas na região interna do esmalte e da dentina nas profundidades de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 μm em relação à superfície do esmalte/dentina e nas distâncias de 60, 160 e 260 μm da restauração em todas profundidades, utilizando uma carga de 25 gramas durante 5 segundos para esmalte e 10 gramas durante 15 segundos em dentina (Figura 9).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em esquema de parcela sub-dividida. Os fatores foram representados pelos voluntários e adesivos, a subparcela pelas distâncias e as profundidades, sendo o nível de significância adotado de 5%.

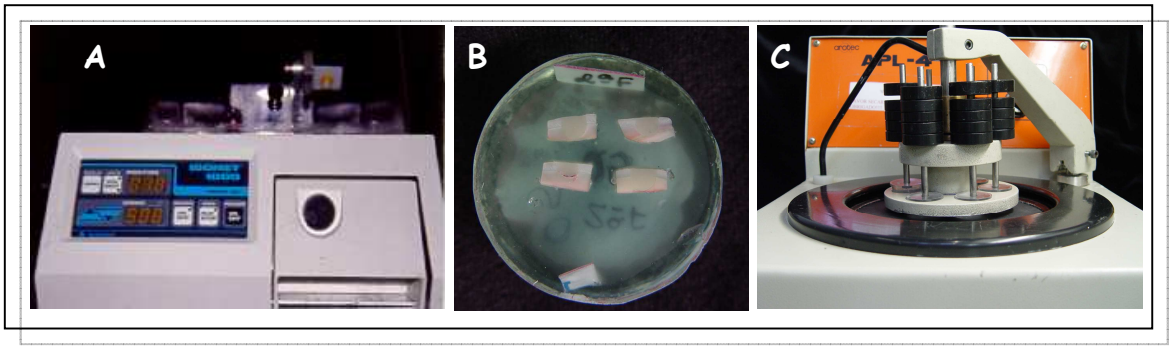


Figura 8- A- Cortadeira Metalográfica de precisão; **B-** Metade das amostras incluídas em resina de poliestireno; **C-** Politriz elétrica e giratória com braço acoplado.

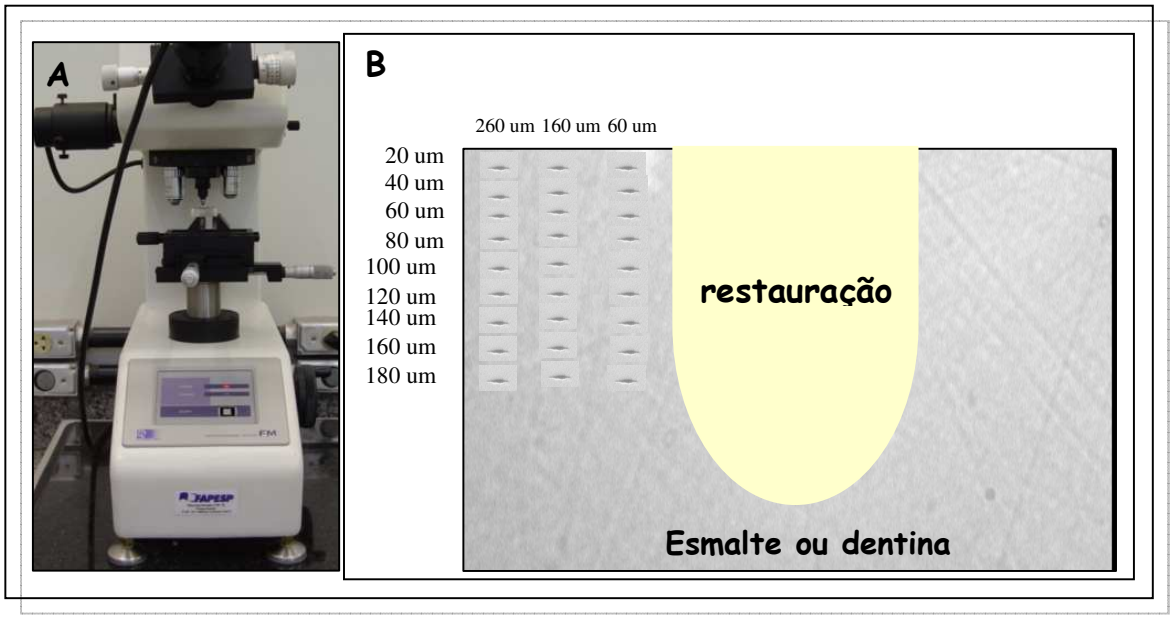


Figura 9- A- Microdurômetro com identador Knoop; **B-** Esquema das identações em relação à distância da superfície e da restauração.

4.2- Capítulo II- Experimento *in vitro*

Delineamento do estudo

Delineamento experimental: inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2X2.

Unidades experimentais: dentes bovinos.

Fatores em estudo:
Sistemas adesivos, em 2 níveis: One-Up Bond F Plus e Clearfil Protect Bond;
Ciclagem de pH: ausente ou presente
Variáveis de resposta:
Resistência de União em MPa.

Preparo dos substratos, aplicação dos sistemas adesivos e restauração das amostras

A obtenção, limpeza e desinfecção dos dentes bovinos foi realizada da mesma maneira citada no experimento *in situ*. A obtenção das amostras em dentina para os procedimentos adesivos, a face vestibular das coroas em esmalte foi abrasionada com lixas de granulação 320 e 400 de carbeto de silício (SiC) (Carburundum Abrasivos, Recife, PE, Brasil) até a exposição de uma dentina de profundidade média e posterior tratamentos. As superfícies foram abrasionadas com lixas de granulação 600 SiC durante 15 segundos. Para o esmalte, foi necessário o desgaste da superfície vestibular com lixas de granulação 600 de SiC (Carburundum Abrasivos, Recife, PE, Brasil) durante 15 segundos até a planificação do esmalte (Figura 10). As amostras foram restauradas com os mesmos adesivos Clearfil Protect Bond (Figura 11) e One-Up Bond F Plus (Figura 12) e com a resina composta Filtek Z 350 (3M ESPE St. Paul, MN, EUA) numa altura de 4 mm, tanto em esmalte quanto em dentina e de acordo com as recomendações dos fabricantes. A resina composta Filtek Z350 foi aplicada com auxílio de uma espátula de inserção nº 1 (Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA) pela técnica incremental horizontal (Reis *et al.,* 2003; Santos *et al*., 2004). Cada camada foi fotoativada por 20 segundos com intensidade de 550 mW/cm^2 (Curing Light XL 3000, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA).

Figura 10- Preparo dos substratos dentais (esmalte dental e dentina).

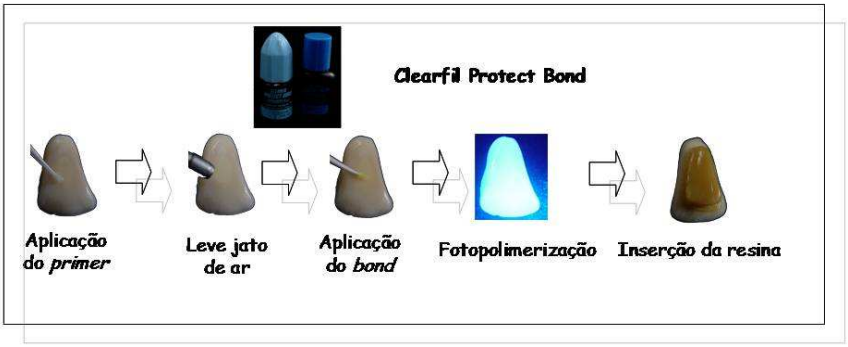
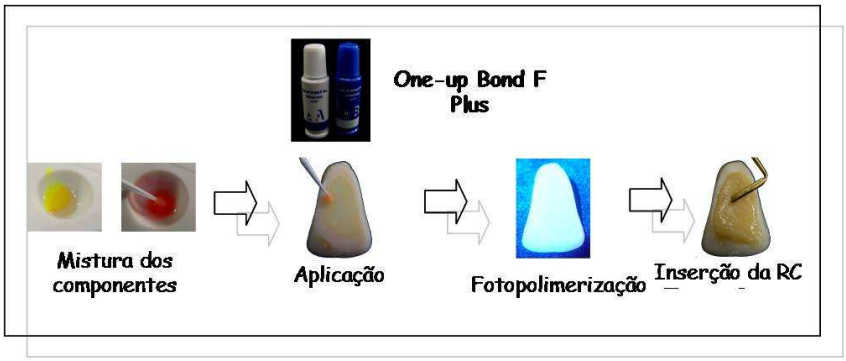


Figura 11- Aplicação do adesivo autocondicionante de 2 passos Clearfil Protect Bond inserção da resina Z350.



.**Figura 12-** Aplicação do sistema adesivo autocondicionante de passo único One-Up Bond F Plus inserção da resina composta.

Grupos experimentais e Ciclagem de pH

Foram formados 4 grupos experimentais, sendo aplicados tanto em esmalte e quanto em dentina (n=7): 1- Clearfil Protect Bond (PB) sem desafio cariogênico (DC); 2- adesivo PB aplicado com DC; 3- adesivo One-Up Bond F Plus (OP) sem DC; 4- adesivo OP com DC.

Após o armazenamento por 24h, 7 dentes restaurados de cada grupo foram fixados em placas de acrílico com auxílio de cera pegajosa (Horus, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e individualmente acoplados à cortadeira de precisão. Os dentes foram seccionados com auxílio de um disco diamantado de alta concentração (11-4243, Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) em intervalos de 1,0 mm no sentido vestíbulo-lingual e perpendicularmente a interface de união. Duas fatias de cada dente restaurado foram selecionadas e utilizadas nas análises em MET da interface de união resina-dentina/esmalte. As demais fatias foram novamente seccionadas para obtenção de espécimes em formato de paralelepípedo (ou palito), com uma extremidade em compósito e a outra em esmalte ou dentina, com área na secção transversal de 1 mm^2. Seis espécimes por dente foram selecionados e testados por dente no ensaio de resistência de união por microtração.

Os espécimes dos grupos 2, 4, 6 e 8, que foram submetidos à ciclagem de pH foram protegidos com esmalte para unhas (Risqué, Niasi Ind. Cosm. Ltda, Taboão da Serra, SP, Brasil) para delimitar uma área que sofreu os tratamentos de desmineralização e remineralização. O esmalte cosmético foi aplicado 1,5 mm acima e abaixo da área de união. Os espécimes (palitos e fatias) foram submetidos à ciclagem de pH durante 8 dias simulando o desenvolvimento de cárie. Cada ciclo foi composto por 8 horas em solução desmineralizante (1,4 mM Ca, 0,9 mM P, 0,05 M ácido acético, pH 5,0) e 16 horas em solução remineralizante (1,5 mM Ca, 0,9 mM P, 0,1 M tampão Tris, pH 7,0) (Hara *et al.* 2005). Os espécimes que não foram submetidos à ciclagem de pH permaneceram em 100% de umidade relativa.

Ensaio de Microtração

Os espécimes em formato de palito, submetidos ou não a ciclagem de pH, foram testados quanto à resistência de união. Com o auxílio de uma cola à base de cianoacrilato (Super Bonder gel, Henkel Loctite Adesivos Ltda, São Paulo, Brasil) e de um acelerador (Zapit, D. V. A., Anaheim, CA, EUA). Os espécimes foram fixados ao aparato para microtração, o qual estava acoplado a uma máquina de Ensaio Universal (Instron 4411, Instron Corp, Canton, MA, EUA). A carga de tração foi aplicada perpendicularmente à interface de união, com velocidade de 0,5 mm/min até ruptura da união (Figura 13). Os valores expressos pela máquina (Quilograma-força-Kgf) foram anotados. Após o teste, os espécimes foram removidos do dispositivo e medidos com um paquímetro digital (Starret 727-6;150, Starret Ltda., Itu, SP, Brasil) para o cálculo da área de união e resistência de união (em MPa). Os dados foram analisados através da análise de variância (2 fatores) e teste de Tukey ($p<0,05$).

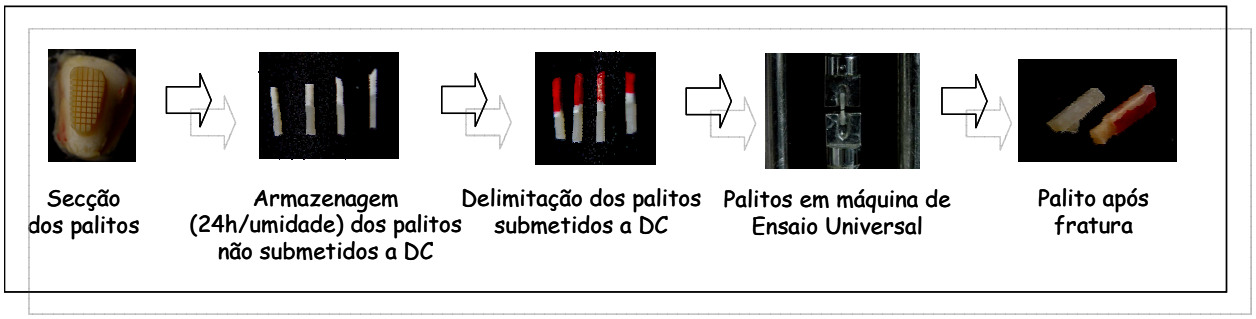


Figura 13- Preparo das amostras (palitos) e ensaio de Microtração em Máquina de Ensaio Universal (Instron).

