



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MARIA DENISE RODRIGUES DE MORAES

EFEITO DO ENVELHECIMENTO DE RESTAURAÇÕES DE CIMENTO DE
IONÔMERO DE VIDRO NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA:

ESTUDO *in situ*

FORTALEZA

2010

MARIA DENISE RODRIGUES DE MORAES

EFEITO DO ENVELHECIMENTO DE RESTAURAÇÕES DE CIMENTO DE IONÔMERO DE
VIDRO NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA: ESTUDO *in situ*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

FORTALEZA

2010

M822e Moraes, Maria Denise Rodrigues de

Efeito do envelhecimento de restaurações de cimento de ionômero de vidro na desmineralização do esmalte e dentina: estudo *in situ* / Maria Denise Rodrigues de Moraes. – Fortaleza-Ce, 2010.

49f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Cárie Dentária 2. Cimentos de Ionômeros de Vidro 3. Dentifrícios 4. Flúor I. Rodrigues, Lidiany Karla Azevedo (Orient.) II. Título.

CDD: 617.601

MARIA DENISE RODRIGUES DE MORAES

EFEITO DO ENVELHECIMENTO DE RESTAURAÇÕES DE CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA: ESTUDO in situ

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em: __/ __/ __

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. Haroldo César Pinheiro Beltrão

Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP

Dedico este trabalho a Deus, pela minha vida.

Aos meus pais, Josualdo e Raimunda, exemplo de amor, dedicação e humildade e por terem me ensinado sempre a importância dos valores.

Aos meus irmãos, Samara, André e Moisés pelo amor compreensão e carinho.

Ao Tácio, meu marido, pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues, pela confiança, dedicação, atenção e oportunidades dadas. Por sempre estimular a união do grupo de pesquisa e o desenvolvimento de projetos de destaque. Por ser um exemplo de determinação e auto-confiança.

Aos professores da Disciplina de Dentística Operatória Clínica, Prof. Dr. Haroldo César Pinheiro Beltrão, Prof. Dr. Sérgio Lima Santiago e Prof. Dr. Carlos Augusto de Oliveira Fernandes, pelos importantes ensinamentos profissionais, acolhimento e paciência.

A todos os professores dos cursos de Graduação em Odontologia da UFC que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal, profissional e científico.

Ao professor Dr. Vicente Paulo Aragão Sabóia, pela maneira determinada como se dedica à pesquisa. Por ter sido o primeiro professor da UFC a me estimular pela pesquisa científica.

À todos os professores da Pós-Graduação pelo exemplo de competência, disponibilidade, atenção e contribuição ao meu aprendizado durante as disciplinas do Mestrado.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Jesualdo Pereira Farias. À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, na pessoa de sua diretora Profa. Dra. Neiva Fracenely Cunha Vieira. À coordenadora do curso de Odontologia Prof. Dra. Maria Eneide Leitão de Almeida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado. Ao professor Dr. Sérgio Lima Santiago, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFC, pelo exemplo de determinação para o sucesso do programa.

Ao Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury e Profa. Dra. Lívia Maria Tenuta pelo acolhimento e ensinamentos durante o período de Mestrado sanduíche no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Unicamp.

Ao Sr. Waldomiro Vieira Filho, técnico de laboratório da FOP, pelas análises realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba- Unicamp.

Aos funcionários da Odontologia, em especial Maria Marta de Lima Texeira (Martinha) e Marta Ferreira do Nascimento (Martinha) e aos funcionários Rui Lino de Sousa, Tatiana Abreu de Sousa, José Augusto Sousa e José Williane Silva por toda colaboração para as minhas atividades durante o mestrado.

Ao técnico em prótese dental do curso de Odontologia, Antônio Carlos de Oliveira Filho (Carlinhos), por ser tão prestativo e pela confecção dos dispositivos intra-orais.

À Daniela da Silva Bezerra, colega de turma de mestrado e companheira nos trabalhos, atenciosa e batalhadora, que esteve presente em uma difícil etapa da minha formação.