Análise do padrão de fratura (MEV)

Os espécimes testados no ensaio de microtração foram fixados em *stubs* metálicos e as superfícies fraturadas foram cobertas com uma fina camada

de ouro (Desk II, Denton Vacuun Inc NJ - EUA) e observados em microscopia eletrônica de varredura (JSM – 5600 – JEOL USA, Inc., Peabody, MA 01960 – EUA). O objetivo desta parte do projeto foi mostrar a predominância/prevalência das estruturas envolvidas na fratura dos espécimes por grupo. O padrão de fratura foi avaliado seguindo a classificação de Reis *et al*., 2003: **Tipo 1:** falha adesiva entre o sistema de união e o tecido dental, e parcialmente coesiva no sistema de união; **Tipo 2:** coesiva no sistema de adesivo; **Tipo 3:** falha predominantemente coesiva no tecido dental; **Tipo 4:** falha parcialmente coesiva no compósito e adesiva entre o compósito e o sistema de união.

Análise em microscopia eletrônica de Transmissão:

Fatias dos grupos experimentais utilizados para o ensaio de Microtração foram fixadas em solução de Karnovsky, pós-fixadas em tetróxido de ósmio, desidratadas em uma série ascendente de soluções de etanol (30 a 100%) e embebidos em resina epóxica (Buehler, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA). As amostras foram levadas a um Ultramicrótomo (MT-2C, RMC, Florida, USA) e com uma navalha de diamante foram obtidas fatias com 90nm de espessura. As amostras foram cobertas com uma fina camada de carbono (Desk II, Denton Vacuun Inc NJ, EUA) e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900, Zeiss, Munich, Alemanha) para análise da ultramorfologia da união dente-compósito. Fotomicrografias foram obtidas para os grupos experimentais e algumas representativas de cada grupo foram selecionadas e inseridas neste trabalho.

5 RESULTADOS

5.1- Capítulo I- Experimento *in situ*

1- Análise dos dados de Microdureza Longitudinal Knoop

1.1- Análise em dentina

A ANOVA indicou que houve diferença estatística para os fatores profundidade ($p<0,0001$) e distância ($p=0,0007$). O fator adesivo ($p\leq0,05$) mostrou diferença significativa dentro dos seus níveis. Somente a interação adesivo x profundidade foi significativa ($p<0,0001$), enquanto as demais interações não mostraram diferenças significativas: adesivo x distância ($p=0,3874$); distância x profundidade ($p=0,9862$); adesivo x distância x profundidade ($p=0,9305$). A interação adesivo x profundidade foi então desdobrada e os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Média (desvio padrão) da microdureza longitudinal (Knoop) da dentina após desafio cariogênico.

Adesivo	Profundidade (µm)	Distância (µm)			Tukey
		60	160	260	
PB	**20**	*19,07 (6,08)	*18,18 (6,20)	*18,74 (7,10)	g
	40	*20,91 (7,07)	*20,50 (6,97)	*20,04 (6,26)	fg
	60	21,17 (6,08)	21,81 (5,72)	21,91 (6,04)	ef
	80	*22,58 (5,28)	*23,71 (5,71)	*23,81 (5,42)	de
	100	23,92 (5,68)	24,66 (5,40)	24,85 (5,68)	cd
	120	24,08 (5,95)	25,40 (5,57)	25,77 (6,35)	bcd
	140	25,30 (5,54)	26,42 (6,09)	27,00 (5,36)	abc
	160	26,42 (5,54)	27,37 (5,77)	27,65 (5,72)	ab
	180	26,71 (5,30)	28,70 (5,75)	28,70 (5,95)	a
OP	**20**	12,70 (4,80)	14,21 (5,18)	16,23 (6,89)	f
	40	16,21 (4,00)	17,76 (4,52)	18,10 (6,89)	e
	60	19,68 (4,52)	19,92 (4,70)	20,83 (3,40)	d
	80	20,28 (3,21)	21,50 (3,84)	22,45 (2,63)	d
	100	22,56 (3,27)	24,80(5,67)	24,37 (2,77)	c
	120	24,00 (3,13)	26,20 (4,86)	25,67 (3,43)	bc
	140	24,98 (2,38)	25,84 (2,34)	26,73 (3,33)	abc
	160	25,63 (2,21)	26,21 (3,00)	27,40 (2,26)	ab
	180	27,45 (2,50)	27,60 (2,34)	28,54 (2,45)	a
Tukey		B	A	A	

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada adesivo) diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).
*Difere do adesivo OP pela ANOVA (p≤0,05).

Os resultados mostraram que houve uma menor microdureza longitudinal na distância de 60 µm da restauração para os dois adesivos estudados. Observou-se para os dois adesivos, o aumento da microdureza Knoop com o aumento da profundidade em relação à superfície. O adesivo Clearfil Protect Bond mostrou maior microdureza em todas as distâncias nas profundidades de 20, 40 e 80 µm quando comparado ao adesivo One-Up Bond F Plus. Nota-se que na profundidade de 60 µm os valores das médias foram semelhantes por isso não se observou diferença estatística significativa.

1.2- Análise em esmalte

A ANOVA detectou diferença significativa somente para a interação adesivo X profundidade (p<0,0001). Os demais fatores não foram significativos:

adesivo (p≤0,05) e distância (p=0,8361). Os resultados das interações foram: adesivo x distância (p=0,9740); adesivo x profundidade (p<0,0001); distância x profundidade (p=0,9881); adesivo x distância x profundidade (p=0,7037). A interação significativa adesivo x profundidade foi desdobrada e os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Média (desvio padrão) da microdureza longitudinal (Knoop) do esmalte após desafio cariogênico.

Adesivo	Profundidade (µm)	Distância (µm)			Tukey
		60	160	260	
PB	**20**	*182,41 (86,17)	*188,80 (76,41)	*212,28 (60,76)	b
	40	248,46 (52,3)	248,00 (40,07)	242,66 (36,43)	a
	60	256,80 (45,43)	268,62 (36,22)	260,57 (29,08)	a
	80	261,64 (45,87)	268,41 (43,86)	263,00 (35,14)	a
	100	275,70 (43,56)	279,22 (35,50)	266,00 (38,90)	a
	120	278,27 (40,34)	281,28 (45,34)	273,84 (43,90)	a
	140	280,48 (46,53)	272,16 (31,41)	274,75 (48,54)	a
	160	276,86 (40,34)	276,40 (40,16)	266,65 (42,42)	a
	180	281,31 (33,54)	267,30 (48,03)	270,78 (46,32)	a
OP	**20**	126,66 (57,07)	131,55 (69,63)	117,40 (57,26)	c
	40	232,81 (50,82)	236,30 (65,94)	219,76 (37,55)	b
	60	258,18 (57,41)	248,65 (53,93)	255,48 (52,22)	ab
	80	272,53 (66,80)	251,14 (49,51)	270,18 (43,02)	ab
	100	274,67 (67,32)	278,21 (45,77)	278,87 (59,15)	a
	120	264,93 (48,12)	279,90 (41,16)	270,90 (45,28)	ab
	140	285,52 (54,64)	284,90 (31,37)	279,80 (35,02)	a
	160	268,33 (51,87)	286,90 (47,70)	266,61 (61,77)	ab
	180	263,98 (46,14)	279,51 (47,18)	280,92 (35,93)	ab
Tukey		A	A	A	

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada adesivo) diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).
*Difere do adesivo OP pela ANOVA (p≤0,05).

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa na microdureza longitudinal nas distâncias da restauração para os dois adesivos estudados. No adesivo PB observou-se que a microdureza foi menor na profundidade de 20 µm, não diferindo nas demais profundidades. Para o adesivo OP observa-se diferença estatística entre as profundidades. Nota-se que

na profundidade de 20 µm houve uma maior microdureza para o adesivo PB quando comparado ao adesivo OP.

2- Análise dos dados de lesão de cárie através de Microscopia de Luz Polarizada

2.1- Análise em dentina

Tabela 6. Mediana, valor mínimo e valor máximo da extensão da desmineralização (µm) em dentina após desafio cariogênico.

	Adesivos	
	PB	**OP**
Mediana	51,50 B	119,12 A
Valor mínimo	0,00	77,00
Valor máximo	117,60	198,23

P=0,0109 (teste de Wilcoxon pareado)

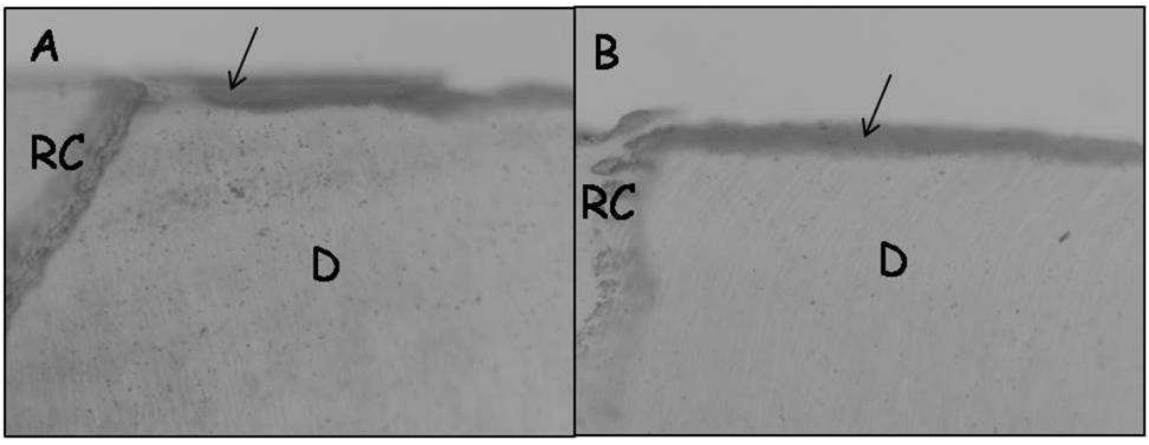


Figura 14- A- Microscopia de luz polarizada em dentina para o adesivo Clearfil Protect Bond, **B-** Microscopia de luz polarizada em dentina para o adesivo One-Up Bond F Plus. As setas indicam as regiões de desmineralização.

Os resultados mostraram uma maior extensão da desmineralização para o adesivo OP. As imagens de microscopia de luz polarizada ilustram o

padrão de desmineralização para os dois adesivos, mostrando uma menor perda mineral para o adesivo PB, e que a área de desmineralização iniciou-se mais distante da restauração.

2.2- Análise em esmalte

Tabela 7. Mediana, valor mínimo e valor máximo da extensão da desmineralização (µm) em esmalte após desafio cariogênico.

	Adesivos	
	PB	**OP**
Mediana	26,15 B	108,45 A
Valor mínimo	0,00	35,10
Valor máximo	90,00	229,00

P=0,0173 (teste de Wilcoxon pareado)

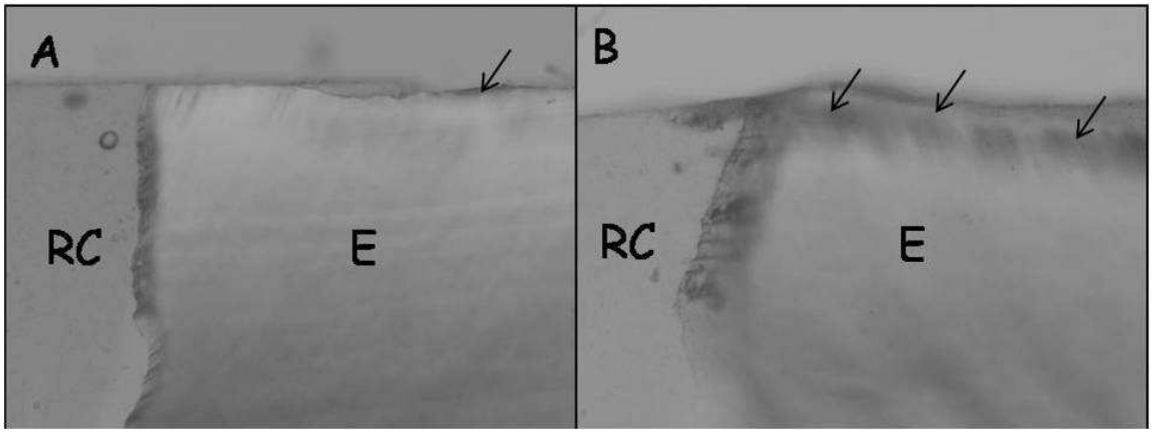


Figura 15- A- Microscopia de luz polarizada em esmalte para o adesivo Clearfil Protect Bond, **B-** Microscopia de luz polarizada para o adesivo One-Up Bond Plus. As setas indicam as regiões de desmineralização.