Às estimadas amigas Juliana Paiva Marques Lima, Mary Anne Sampaio de Melo, pelo aprendizado mutuo e divisão de trabalhos no vários momentos vividos. Agradeço pelo empenho em cada momento e principalmente pela sicera amizade.

Aos alunos de iniciação científica, Diego Martins de Paula, Diego Góes e João Paulo Saraiva Wenceslau, pela presteza e ajuda indispensáveis em etapas da pesquisa.

A todos os colegas de mestrado, Alrieta Henrique Teixeira, Ana Patrícia Souza de Lima, André Mattos Brito de Souza, Daniela da Silva Bezerra, Françoise Parahyba Dias, Gabriela Eugênio de Sousa Furtado, George Táccio de Miranda Candeiro, Isabela Alves Pacheco, Jorgeana Abrahão Barroso, José Luciano Pimenta Couto, Marília Mota Silva, Mirela Andrade Campos, Regina Cláudia Ramos Colares, Saulo Hilton Botelho Batista, Virgínia Régia Souza da Silveira, pelo colaboração em alguma fase deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFC, Sr. Germano Mahlmann Muniz Filho e Sra. Lúcia Ribeiro Marques Lustosa, pela atenção, cuidado e apoio sempre prestados.

À bibliotecária Sra. Rosane Maria Costa pela atenção com as padronizações bibliográficas.

À professora Marivan Ferraro, pela realização da revisão gramatical, do presente trabalho, com tamanha paciência e dedicação. À professora Ertha Viana pela correção do trabalho em inglês.

À CAPES pela concessão de bolsa e ao CNPq pela concessão de bolsa e de auxílio financeiro (Nº processo 477070/2008-6).

Meus sinceros agradecimentos aos voluntários desta pesquisa, a qual sem os mesmos não teria sido realizada.

A todos que de maneira direta ou indireta ajudaram na elaboração desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O benefício de restaurações de cimento de ionômero de vidro modificado por resina (RMGIC) na inibição de cáries pode ser questionado na presença de dentifrício fluoretado e de restaurações envelhecidas. Objetivo: Avaliar o efeito do processo de envelhecimento em cáries ao redor de restaurações na junção amelo-cementária, na presença de flúor proveniente de RMGIC ou dentifrício. Métodos: Um estudo in situ randomizado duplo cego e cruzado foi realizado em duas fases de 14 dias. Desesseis voluntários utilizaram um dispositivo intraoral contendo blocos de dentes restaurados com resina composta (CR) ou RMGIC, tendo sofrido ou não o processo de envelhecimento. Os blocos foram expostos a uma solução de 20% de sacarose, 10x/dia e os voluntários usaram dentifrício com ou sem flúor 3x/dia. O biofilme formado sobre os blocos foi analisado para determinar a contagem de streptococos totais, estreptococos mutans e lactobacilos, assim como a concentração de flúor. Resultados: A desmineralização do esmalte foi determinada por meio de microdureza longitudinal na margem da restauração. Foram utilizados os testes de Kruskal–Wallis e ANOVA fatorial, seguidos pelo teste de Tukey ($p < 0.05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na microbiota cariogênica. A concentração do flúor no biofilme foi maior para restaurações de RMGIC. Para o esmalte, independente do uso do dentifrício ou do processo de envelhecimento, houve maior desmineralização ao redor de restaurações de CR. Para a dentina, na ausência do dentifrício fluoretado, houve maior desmineralização ao redor de restaurações de resina composta envelhecidas. Conclusão: Os resultados sugerem que restaurações RMGIC promovem proteção contra cárie em esmalte e dentina, enquanto que o processo de envelhecimento afeta o desenvolvimento de cárie em dentina, aumentando a progressão da cárie.

Palavras-chave: Cárie Secundária, Cimento de Ionômero de Vidro, Flúor, Termociclagem.