Em esmalte, observou-se também maior extensão da desmineralização para o adesivo OP. As imagens de microscopia de luz polarizada ilustram as regiões de desmineralização para cada adesivo.

3- Análise Microbiológica do Biofilme

Foram analisadas as bactérias totais, Streptococus totais e do grupo mutans e Lactobacilos. Os resultados a seguir mostram as análises do biofilme acumulado no dispositivo palatino sobre o esmalte dental após o desafio cariogênico.

3.1- Análise de Streptococcus no esmalte dental

Tabela 8- Mediana (valor mínimo e valor máximo) de UFC/mL x 10^{5} de Streptococcus totais e Streptococcus *mutans* na ausência ou na presença de restauração em esmalte dental após desafio cariogênico.

Bactérias	Adesivos	Controle (sem restauração)	Dentes Restaurados
S. Totais	**PB**	396,0 (0; 1020,0)Aa	300,0 (0; 1012,0)Ab
	OP	332,0 (6,40; 3200,0)Aa	2040,0 (128,0; 3360,0)Aa
S. *mutans*	**PB**	0,65 (0; 4,96)Ab	0,20 (0; 2,64)Ab
	OP	2,8 (0,0; 26,8)Aa	1,96 (0; 49,6)Aa

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, que comparam adesivos dentro de cada grupo de bactérias) diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística na ausência ou presença de restauração para os adesivos. Para os S. totais não observou-se diferença na quantidade de colônias de bactérias entre os adesivos quando havia apenas o substrato dental. Entretanto, na presença de restauração houve uma menor quantidade de bactérias para o adesivo PB que para o adesivo OP. Os S. *mutans* não apresentaram diferença estatística significativa na presença e na ausência de restauração dentro dos adesivos. Quando comparados os adesivos observou-se que OP resultou em maior quantidade de bactérias.

3.2- Análise de Lactobacilus em esmalte dental

Tabela 9- Mediana (valor mínimo e valor máximo) de UFC/mL x 10^{3} de Lactobacilus na ausência ou na presença de restauração em esmalte dental após desafio cariogênico.

Adesivos	Controle (sem restauração)	Dentes restaurados
PB	50,0 (0,0; 100000,0)Aa	40,0 (0; 144000,0)Aa
OP	84,0 (0; 2880,0)Aa	32,0 (0; 91200,0)Aa

Médias seguidas de mesmas letras (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p>0,05$).

Para a análise dos Lactobacilus não foi observada diferenças significativas entre os adesivos estudados e nem na presença ou na ausência da restauração.

3.3- Análise de Streptococcus em dentina

As Tabelas (10 e 11) abaixo mostram os dados obtidos em dentina.

Tabela 10- Mediana (valor mínimo e valor máximo) de UFC/mL x 10^{5} de Streptococcus totais e Streptococcus *mutans* na ausência ou na presença de restauração em dentina após desafio cariogênico.

Bactérias	Adesivos	Controle (sem restauração)	Dentes restaurados
S. totais	**PB**	292,0 (0; 15600,0)Aa	60,0 (0; 69200,0)Aa
	OP	484,0 (2,80; 2600,0)Ba	1440,0 (108,0; 3200,0)Aa
S. *mutans*	**PB**	0,28 (0; 12,0)Aa	0,22 (0; 6,50)Aa
	OP	0,069 (0; 40,80)Aa	0,33 (0; 60,0)Aa

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, que comparam adesivos dentro de cada grupo de bactérias) diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p\leq0,05$).

Os dados de contagem de S. totais em dentina mostraram uma maior quantidade de bactérias para o adesivo OP na presença de restauração, não houve diferença estatística entre os adesivos. Para o S. *mutans* não houve

diferença estatística significativa entre os adesivos e na presença e na ausência das restaurações.

3.4- Análise de Lactobacilus em dentina

Tabela 11- Mediana (valor mínimo e valor máximo) de UFC/mL x 10^3 de Lactobacilus na ausência ou na presença de restauração em dentina após desafio cariogênico.

Adesivos	Controle (sem restauração)	Dentes restaurados
PB	0 (0; 94000,0)Ba	60,0 (0; 69200,0)Aa
OP	100,0 (0,0; 3920,0)Aa	96,0 (0; 12400,0)Aa

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$).

Na presença de restauração com o adesivo PB em dentina houve uma maior quantidade de lactobacilus que na ausência delas. Para o adesivo OP não houve diferença estatística com ou sem restauração. Quando os adesivos foram comparados não se observou diferença estatística significativa entre eles.

II. Capítulo 2- Experimento *in vitro*

1- Microtração

Os resultados de resistência de união para os adesivos aplicados em esmalte não mostraram diferença estatística significativa ($p>0,05$) e também não houve diferença na presença ou ausência de ciclagem de pH ($p>0,05$), como mostrado na tabela abaixo (Tabela 12).

Tabela 12- Médias (desvio padrão) da resistência de união em MPa, dos sistemas adesivos em esmalte em função da ciclagem de pH.

Adesivos	Sem ciclagem	Com ciclagem
PB	25,8 (5,05) Aa	21,67 (4,55) Aa
OP	20,1 (7,13) Aa	19,47 (4,36) Aa

Letras maiúsculas comparam na linha e letras minúsculas comparam na coluna.

O adesivo PB apresentou maiores médias, significativamente superiores que o adesivo OP, com ou sem ciclagem de pH. A presença ou ausência de ciclagem de pH não mostrou diferença significativa (Tabela 13).

Tabela 13- Médias (desvio padrão) da resistência de união em MPa, dos sistemas adesivos em dentina em função da ciclagem de pH.

Adesivos	Sem ciclagem	Com ciclagem
PB	26,43 (7,98)Aa	22,55 (1,95)Aa
OP	14,94 (6,82)Ab	19,55 (4,32)Ab

Letras maiúsculas comparam na linha e letras minúsculas comparam na coluna.

2- Padrão de Fratura

As figuras em microscopia eletrônica de varredura mostram as falhas predominantes dentro de cada grupo estudado. Para o adesivo One-Up Bond F Plus observa-se em esmalte predominância da fratura do tipo 4, tanto no esmalte ciclado como no não submetido a ciclagem (Figura 16A e 16B). Para o adesivo Clearfil Protect Bond, em esmalte e sem ciclagem de pH observou-se predominância da falha tipo 2, mas quando o espécime foi submetido a ciclagem ocorreu maior falha tipo 3 em esmalte (Figuras 16C e 16D). O Gráfico 1 mostra a

porcentagem de fraturas encontradas no esmalte dental para os adesivos estudados.

Para o adesivo OP no substrato dentinário, foi observado falha tipo 2 predominante no adesivo para a dentina não ciclada, e tipo 1 entre o adesivo e a dentina para o grupo não submetido à ciclagem de pH (Figuras 17A e 17B e Gráfico 2). No adesivo PB em dentina sem ciclagem, a falha predominante foi tipo 1 entre o substrato e o sistema adesivo e na dentina ciclada a maior incidência foi tipo 3 no tecido dentinário (Figuras 17C e 17D). Podemos observar a porcentagem de fraturas no Gráfico 2.

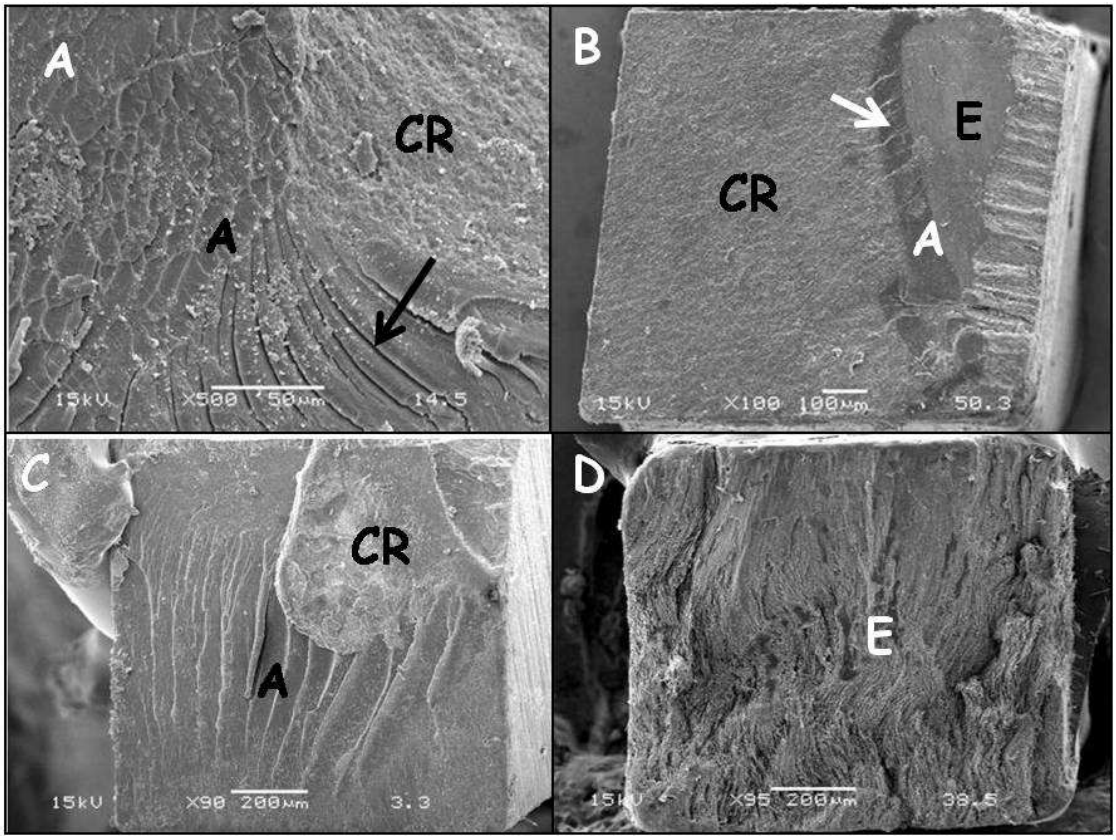


Figura 16- 16A- One-Up Bond F Plus sem ciclagem de pH em esmalte. Falha tipo 4. **16B-** One-Up Bond F Plus com ciclagem de pH em esmalte. Falha tipo 4. **16C-** Clearfil Protect Bond sem ciclagem de pH em esmalte. Falha tipo 2. **16D-** Clearfil Protect Bond com ciclagem de pH em esmalte. Falha tipo 3.(A- adesivo, CR-resina composta, E- esmalte, setas- camada de adesivo).

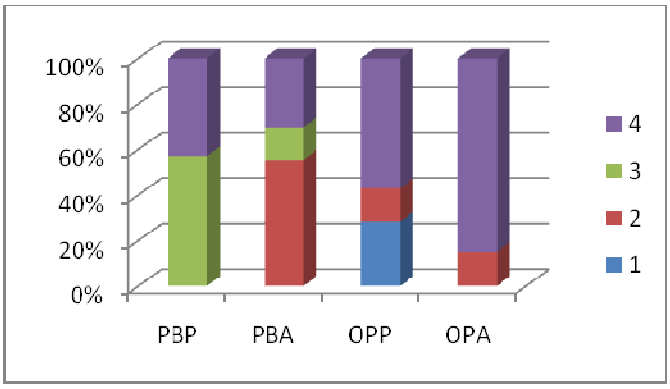


Gráfico 1- O gráfico mostra a porcentagem de tipos de fratura encontrados nos grupos estudados em esmalte. (PB- Clearfil Protect Bond; OP- One-Up Bond F Plus; E- esmalte; A- ausência de ciclagem de pH; P- presença de ciclagem de pH).