ABSTRACT

The beneficial of resin modified glass ionomer cement (RMGIC) restorations in caries inhibition may be questioned due to F-dentifrice use and ageing of the restorations. Objective: To evaluate the effect of an ageing process on caries around cemento-enamel junction restorations in the presence of fluoride from RMGIC or dentifrice. Methods: A randomized double-blind crossover *in situ* study was performed in 2 phases of 14 days. Sixteen volunteers wore palatal devices containing dental slabs restored with composite resin (CR) or RMGIC, either aged or unaged. The slabs were exposed to a 20% sucrose solution, 10x/day and the volunteers used a non-F or an F-dentifrice 3x/day. The biofilm formed over the slabs was analyzed to determine the counts of total streptococci, mutans streptococci and lactobacilli as well as F-concentration. Results: Enamel demineralisation was determined by cross-sectional microhardness (CSMH) at the margin of the restoration. Kruskal–Wallis and factorial ANOVA, followed by Tukey test, were used to data evaluation ($p < 0.05$). No statistically significant differences were found in the cariogenic microbiota. F-concentration in biofilm was higher for RMGIC restorations. For enamel, higher demineralization around CR restorations was observed regardless dentifrice or ageing process. For dentine, higher demineralization was observed around aged RC restorations without F-dentifrice use. Conclusions: These results suggest that RMGIC restorations provided protection against secondary caries either for enamel and dentine, while ageing process affects caries development in dentine, increasing caries progression.

Keywords: Secondary Caries, Glass Ionomer Cement, Fluoride, Thermal cycling.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

B / PLB	Biofilme / Plaque like biofilm
CIV / GI	Cimento de Ionômero de vidro / Glass ionomer cement
CIVMR / RMGIC	Cimento de ionômero de vidro modificado por resina / Resin modified glass ionomer cement
DNF / NF	Dentifrício não fluoretado / Non fluoride dentifrice
ET / TS	Estreptococos totais / Total streptococcus
EM / MS	Estreptococos mutans / Mutans streptococci
LB / LB	Lactobacilos / Lactobacilli
ML / CSMH	Microdureza em corte longitudinal / Cross section microhardness
RC / CR	Resina Composta / Composite Resin
UFC / CFU	Unidade formadora de colônia / Colony forming unit

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	PROPOSIÇÃO	17
3	CAPÍTULO	18
4	CONCLUSÃO GERAL	35
	REFERÊNCIAS	36
	APÊNDICES	39
	ANEXOS	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

A durabilidade das restaurações depende de vários fatores, tais como: condição do risco de cárie e idade do paciente, tipo e tamanho da restauração, bem como características do material restaurador (MJÖR *et al.*, 2000). Assim, a escolha do tipo de material restaurador torna-se relevante, visto que a capacidade de liberação de íons anti-cárie (fluoretos e metais pesados) é determinante no desenvolvimento de lesão secundária (DIONYSOPOLOUS *et al.*, 1994). Isso é relevante quando se observa que boa parte do tempo clínico dos cirurgiões-dentistas é gasto com a troca de restaurações, devido a cáries secundárias, e ainda que esta troca inevitavelmente ocasiona uma remoção adicional da estrutura dentária remanescente (KIDD *et al.*, 1992; MJÖR, 2000).