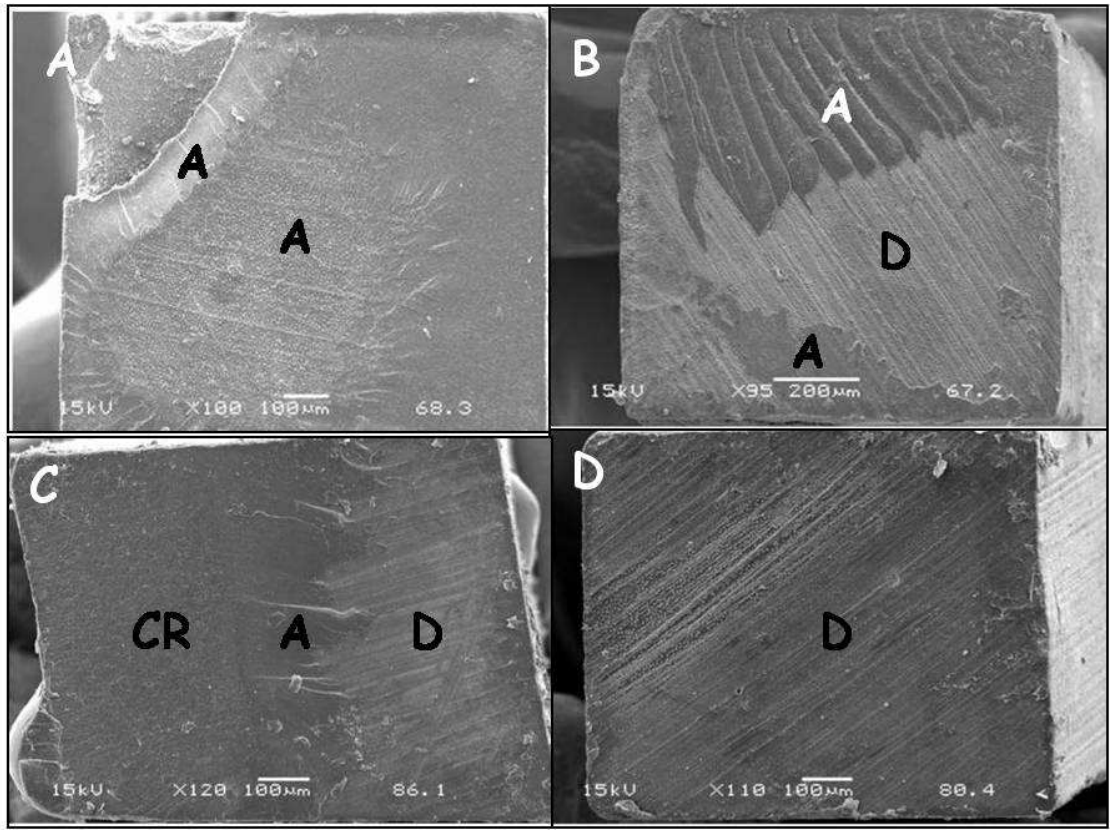


Figura 17- 17A- One-Up Bond F Plus sem ciclagem de pH em dentina. Falha tipo 2. **17B-** One-Up Bond F Plus com ciclagem de pH em dentina. Falha tipo 1. **17C-** Clearfil Protect Bond sem ciclagem de pH em dentina. Falha tipo 1. **17D-** Clearfil Protect Bond com ciclagem de pH em dentina. Falha tipo 3. (A- adesivo, CR- resina composta, D- dentina).

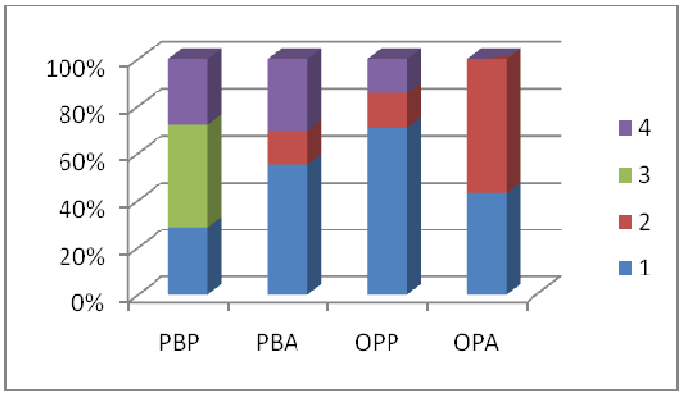


Gráfico 2- O gráfico mostra a porcentagem de tipos de fratura encontrados nos grupos estudados em dentina. (PB- Clearfil Protect Bond; OP- One-Up Bond F Plus; A- ausência de ciclagem de pH; P- presença de ciclagem de pH).

3- Análise em microscopia eletrônica de Transmissão

Figuras representativas de cada grupo experimental estão descritas abaixo.

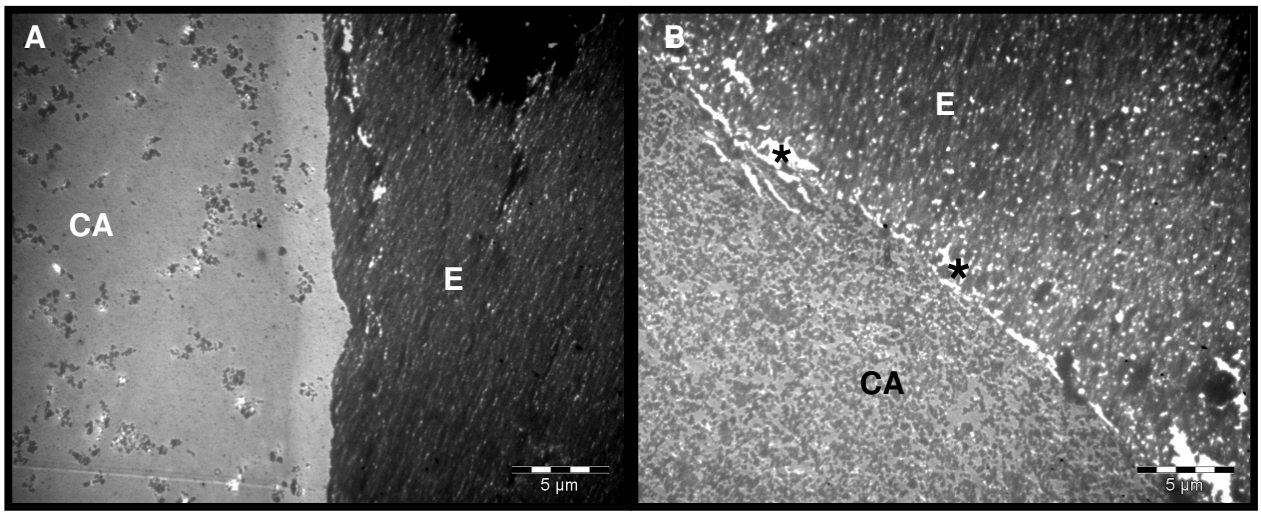


Figura 18- (1.100X)- 18A- Representa o grupo do adesivo One-Up Bond F Plus sem desafio cariogênico em esmalte; **18B-** One-Up Bond F Plus com desafio cariogênico em esmalte (CA- camada adesiva; E- esmalte dental; *- espaços vazios).

Na Figura 18A pode-se notar o íntimo contato da camada adesiva (CA) e a superfície de esmalte. O esmalte (E) apresenta-se compacto e sem o aspecto de desmineralização. Na Figura 18B, nota-se a área de união com espaços (*), que também são notados no esmalte subjacente a área de união. Esses espaços podem estar relacionados às áreas de desmineralização promovida pela ciclagem de pH.

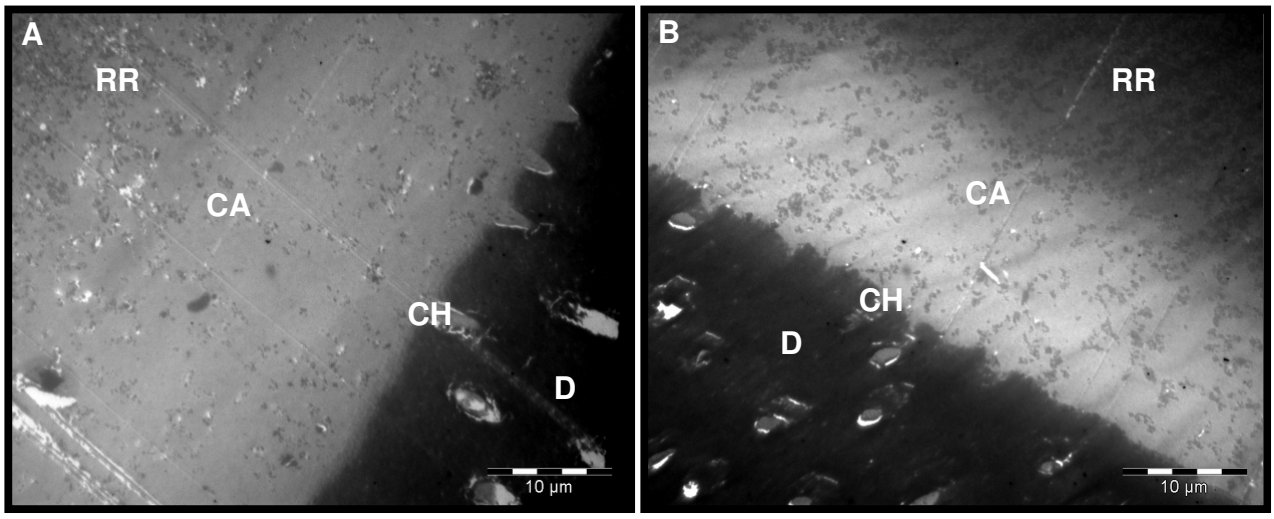


Figura 19 (700X)- 19A- Representa o grupo do adesivo One-Up Bond F Plus sem desafio cariogênico em dentina; **19B-** adesivo One-Up Bond F Plus com desafio cariogênico em dentina (CA- camada de adesivo; CH- camada híbrida; RR- resina restauradora; D- dentina).

Na Figura 19A pode-se notar a camada híbrida (CH) com aproximadamente 1 a 2 µm de espessura, a camada adesiva (CA) e a dentina mineralizada (D). Na Figura 19B, nota-se as mesmas estruturas, entretanto, a dentina parece um pouco menos mineralizada (pela coloração da camada superficial de 4 a 6 µm de espessura) devido à ciclagem de pH.

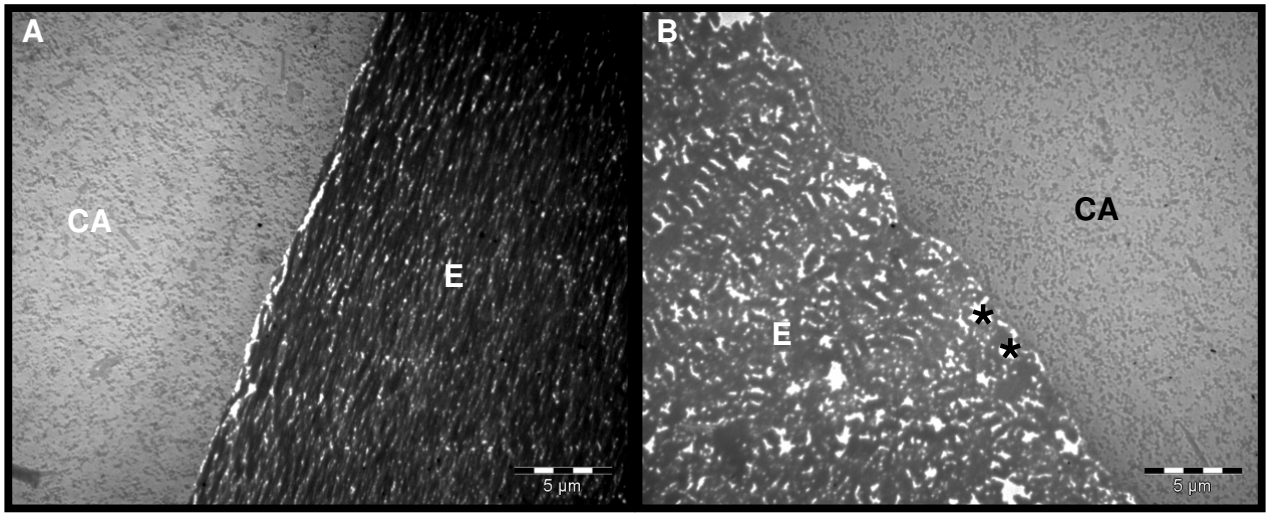


Figura 20 (1.100X)- 20A - Adesivo Clearfil Protect Bond sem desafio cariogênico; **20B-** Adesivo Clearfil Protect Bond com desafio cariogênico, ambas em esmalte (CA- camada de adesivo; E- esmalte dental; *- espaços vazios).

Na Figura 20A pode-se notar o contato da camada adesiva (CA) e a superfície de esmalte (E), que em alguns locais parece não estar contínua. Na Figura 20B, nota-se próximo a área de união espaços (*), que também são notados no esmalte subjacente a área de união. Esses espaços podem estar relacionados às áreas de desmineralização promovida pela ciclagem de pH.

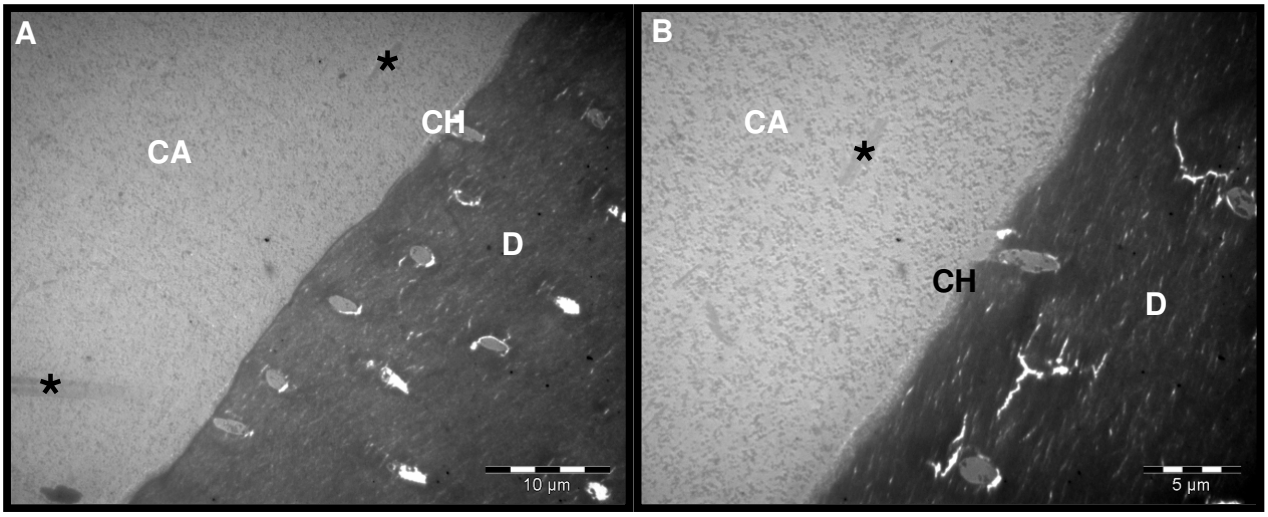


Figura 21 (700X e 1.100X)- 21A- representa o grupo do adesivo Clearfil Protect Bond sem desafio cariogênico em dentina; **21B-** adesivo Clearfil Protect Bond com desafio cariogênico em dentina (CA- camada de adesivos; CH- camada híbrida; D- dentina; *- partículas de fluoreto de sódio).

Na Figura 21A e 21B pode-se notar uma fina camada híbrida formada (CH) com aproximadamente 1 µm de espessura, camada adesiva (CA) e a dentina (D). O asterisco indica a presença das partículas do sal de fluoreto de sódio presente na composição do frasco “Bonding Resin”. Essas mesmas estruturas também podem ser notadas nas imagens da união com o esmalte (Figuras 21A e 21B). Não foi possível observar diferenças nas estruturas dentinárias submetidas ou não à ciclagem de pH.

Discussão

Estudos têm mostrado que materiais que contém e conseguem liberar fluoretos são capazes de interferir e até controlar o desenvolvimento de cárie tanto *in vitro* (Serra & Cury, 1992; Serra, 1995; Hara *et al*., 2002; Savarino *et al*., 2004; Exterkate *et al*., 2005;) e *in situ* (Basting *et al*., 2002; Yamamoto *et al*., 2005; Tenuta *et al*., 2005). Entretanto, em desafios cariogênicos com favorecimento da desmineralização, não tem sido possível evitar o desenvolvimento de cárie. (Hara *et al*., 2005; Pinto *et al*., 2009). O presente avaliou dois adesivos autocondicionantes contendo fluoreto sendo que o adesivo PB mostrou melhor desempenho em desafio cariogênico. A influência do material contendo brometo foi avaliada no estudo microbiológico e em determinadas condições o adesivo PB teve melhor resultado. Os resultados deste estudo foram considerados dentro de cada substrato dental, pois possuem características peculiares na progressão da doença cárie e os sistemas adesivos comportam-se de maneira diferente dependendo do tipo de desafio cariogênico (Hoppenbrouwers *et al*., 1987).

Os resultados do trabalho *in situ* mostraram melhor desempenho para o adesivo Clearfil Protect Bond em alguns níveis de profundidade mais superficiais em dentina e na profundidade de 20 µm em esmalte. Nestes casos, a microdureza dos tecidos foi maior quando utilizado o adesivo PB na comparação com o adesivo OP. Isso também pode ser expresso como menor perda mineral frente aos desafios cariogênicos, principalmente na camada mais superficiais da dentina e do esmalte (Imazato *et al*., 2005, Pinto *et al*., 2009). Nas distâncias estudadas em relação à parede da restauração em esmalte não se observou diferenças estatísticas significativas e esses resultados corroboram com os achados de Pinto *et al*., 2009. Esses dados mostram que talvez não houve formação de lesão de parede, pelo selamento promovido pelos adesivos no esmalte e isto pode também estar relacionado à progressão da cárie e ao processo de remineralização promovido pela saliva na diminuição da dissolução do esmalte em desafios cariogênicos na presença de fluoretos (Cury & Tenuta, 2009). A microdureza do

esmalte aumentou com relação à profundidades, sendo menor na profundidade de 20 µm para o adesivo PB e 20 e 40 µm para o OP. A perda mineral na região sub-superficial é a característica da lesões de cárie incipientes (Gilmour *et al*., 1990, Gilmour & Edmunds, 1998 e Torii *et al*., 2001).

Na análise de microdureza em dentina, observou-se uma menor dureza na distancia de 60 µm da parede cavitária, ou seja, na dentina mais próxima a restauração. Essa região de mensuração é a mais próxima da camada híbrida, formada no tecido dentinário. Com relação à profundidade, observou-se diferença estatística significativa nas profundidades de 20, 40 e 80 µm entre os adesivos, sendo a microdureza longitudinal maior para o adesivo PB. As médias na profundidade de 60 µm foram semelhantes entre os adesivos. A maior profundidade de desmineralização em dentina pode ter ocorrido pela progressão da cárie ser mais rápida, devido à composição do tecido (Marshall Jr *et al*., 1997). Notou-se também que a microdureza da dentina aumentou com o aumento da profundidade para os dois adesivos estudados.

Para analisar a extensão da lesão de cárie na porção interna do esmalte e dentina, as zonas de inibição de cárie próxima a área de união e lesões de parede foi utilizada além da microdureza interna, a microscopia de luz polarizada (MLP), a qual tem sido descrita em estudos anteriores (Hsu *et al*., 1998; Han *et al*., 2002; Hara *et al.,* 2005). A análise qualitativa da MLP em dentina mostrou um padrão diferente de formação da lesão de cárie, sendo que para o adesivo PB, que contém fluoreto e brometo, a lesão formou-se mais distante da interface restauradora, prevenindo a lesão de parede (Itota *et al.,* 2002; Hara *et al.,* 2005) De modo quantitativo, houve diferença estatisticamente significante entre os adesivos, sendo que o adesivo PB apresentou menor extensão da desmineralização. Esse achado concorda com os resultados obtidos na avaliação em microdureza longitudinal. Para a análise em esmalte, observou-se que o adesivo PB também resultou em menor extensão da lesão que o adesivo OP. Portanto, para ambos os substratos, a simples presença de fluoretos na composição de um adesivo não garante ação cariostática. O adesivo que contem

fluoreto de sódio e o componente brometo antibacteriano pareceu promover melhores resultados nas análises de microdureza e MLP. Entretanto, não mostrou capacidade de produzir zona de inibição da cárie adjacente à restauração e evitar a ocorrência de lesão (Itota *et al.,* 2002). Estudos mostram que a ação é maior nas porções mais superficiais e próximo à restauração. (Pinto *et al*., 2009; de Carvalho *et al*., 2009).

Para a contagem das colônias bacterianas obtidas dos dispositivos utilizados pelos voluntários, observou-se que em esmalte houve menor quantidade de Streptococcus totais e S. *mutans* quando a restauração foi feita com o adesivo PB. Já para os Lactobacillus não observou-se diferença significativa entre os adesivos. Em dentina, não se observou diferença estatística significativa nas superfícies restauradas com ambos os adesivos, tanto para S. totais quanto para S. *mutans*. O mesmo resultado foi obtido para a contagem de colônias de Lactobacilus nas superfícies dentinárias restauradas.

É importante ressaltar que a presença de fluoreto nos adesivos também pode influenciar os resultados da análise microbiológica. O uso de materiais restauradores que liberam fluoreto, como os cimentos de ionômero de vidro, promove aumento na concentração de fluoreto no biofilme dental (Benelli *et al*., 1993; Tenuta *et al*., 2005; Cenci *et al*., 2009) e uma menor quantidade de colônias de Streptococcus *mutans* formados (Benelli *et al*., 1993). Imazato *et al.* (2006) mostrou que o *primer* do adesivo Clearfil Protect Bond, que contem o brometo, tem uma forte ação antibacteriana contra S. *mutans* e Lactobacillus. Neste estudo, observou-se efeito do material que contem o monômero MDPB no primer-ácido e fluoreto de sódio no adesivo hidrofóbico apenas quando as restaurações foram feitas em esmalte. Nas imagens de MET, pode-se notar a presença de partículas de tamanho irregular que sugerem ser de fluoreto de sódio presente na composição do agente hidrofóbico (ou *Bond*) (Reis, 2005; Tay *et al*., 2002; Sano, 2006). Essas partículas têm sido mostradas e descritas em estudos anteriores que utilizaram MEV (Pinto *et al*., 2009).

O adesivo PB teve um desempenho significativo na MLP produzindo menor área de desmineralização. A interferência dos fluoretos nos processos de desmineralização e de remineralização (Featherstone *et al*., 1994) foi alvo deste estudo em todas as metodologias aplicadas e até na observação das imagens de MET (Reis, 2005; Tay *et al*., 2002; Sano, 2006). Assim, muita atenção tem sido dada aos materiais contendo fluoreto, principalmente aos adesivos pela sua posição estratégica na restauração (Hara *et al*.,2002). As propriedades antibacterianas e cariostáticas dos materiais restauradores são freqüentemente associadas com a quantidade de fluoreto liberado (Wiegand *et al*., 2006). As resinas compostas e sistemas adesivos podem conter fluoreto em várias formas como sais inorgânicos, vidros ou fluoreto orgânico. No entanto, não somente a quantidade de liberação de fluoreto, mas o tipo e tamanho das partículas fluoretadas, o tipo de resina e a porosidade do material podem ser importantes fatores que contribuem para a liberação de fluoreto. Essa liberação aumenta com a hidrofilicidade e as características ácidas dos monômeros (Wiegand *et al*., 2006). Três diferentes abordagens para o desenvolvimento de materiais que liberam fluoreto têm sido discutidas incluindo a adição de sais solúveis como o NaF ou SnF_2, sistemas de carga que liberam fluoreto ou fluoreto ligado a matriz (Arends *et al.,* 1995).

A incorporação de fluoreto inorgânico, como o NaF adicionado ao adesivo PB, tem resultado no aumento da liberação de fluoretos. A dispersão dos vidros lixiviáveis ou sais solúveis de fluoretos no monômero permitem a difusão dos fluoretos solúveis em água do material para o meio local. Entretanto, o fluoreto já é liberado durante a reação de polimerização, seguida por uma pequena quantidade de fluoreto liberado ao longo do tempo (Wiegand *et al*., 2006). Isso pode explicar parte do desempenho do adesivo PB, que promoveu menor perda mineral nas camadas mais superficiais. Estudos adicionais comparando a liberação de fluoretos e a ação dos brometos com a extensão da lesão de cárie formada são necessários para confirmação dessa especulação. Uma variedade de mecanismos está envolvida no efeito anticariogênico dos fluoretos, incluindo a

redução da desmineralização, a interferência na formação da película e biofilme dental e a inibição do crescimento bacteriano (Fejerskov & Clarkson, 1996; Featherstone *et al*., 1994; Mukai & Ten Cate, 2002).

O sistema adesivo PB apresenta fluoreto na solução do *bond* e brometo adicionado à molécula do monômero acídico MDP do *primer* (Imazato *et al*., 1995; 1999; 2005). A atividade antibacteriana destes adesivos, segundo estudos (Imazato *et al.,*1998, 2003b, 2005) estaria associada à acidez do *primer*. Na verdade, há uma combinação da atividade antibacteriana e da difusividade dos componentes (Imazato *et al*., 2005). O MDPB sintetizado do dodecilpiridíneo é um análogo de um amônio quaternário CPC e pode inibir o crescimento de bactérias. O amônio quaternário CPC é um forte bactericida frequentemente utilizado nos colutórios e dentifrícios (Mandell, 1998; Scheie, 1989). Relaciona-se os dados obtidos no estudo *in situ*, das análises microbilógicas e de extensão da desmineralização aos componentes adicionais ativos incluídos no adesivo e no *primer* (Imazato *et al.,* 1995, 1999, 2005). O efeito antibacteriano do componente do amônio quaternário acredita-se ser devido à ligação catiônica e hidrofílica com os componentes da parede celular, que destroem a função da membrana e, subseqüentemente, induzem ao vazamento do material citoplasmático (Scheie, 1989; Kourai *et al*., 1994). Além disso, segundo Imazato *et al*., (2009) o MDPB possui a capacidade de desinfetar a cavidade contendo bactérias residuais.

O adesivo OP levou a maior área de desmineralização, apesar de possuir fluoreto em sua composição. Assim, especula-se que o desempenho do material foi devido às características do próprio adesivo (Raws, 1991; Hara *et al*., 2005) e pelo tipo de fluoreto incorporado à partícula de carga, neste caso, partículas de fluoroaluminiosilicato. O adesivo OP é considerado autocondicionante de passo único e no momento da aplicação, a solução do adesivo deve fazer o papel de desmineralização (ácido), infiltração ("*primer*") e união ("*bond*") aos tecidos dentais, o que torna o procedimento adesivo limitado. Ele promove a formação da união com uma camada híbrida permeável e pouca duradoura (Koshiro *et al*., 2005). O fator relacionado a esse fato é que este

adesivo possui muita água em sua composição, tornando a união bastante prejudicada (Yoshida & Uno, 2004) e susceptível à degradação. Os adesivos autocondicionantes de passo único agem como membranas permeáveis permitindo a passagem de água pela interface restauradora, comprometendo assim, o desempenho clínico da restauração e levando à degradação precoce da união (Tay *et al*., 2004).

A liberação de fluoreto do adesivo contendo partículas de vidro de fluoroaluminiosilicato é semelhante à liberação ocorrida pelo cimento de ionômero de vidro. Para os cimentos ionoméricos, há uma alta liberação inicial nas primeiras 24 horas, devido à liberação imediata de fluoreto das partículas de vidro quando reagem com o ácido polialcenóico durante a reação de presa (Wiegand *et al*., 2006). Após essa alta liberação inicial, a liberação de fluoreto ocorre lentamente e a por prolongado tempo, isto ocorre quando os vidros são dissolvidos na água acidificada da matriz hidrogel (De Moor *et al*., 1996). Mas devemos levar em consideração que no cimento de ionômero de vidro ocorre uma reação com o ácido polialcenóico, que favorece a reação e que não ocorre nos adesivos. Para os sistemas adesivos estas partículas podem ficar encapsuladas na matriz polimerizada, não sendo possível sua liberação. O monômero presente neste adesivo, MAC10 consiste de uma longa cadeia de carbonos, fazendo com que este monômero também seja hidrófobo e refletindo na sua limitada dissolução em água (Van Landuyt *et al*., 2007). Embora o adesivo OP forme uma camada permeável, que facilitaria a liberação de fluoretos, a retenção das partículas na matriz pode prejudicar a liberação de fluoretos. Outros autores acreditam que estas partículas possam ser liberadas ao longo do tempo, talvez pela degradação hidrolítica e solubilização do polímero (Wiegand *et al*., 2006).

Para o estudo *in vitro*, o ensaio de resistência de união mostrou que a ciclagem de pH não afetou os resultados em esmalte. Além disso, os adesivos produziram semelhante resistência de união em esmalte. Alguns estudos mostraram que o sistema adesivo contendo o fluoreto e o monômero MDPB tem potencial na inibição de cárie secundária ao redor de restaurações (Imazato *et al.,*

2003; Yoshima *et al*., 2004, Hara *et al.,* 2002) e a presença de fluoreto no adesivo contribui para a prevenção de cárie secundária, mas não interfere na resistência de união (Shinohara *et al*., 2006b). A adesão de sistemas autocondicionantes ao esmalte ainda é discutível, principalmente quanto a sua efetividade e a dúvida ainda permanece quando se compara com a adesão feita após o condicionamento com ácido fosfórico 37% por 15 segundos (Shinohara *et al*., 2006a). Em dentina, a resistência de união também não foi afetada pela ciclagem de pH. As dimensões dos espécimes (palito) em esmalte e em dentina não permitiram que o desafio cariogênico danificasse totalmente as amostras. Assim, não houve redução da resistência de união. Isso não ocorreu nem mesmo em dentina, que é um tecido mais susceptível a desmineralização. Na comparação entre os adesivos, o material PB mostrou maior resistência de união e isso pode ser atribuído a adesão química com o tecido dentinário promovido pelo MDPB, além da hibridização da dentina (Van Landuyt *et al*., 2007). Segundo estudo realizado por Yoshida *et al. (*2004) este monômero seria capaz de formar cadeias iônicas fortes com o cálcio do tecido dentinário, estabilizando a adesão e aumentando a resistência dessa união.

Os padrões de fratura mostraram alta ocorrência de fratura na camada de sistema adesivo, com exceção do adesivo PB em esmalte e em dentina durante ciclagem de pH. A fratura resultante disso foi a predominância da falha no tecido dental, que é resultado do enfraquecimento superficial que pode ter sido produzido pela ciclagem. Os adesivos mais simplificados tem se mostrado menos duráveis e menos resistentes mecanicamente, enquanto os adesivos de 3 passos com condicionamento ácido separado e adesivos autocondicionantes de 2 passos continuam mostrando melhor desempenho clínico (Breschi *et al*., 2007). Fraturas na área de união também foram freqüentes, mostrando que a resistência de união foi corretamente mensurada.

O conhecimento do processo adesivo à dentina em diferentes condições de mineralização poderia melhorar a longevidade das restaurações. A maioria dos estudos mostra a durabilidade e a qualidade da adesão dentinária à

dentina sadia, no entanto, as condições clinicas são adesão à dentina desmineralizada ou hipermineralizada (Ogawa *et al.,* 1983). A composição inorgânica da dentina é suscetível a desmineralização, sendo o pH crítico aproximadamente 6,7. (Hoppenbrouwers *et al*., 1987). Com a avaliação da resistência de união tem se observado pequenas áreas com menos de 1 mm^2 e áreas de dentina hipermineralizadas ou demineralizadas (Marshall Jr *et al.,* 1997). Então, muitos estudos têm mostrado que a resistência de união à dentina desmineralizada e hipermineralizada pode ser igual ou menor a que a dentina sadia (Perdigão *et al.;* 1994). Isto ocorre porque as mudanças no conteúdo mineral e também no padrão morfológico da dentina afetam a adesão (Marshall Jr *et al.,* 1997).

As imagens de MET mostram a morfologia da área de união com os tecidos dentais para cada grupo estudado. Em esmalte, verificou-se a adaptação e o contato do adesivo com os prismas do tecido, e como descrito por Hannig *et al*. (2002), a união somente pode ser vista no nível nanométrico. Espaços vazios próximos a área de união podem ser relacionado à presença de água + solventes, às áreas em que monômeros foram dissolvidos e eliminados durante a preparação dos espécimes pata TEM ou à falta de infiltração, adaptação e do contato do adesivo com a estrutura dental. O espaços vazios na subsuperfície e na parte mais interna das amostras analisadas são relacionadas à desmineralização produzida pela ciclagem de pH, que favorece a desmineralização.

Em dentina, houve formação de camada híbrida para ambos adesivos, às vezes mais espessa para o adesivo OP, com aproximadamente 2 µm de espessura. A espessura média da camada híbrida para o adesivo PB foi de 1 µm. Observou-se também a penetração do adesivo nos túbulos dentinários formando os *tags* de resina no interior dos túbulos. O contato dos adesivos com o tecido dentinário foi contínuo e uniforme com formação da hibridização. No esmalte, como comentado anteriormente, os adesivos autocondicionantes ainda são questionados quanto ao seu uso sem a aplicação prévia de ácido fosfórico, entretanto em dentina, eles são muito recomendados e apresentam maior

durabilidade, como comprovado em uma série de estudo de Reis *et al.* (2004, 2005, 2007) que avaliam a resistência de união e o padrão de nanoinfiltração apresentado pelos materiais após longo tempo de armazenamento em água e em outros meios.

Conclusões

Baseado nos dados obtidos e nos resultados da análise estatística, conclui-se que:

No estudo *in situ*:

1- A microdureza longitudinal Knoop do esmalte foi maior para o adesivo PB somente na primeira profundidade (20 µm). Na dentina, ela foi maior também para o adesivo PB nas profundidades 20, 40 e 80 µm da superfície da amostra;

2- A extensão da desmineralização no esmalte e na dentina próximas às restaurações e analisadas por meio da microscopia de luz polarizada foram menores para restaurações confeccionadas com o adesivo PB;

3- A quantidade de colônias bacterianas contadas a partir das amostras de biofilme foi menor somente para as amostras em esmalte com restaurações feitas com o adesivo PB para os Streptococus totais e *mutans.*

No estudo *in vitro*:

1- A resistência de união por micro-tração em esmalte foi semelhante entre os adesivos e a ciclagem de pH não produziu efeito na resistência de união em nenhum dos tecidos avaliados.

2- A resistência de união do adesivo PB em dentina foi maior que o adesivo OP;

3- A análise em microscopia eletrônica de transmissão mostrou que os adesivos tem capacidade de produzir união ao esmalte e à dentina, com processo de hibridização.

Referências*

Arends J, Dijkman GE, Djikman AG. Review of fluoride release and secondary caries reduction by fluoridating composites. Adv Dent Res. 1995; 9: 367-76.

Asmussen E, Munksgaard EC. Bonding of restorative materials to dentine: status of dentine adhesives and impact on cavity design and filling techniques. Int Dent J. 1998; 38: 97-104.

Avery J K. Dentin. Orban's Oral Histology and Embriology, 11 th edn, ed. N. Bhaskar. Mosby Year Book, Chicago 1990, p 106-138.

Basting RT, Serra MC, Rodrigues JR. *In situ* microhardness evaluation of glass-ionomer/composite resin hybrid materials at different post-irradiation times. J Oral Rehabil. 2002; 29: 1187-95.

Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AR. Jr, Cury JA. *In situ* anticariogenic potencial of glass-ionomer cement. Caries Res. 1993; 21: 280-88.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, Dorigo E S.Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface Dent Mater. 2007; 24(1): 90-101.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res. 1955; 34(6): 849-53.

Caldwell RC, Muntz ML, Gilmore RW, Pigman W. Microhardness studies of intact surface enamel. J Dent Res. 1957; 36(5): 732-8.

* De acordo com a UNICAMP/FOP. Baseado no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com Medline

Cardoso PE, Sadek FT, Goracci C, Ferrari M. Adhesion testing with the microtensile method: effects of dental substrate and adhesive system on bond strength measurements. J Adhes Dent. 2002; 4(4): 291-7.

Çehereli ZC. Antimicrobial properties of self-etching primer-bonding systems. Oper Dent. 2003; 28 (2): 143-148.

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(2):97-102.

Cox C F, White K C, Ramus D L, Farmer J B, Snuggs H M. Reparative dentin: factors affecting its deposition. Quintenssence International 1992; 23: 257-270.

Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN et al. Odontologia Restauradora. São Paulo, Santos, 2001; 33-68.

Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. *In situ* study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. Braz Dent J. 2001; 12(2): 101-4.

Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. Caries Res. 1997; 31(5): 356-60.

Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and frutose. Caries Res. 2000; 34: 491-7.

Cury JA; Tenuta L M A. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment . Adv Dent Res 2008; 20(1): 13-16.

Cury JA; Tenuta L M A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating earling caries lesions? Braz Oral Res 2009; 23 (1): 23-30.

De Carvalho FG, Puppin-Rontani RM, Soares LE, Santo AM, Martin AA, Nociti-Junior FH.Mineral distribution and CLSM analysis of secondary caries inhibition by fluoride/MDPB-containing adhesive system after cariogenic challenges. J Dent. 2009; 37(4):307-14.

De Moor RJ, Verbeeck RM, De Maeyer EA. Fluoride release profiles of restorative glass ionomer formulations. Dent Mater 1996; 12: 88-95.

De Munck J, Van Meerbeek B, Satoshi I, Vargas M, Yoshida Y, Armstrong S et al. Microtensile bond strengths of one- and two-step self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. Am J Dent. 2003; 16(6): 414-20.

Dijkman A, Huizinga E, Ruben J, Arends J. Remineralization of human enamel in situ after 3 months: the effect of not brushing versus the effect of an F dentifrice and an F-free dentifrice. Caries Res 1990; 24: 263-266.

Dijkman AG, Schuthof J, Arends J. *In vivo* remineralization of plaque-induced initial enamel lesions - a microradiographic investigation. Caries Res. 1986; 20: 202-8.

Edgar W M, Higham S M. Role of saliva in caries models. Adv Dent Res 1995; 9: 235-238.

Exterkate RAM, Damen JJM, Ten Cate JM. Effect of fluoride-releasing filling materials on underlying dentinal lesions in vitro. Caries Res. 2005; 39: 509-13.

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

Featherstone JDB et al. Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. In: Leach AS, Edgar WM. Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth. Oxford: IRL Press; 1986. p. 243-50.

Fejerskov O, Clarkson BH. Dynamics of caries lesion formation. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA, editors. Fluoride in Dentistry. Copenhagen: Munksgaard; 1996. p.187-213.

Fushida CE, Cury JA. Estudo *in situ* da freqüência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. Rev Odontol Univ São Paulo 1999; 13(2): 127-34.

Gilmour ASM, Edmunds DH. The polarized light microscope appearance of caries-like lesions adjacent to restored cavities in the crowns and roots of extracted human teeth. J Oral Rehabil. 1998; 25: 929-39.

Gilmour ASM, Edmunds DH, Dummer MH. 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. 1990; 17: 573-8.

Gwinnett AJ. The ultrastructure of the "prismless" enamel of permanent human teeth. Arch Oral Biol. 1967; 12(3): 381-8.

Gwinnett AJ, Kanca J, 3rd. Micromorphological relationship between resin and dentin *in vivo* and *in vitro*. Am J Dent. 1992; 5(1): 19-23.

Hamilton IR, Bowden GH. Effect of fluoride on oral microorganisms. In: Thylstrup Fejerskov O, Silverstone LM. Fluoride in Dentistry. Muksgaard: [s.n.]; 1988, p.77-103.

Han L, Cruz E, Okamoto A, Iwaku M. A comparative study of fluoride-releasing adhesive resin materials. Dent Mat J. 2002; 21: 9-19.

Hannig M, Bock H, Bott B, Hoth-Hannig W. Inter-crystallite nanoretention of self-etching adhesives at enamel imaged by transmission electron microscopy. Eur J Oral Sci. 2002; 110(6): 464-70.

Hara AT, Magalhães CS, Serra MC, Rodrigues Jr AL. Cariostatic effect of fluoride-containing restorative systems associated with dentifrices on root dentin. J Dent. 2002; 30: 205-12.

Hara AT, Queiroz CS, Giannini M, Cury JA, Serra MC. Influence of the mineral content and morphological pattern of artificial root caries lesion on composite resin bond strength. Eur J Oral Sci. 2004, 112(1): 67-72.

Hara AT, Queiroz CS, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. Eur J Oral Sci. 2005; 113: 245-50.

Hashimoto M, Ohno H, Yoshida E, Hori M, Sano H, Kaga M et al. Resin-enamel bonds made with self-etching primers on ground enamel. Eur J Oral Sci. 2003; 111(5): 447-53.

Hayacibara MF, Queiroz CS, Tabchoury CPM, Cury JA. Fluoride and aluminium in teas, tea-based beverages and herbal-teas. Rev Saúde Pública. 2004, 38(1): 100-105.

Hayakawa T, Kikutake K, Nemoto K. Influence of self-etching primer treatment on the adhesion of resin composite to polished dentin and enamel. Dent Mater 1998; 14(2): 99–105.

Herkströter FM, 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. 1991; 25: 317-22.

Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The demineralization of human dental roots in the presence of fluoride. J Dent Res., 1987; 66(8): 1370-1374.

Hsu CY, Donly KJ, Drake DR, Wefel JS. Effects of aged fluoride-containing restorative materials on recurrent root caries. J Dent Res. 1998; 77: 418-25.

Ibarra G, Vargas MA, Armstrong SR, Cobb DS. Microtensile bond strength of self-etching adhesives to ground and unground enamel. J Adhes Dent. 2002; 4(2): 415-424.

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. Dent Mat. 2003; 19: 449-57.

Imazato S, Ebi N, Takahashi Y, Kaneko T, Ebisu S, Russell RRB. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. Biomaterials. 2003a; 24: 3605-9.

Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russell RR, Kaneko T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. Biomaterials 1999; 20(9): 899-903.

Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of and adhesive resin containg antibacterial monomer MDPB. Dent Mat. 2003b; 19(4): 313-9.

Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters MC. *In vitro* antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond. Dent Mat. 2005. No prelo.

Imazato S, Kuramoto A, Takahashi Y, Ebisu S, Peters M. *In vitro* antibacterial effects of the dentin primer of Clearfil Protect Bond 2006; Dent Mat 22: 527-532.

Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. J Dent Res. 1994; 73(10): 1641-5.

Imazato S, Russell RRB, McCabe JF. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. J Dent. 1995; 23(3): 177-81.

Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containning antibacterial monomer methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. J Oral Rehabil. 2001; 28(4): 314-9.

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; 29: 523-7.

Itthagarun A, King NM, Wefel JS, Tay FR, Pashley DH. The effect of fluoridated and non-fluorited rewetting agents on in vitro reccurrent caries. J Dent. 2001; 29: 225-73.

Kim JS, Cho BH, Lee IB, Um CM, Lim BS, Oh MH, et al. Effect of the hydrophilic nanofiller loading on the mechanical properties and the microtensile bond strength of an ethanol-based one-bottle dentin adhesive. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 72(2): 284–91.

Kohler B, Bratthall D. Practical method to facilitate stimulation of Streptococcus mutans levels in saliva. J Clinical Microbiology 1979, 9(5): 584-8.

Koshiro K, Sidhu SK, Inoue S, Ikeda T, Sano H. New concept of resin-dentin interfacial adhesion: the nanointeraction zone. J Biome Mater Res. 2006; 77:401-8.

Koulorides T, Chien MC. The ICT *in situ* experimental model in dental research. J Dent Res. 1992; 71: 822-8.

Koulorides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housil T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. J Oral Pathol. 1974; 3: 185-95.

Kourai H, Hasegawa Y, Goto S, Nakagawa K. Bacterioclastic action of dodecypyridinium iodide against Escherichia coli K12W3110. J Antibact Antifung Agents. 1994; 22: 461-8.

Lobo MM, Gonçalves RB, Pimenta LA, Bedran-Russo AK, Pereira PN. *In vitro* evaluation of caries inhibition promoted by self-etching adhesive systems containing antibacterial agents. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2005; 75(1):122-7.

Mandell ID. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. J Clin Periodontol. 1988; 15: 488-98.

Marsh PD, Bradshaw DJ. The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communites *in vitro*. J Dent Res. 1990; 69: Special Issue, 668-71.

Marshall Jr G W; Marshall S J; Kinney J H; Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. Jornal of Dent 1997; 25(6): 441-458.

Meckel AH, Griebstein WJ, Neal RJ. Structure of mature human dental enamel as observed by electron microscopy. Arch Oral Biol. 1965; 10(5): 775-83.

Mjör IA. Glass-ionomer cement restorations and secundary caries: a preliminary report. Quintessence Int. 1996; 27: 171-4.

Mjor I A, Fejerskov O. Histology of the human tooth, 2 nd edn. Munksgaard, Copenhagen 1979.

Murrer RD, Decico HM, Cury JA. Efeito de dentifrício fluoretado no desenvolvimento de cárie secundária - Estudo in situ. Soc Bras Pesqui Odontol. 1994; 11: 12-8.

Nagamine M, Itota T, Torii Y, Irie M, Staninec M, Inoue K. Effect of resin-modified glass ionomer cements on secondary caries. Am J Dent. 1997; 10(4): 173-178.

Nakaoki Y, Nikaido T, Pereira P N, Inokoshi S, Tagami J. Dimensional changes of demineralized dentin treated with HEMA primers. Dent Mater 2000;16(6):441–6.

Nobre dos Santos M, Cury JA. Dental plaque fluoride is lower after discontinuation of water fluoridation. Caries Res. 1988; 22(5): 316-7.

Ogawa, K., Yamashita, Y., Ichijo, T. and Fusayama, T.The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. Journal of Dental Research 1983; 62, 7-10.

Ohgushi K; Fusayama T. Electron microscope structure of the two layers of carious dentin. J Dent Res 1975; 54: 1019-1026.

Perdigão J, Lopes L, Lambrechts P, Leitao J, Van Meerbeek B, Vanherle G. Effects of a self-etching primer on enamel shear bond strengths and SEM morphology. Am J Dent. 1997; 10(3): 141-6.

Perdigão J, Swift EJ, Denehy GE, Wefel JS, Donly KJ. *In vitro* bond strengths and SEM evaluation of dentin bonding systems to different dentin substrates. J Dent Res 1994; 73: 44-55.

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; 23(3):308-16.

Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems.Eur J Oral Sci 1997; 105(2):97–116.

Pinto CF, Leme AF, Ambrosano GM, Giannini M. Effect of a fluoride- and bromide-containing adhesive system on enamel around composite restorations under high cariogenic challenge *in situ*. J Adhes Dent. 2009; 11(4):293-7.

Rawls HR. Preventive dental materials: sustained delivery of fluoride and other therapeutic agents. Adv Dent Res. 1991; 5: 50-5.

Reis AF, Giannini M, Ambrosano GMB, Chan DCN. The effects of filling technique and a low-viscosity composite liner on bond strength to class II cavities. J Dent. 2003; 31(1): 59-66.

Reis AF. Avaliação da resistência de união, nanoinfiltração e propriedades físicas de sistemas adesivos: comportamento ao longo do tempo. [Tese]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2005.

Reis AF, Arrais CAG, Novaes PD, Carvalho RM, De Goes MF, Giannini M. Ultramorphological analysis of resin-dentin interfaces produced with waterbased single-step and two-step adhesives. Nanoleakage expression. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 2004; 71B(1): 90-98.

Reis AF, Giannini M, Kavaguchi A, Soares CJ, Line SRP. Comparison of microtensilebond strenght to enamel and dentin of human, bovine and porcine teeth. J Adhes Dent. 2004; 6(2): 117-21.

Reis AF, Giannini M, Pereira PNR. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin–dentin interfaces produced by different bonding strategies. Dental Materials 2007; 23: 1164-1172.

Rosalen PL, Bowen WH, Pearson SK. Effect of cooper co-crystallized with sugar on caries development in desalivated rats. Caries Res 1996; 30: 367-372.

Sano H. Factors affecting the acquisition and maintenance of the hybrid layer on dentin. In: International American Dental Research, 2006. IADR, Australia, Brisbane [Short comunication]. Disponível em: URL: http://www.iadr.com/ [2006 Jun 12].

Santos AJ, Giannini M, Paulillo L.A.M.S, Lovadino JR, Carvalho RM. Effect of irradiation mode and filling technique on resin/dentin bonding strength in class I cavities. Braz Oral Res. 2004; 18(3):260-5.

Savarino L, Breschi L, Tedaldi M, Ciapetti P, Tarabussi C, Greco M, et al. Ability of restorative and fluoride releasing materials to prevent marginal dentine demineralization. Biomaterials 2004; 25: 1011-7.

Serra MC. Estudo in vitro do desenvolvimento de cárie em esmalte adjacente a materiais restauradores contendo flúor. [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru/ USP; 1995.

Serra MC, Cury JA. The *in vitro* effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. Quintessence Int. 1992; 23(2): 143-47.

Sharawy M, Yaeger JA. Esmalte. In: Braskar SN. Histologia e Embriologia de Orban. São Paulo: Artes Médicas; 1989. p. 51 -110.

Scheie AA. Modes of action of currently known chemical anti-plaque agents other than chlorhexidine. J Dent Res. 1989; 68: 1609-16.

Shimada Y, Iwamoto N, Kawashima M, Bunow MF, Tagami J. Shear bond strength of current adhesive systems to enamel, dentin and dentin-enamel junction region. Oper Dent. 2003b; 28(5): 585-90.

Shimada Y, Senawongse P, Harnirattisai C, Burrow MF, Nakaoki Y, Tagami J. Bond strength of two adhesive systems to primary and permanent enamel. Oper Dent. 2002a; 27(4):403-9.

Shimada Y, Tagami J. Effects of regional enamel and prism orientation on resin bonding. Oper Dent. 2003a; 28(1):20-7.

Shimada Y, Yamaguchi S, Tagami J. Micro-shear bond strength of dual-cured resin cement to glass ceramics. Dent Mater. 2002b; 18(5): 380-8.

Shinkai RS, Cury AA, Cury JA. *In vitro* evaluation of secondary caries development in enamel and root dentin around luted metallic restoration. Oper Dent. 2001; 26(1):52-9. Erratum in: Oper Dent. 2002; 27(1): 104.

Shinohara MS, de Oliveira MT, Di Hipólito V, Giannini M, de Goes MF. SEM analysis of the enamel patterns ppromoted by acidic monomers and phosphoric acids. J Appl Oral Sci. 2006a;14(6): 427-435.

Shinohara MS, Yamauti M, Inoue G, Nikaido T, Tagami J, Giannini M, de Goes MF. Evaluation of antibacterial and fluoride –releasing adhesive system on dentin-Microtensile Bond Strength and acid-base challenge. Den Mat J 2006b; 25(3): 545-552.

Tay FR, Pashley DH. Dental adhesives of the future. J Adhes Dent 2002; 4: 91-103.

Tay FR, King NM, Chan KM, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrative simultaneously? J Adhes Dent. 2002; 4: 255-69.

Tay FR, Lai CNS, Chersoni S, Pashley DH, Mak YF, Suppa P et al. Osmotic blistering in enamel bonded with One-step self-etch adhesives. J Dent Res. 2004; 83(4): 290-5.

Ten Cate AR. Oral Histology: Development, Structure and Function. St. Louis: Mosby; 1994. p. 169-217.

Ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. Caries Res. 1982; 16(3): 201-10.

Ten Cate JM. Patient selection and appliance design in intra-oral models. J Dent Res. 1992; 71: 908-12.

Ten Cate JM, Van Duimem RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. J Dent Res. 1995; 74(6): 1266-71.

Tenuta LMA, Ribeiro CCC, Gonçalvez NCV, Cury AADB, Aires CP, Tengan C et al. The short-term *in situ* model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. J Dent. 2005; 33: 491-7.

Torii Y, Itota T, Okamoto M, Nakabo S, Nagamine M, Inoue K. Inhibition of artificial secundary caries in root by fluoride-releasing restorative materials. Oper Dent. 2001; 26(1): 36-43.

Tyldesley WR. The mechanical properties of human enamel and dentine. Br Dent J. 1950; 269-78.

Van Landuyt K L, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Paul Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives Biomaterials 2007; 28: 3757–3785.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. Oper Dent. 2003; 28(3): 215-35.

Vieira AEM, Delbem ACB, Sassaki, KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. Caries Res. 2005; 39: 514-20.

Walter R, Duarte WR, Pereira PN, Heymann HO, Swift EJ Jr, Arnold RR. *In vitro* inhibition of bacterial growth using different dental adhesive systems. Oper Dent. 2007;32(4):388-93.

Walter R, Duarte WR, Pereira PN, Swift EJ Jr, Heymann HO, Arnold RR. Effect of resin adhesive systems on root caries formation *in vitro*. Quintessence Int. 2008; 39(1):33-7.

White JM, The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth. Adv Dent Res. 1995; 9(3): 175-93.

Wiegand A, Wolfgang B, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials- Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. Dent Mat. 2006 No prelo.

Wilson NHF, Burke FJT, Mjör IA. Reasons for placement and replacement of restorations of direct restorative materials by selected group of practioners in the United Kingdom. Quintessence Int. 1997; 28: 245-8.

Yamamoto K, Arai K, Fukazawa K, Fukui K, Nagamatsu K, Kato K et al. Effect of plaque fluoride released from a glass-ionomer cement on enamel remineralization *in situ*. Caries Res. 2005; 39: 157-60.

Yoshida E, Nagakame K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H et al. comparative study on adhesive performance of functional monomers. J Dent Res. 2004; 83: 454-458.

Yoshida E, Uno S. Voids formation along the bonding interface between a smeared dentin surface and all-in-one adhesives. Dent Mater J. 2004; 23(4): 643-9.

Zero DT. *In situ* caries models. Adv Dent Res 1995; 9(3): 214-230.

Anexo 1

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da união e dos tecidos dentais (esmalte/dentina) adjacentes às restaurações com sistemas adesivos contendo fluoreto após desafios cariogênicos**", protocolo nº **140/2006**, dos pesquisadores **MARCELO GIANNINI e CRISTIANE FRANCO PINTO**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/10/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Analysis of interface and dental tissues (enamel/dentin) around restorations with adhesives systems containing fluoride after cariogenic challenge**", register number **140/2006**, of **MARCELO GIANNINI and CRISTIANE FRANCO PINTO**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 18/10/2006.

Profa. Cecília Gatti Guirado
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

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

Anexo 2

Título da pesquisa:

"Análise da união e dos tecidos dentais (esmalte/dentina) adjacentes às restaurações com sistemas adesivos contendo fluoreto após desafios cariogênicos in situ e in vitro".

Pesquisadores responsáveis: *Prof. Dr. Marcelo Giannini e doutoranda Cristiane Franco Pinto.*

Atenção: *Se você está disposto a participar da pesquisa, solicitamos o preenchimento do formulário abaixo. Os pesquisadores realizarão a contagem de S. mutans e determinação do fluxo salivar. Além disso, serão realizadas radiografias interproximais para complementar o diagnóstico de cárie dental. Será realizada uma adequação do meio bucal, ou seja, serão realizados procedimentos como remoção de cálculo supra-gengival, profilaxia, recontorno e polimento das restaurações presentes. Serão realizados modelos de estudo da arcada superior de cada voluntário. Todos receberão instruções de higiene oral. Os voluntários não receberão nenhum auxílio financeiro. Cada voluntário receberá um kit contendo uma escova dental macia, um dentifrício fluoretado, um fio dental. Deverão utilizar um dispositivo intra-oral palatino (semelhante a um aparelho ortodôntico, porém sem fio) e gotejar uma solução de sacarose oito vezes ao dia. Esta solução não causa cárie em seus dentes e nenhum prejuízo à saúde. A cada coleta de placa dental, os voluntários deverão comparecer à Faculdade no horário marcado sem escovar os dentes e a pesquisadora oferecerá um café-da-manhã variado. Esta é uma pesquisa científica séria e necessita da colaboração dos voluntários realizando os procedimentos de maneira adequada.*

Questionário para determinação da inclusão e exclusão do voluntário.

( ) Residente em Piracicaba.

( ) Possui alguma doença sistêmica, qual?_____

( ) Faz algum tratamento dentário, qual?_____

( ) Fez uso de antibiótico nos últimos dois meses

( ) Uso de outro medicamento, qual?_____

( ) Uso de colutório, bochechos, contendo algum tipo de antibacteriano ou fluoreto

( ) Fumante

Análises

Fluxo salivar (Mínimo- 0,2 mL/min)_____

Contagem S. mutans (>10^5ufc/mL)_____

Exame clínico

Radiografias interproximais_____

Remoção de cálculo supra-gengival ( )

Profilaxia ( )

Recontorno e repolimento de restaurações ( ) _____

Instrução de técnica de escovação ( )

De acordo,

Piracicaba,

_____

R. G. e nome completo por extenso e Assinatura

Anexo 3

Formulários para consentimento após informação

"Análise da união e dos tecidos dentais (esmalte/dentina) adjacentes às restaurações com sistemas adesivos contendo fluoreto após desafios cariogênicos in situ e in vitro".

Instruções aos voluntários

1- O estudo será dividido em 2 etapas. Sendo cada etapa de 14 dias e com um intervalo de 10 dias entre elas.

2- A água ingerida deverá ser necessariamente de abastecimento público de Piracicaba.

3- Durante o período do experimento e 10 dias antes de cada etapa a pesquisadora vai fornecer dentifrício fluoretado e os voluntários não utilizarão nenhum outro produto contendo fluoreto.

4- Os dispositivos intra-orais deverão ser utilizados todos os dias, inclusive para dormir, exceto durante as refeições e higiene oral, sendo nesses períodos os aparelhos acondicionados na caixa plástica fornecida, contendo no seu interior um algodão umedecido.

5- Para a escovação o voluntário deve remover o dispositivo da boca e após a higienização dos dentes recolocá-lo. O voluntário deve se comprometer a escovar somente com o dentifrício fornecido por nós e três vezes ao dia.

6- Será fornecida solução de sacarose 20% em frasco conta-gotas. O voluntário deverá gotejar sacarose oito vezes ao dia sobre as amostras, esperar 5 minutos e colocá-los na boca. O gotejamento será de 8X ao dia e deverá ser feito às 8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00 e 21:00.

Anexo 4

Termo de Consentimento livre e esclarecido

Nome do voluntário:_____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Cristiane Franco Pinto (aluna de doutorado da área de Dentística) e Prof. Dr. Marcelo Giannini (Orientador) objetivando firmar acordo escrito mediante o qual o voluntário da pesquisa autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1-Título do trabalho experimental

"Análise da união e dos tecidos dentais (esmalte/dentina) adjacentes às restaurações com sistemas adesivos contendo fluoreto após desafios cariogênicos in situ e in vitro".

2-Objetivo:

Este projeto de pesquisa pretende avaliar os efeitos dos fluoretos e agente antimicrobiano na forma de MDPB em condições orais com alto risco à cárie dental após desafio cariogênico *in situ* através de análise microbiológica da placa, microdureza Knoop e microscopia de luz polarizada.

3- Justificativa:

Atualmente, os sistemas adesivos têm sido modificados para uma melhora na adesão aos tecidos dentais, mas pouco se sabe sobre os efeitos dos adesivos autocondicionante frente a desafios cariogênicos e se os componentes adicionais nos adesivos são eficazes para evitar o desenvolvimento de cárie em regiões de interface.

4- Procedimento da fase experimental:

O estudo *in situ* constituirá de duas fases de 14 dias, na qual participarão 14 voluntários adultos utilizando dispositivos intra-orais contendo blocos de esmalte e/ou dentina bovinos.

Os voluntários utilizarão os dispositivos palatinos contendo8 amostras, 6 restauradas com os adesivos Clearfil Protect Bond ou One-up Bond F e 2 sem restaurações (controle).

Os voluntários gotejarão uma solução de sacarose 20% oito vezes ao dia, simulando o desafio cariogênico. O voluntário será orientado para colocar cada gota da solução exatamente na superfície da tela plástica da amostra, sem tocá-la mantendo o dispositivo no recipiente contendo algodão umedecido, durante 5 minutos antes de levá-lo à boca.

Todos os voluntários deverão escovar os dentes com dentifrício fluoretado Sorriso Fresh três vezes ao dia, sendo que para escovar a face vestibular devem estar com o aparelho e as demais faces sem aparelho. Para o bochecho final deve estar com o aparelho na boca.

Será feito um intervalo de 10 dias entre as fases para eliminar possível efeito residual dos mesmos. Ao final de 14 dias, serão realizadas a coleta e análise do biofilme dental, as amostras serão removidas e analisadas por Microscopia de luz polarizada e Microdureza Knoop.

5- Desconfortos ou riscos esperados e benefícios

Os voluntários poderão apresentar discreta halitose durante o período experimental, o que poderá ser atenuado com adequada higiene oral bem como limpeza do dispositivo. O uso da sacarose será apenas como gotas sobre as amostras presentes nos dispositivos intra-orais, não implicando em qualquer aumento de cárie dental nos voluntários. O dispositivo intra-oral pode causar um leve desconforto, que é semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Os voluntários utilizarão durante o período da pesquisa apenas dentifrício fluoretado. Serão orientados a realizarem uma melhor higiene bucal e, além disso, eles continuarão ingerindo água de abastecimento de Piracicaba, que é fluoretada. Em adição, os voluntários são altamente conscientizados por serem estudantes de Odontologia e entenderem a importância deste trabalho. O

benefício será um auxílio indireto, contribuindo para a realização deste projeto e para a ciência como um todo.

6- Forma de acompanhamento e assistência

Haverá acompanhamento quanto ao consumo de açúcar e melhora da higienização bucal. Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição dos voluntários para qualquer ajuste no aparelho intra-oral a fim de minimizar qualquer desconforto.

7- Garantia de esclarecimentos

O voluntário tem garantia de que receberá resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Também os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo continuar participando. Qualquer dúvida ou problema com o dispositivo intra-oral, por favor, comunicar-se com a maior brevidade possível.

Tel.: 3412-5340 (Laboratório de Dentística)

3412-5338 (Prof. Marcelo)

9243-2156 (Cristiane)

8- Retirada do consentimento

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo de ordem pessoal-profissional com os responsáveis com a pesquisa.

9- Garantia de sigilo

Os pesquisadores asseguram a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

10- Formas de ressarcimento

Como a remoção dos aparelhos deve ser feita em jejum para coleta do biofilme dental, será oferecido café-da-manhã.

11- Formas de indenização

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

Eu_____

certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela aluna de doutorado Cristiane Franco Pinto e Prof. Dr. Marcelo Giannini, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, em mim.

Piracicaba, ___ de março de 2007.

Nome (por extenso):_____

Assinatura:_____

1ª via: Instituição

2ª via: Voluntário