Segundo Kidd (2001), cárie secundária é uma cárie primária adjacente a uma restauração. A área do tecido dental onde ocorre a desmineralização ao longo da parede da cavidade é denominada de lesão de parede. Assim, o material restaurador deve ser considerado um meio de destaque para prevenção de cárie secundária pois se encontra adjacente ao sitio de desenvolvimento da lesão. Dessa forma, a presença de agentes cariostáticos nos materiais restauradores pode reduzir ou eliminar desmineralização, inibindo a desmineralização e/ou atividades bacterianas e facilitando o processo de remineralização (FEATHERSTONE, 1994; HSU *et al.*, 1998; WIEGAND *et al.*, 2007). Cenci e colaboradores (2008^a) mostraram que a desmineralização adjacente a restaurações de cimentos de ionômero de vidro modificado por resina foi maior na dentina distante da parede da cavidade do que perto dela. Isso pode ser explicado pelo fato de haver alta concentração de F⁻ no biofilme presente nesta área (BENELLI *et al.*, 1993; HARA *et al.*, 2006; CENCI *et al.*, 2008^a), possibilitando a incorporação no mineral do dente na forma de fluoroapatita (ten Cate *et al.*, 2003). Dessa forma, os fluoretos tornam-se aliados na prevenção de cárie, pois estando presente na composição dos materiais restauradores, tais como o ionômero de vidro, e na cavidade oral, podem inibir a formação de cárie secundária (SOUSA *et al.*, 2009).

Entretanto, materiais que apresentam alta liberação de flúor, tais como ionômero de vidro e ionômero de vidro modificado por resina, são principalmente utilizados clinicamente para restaurar cavidades cariosas em pacientes de alto risco a cárie (LING *et al.*, 2009). Contudo, os cimentos de ionômero de vidro convencionais geralmente liberam o

equivalente ou maiores quantidades de fluoretos que os cimentos modificados por resina (HARA *et al.*, 2002; GJORGIEVSKA *et al.*, 2009). Além disso, segundo Verbeeck *et al.*, (1993) e Miller *et al.*, (1995), os ionômeros que apresentam formulações em cápsulas pré-dosadas e são manipulados mecanicamente oferecem maior liberação de flúor quando comparados com os cimentos manipulados manualmente e dosados de acordo com a orientação do fabricante. Acredita-se que o pré-encapsulamento leva a uma padronização dos constituintes da mistura, que se apresentam em uma correta proporção. Além disso, a trituração mecânica permite uma maior reação entre as partículas do pó e o líquido, resultando em maior quantidade de matriz e menor percentual de partículas não reagidas, e assim o flúor preso na matriz é então liberado em maior quantidade.

Contudo, segundo alguns estudos *in situ*, os materiais restauradores contendo fluoretos tem demonstrado capacidade de inibir o desenvolvimento de cáries adjacentes às restaurações em esmalte e dentina (BENELLI *et al.*, 1983; TENUTA *et al.*, 2005, YAMAMOTO *et al.*, 2005, CENCI *et al.*, 2008^a). Entretanto, este efeito não se confirma quando da utilização regular do dentifrício com flúor (SOUSA *et al.*, 2009, CENCI *et al.*, 2008^a). Um estudo mostrou que, na presença de dentifrício fluoretado, apenas o ionômero encapsulado, que é manipulado de maneira bem controlada, foi capaz de inibir cárie secundária *in situ* (SOUSA *et al.*, 2009).

Por outro lado, Cenci e colaboradores (2008^b) observaram que o envelhecimento de restaurações de resina composta aumenta a rugosidade superficial das restaurações e diminui o selamento marginal no esmalte, o que poderia favorecer o aparecimento de novas lesões cariosas. Além disso, o envelhecimento de restaurações de cimento de ionômero de vidro pode reduzir o efeito inibitório de cárie *in situ*, visto que essa característica tende a ser maior imediatamente após a realização da restauração (HAYACIBARA *et al.*, 2003).

Vale ressaltar que a ação do flúor liberado por matérias restauradores atua no processo desmineralização-remineralização no esmalte e dentina de forma mais eficaz do que a quando proveniente de dentifrícios fluoretados. Isso pode ser explicado pelo fato de os fluoretos liberados da restauração estarem em um microambiente formado pelo fluido e estroma do biofilme, durante a dinâmica do processo carioso, e que a concentração deste íon nesse ambiente é responsável pela saturação mineral do dente (TENUTA *et al.*, 2005; 2010).

Todavia, deve ser enfatizado que a redução de desmineralização do esmalte ao redor de materiais ionoméricos foi observado quando analisadas restaurações novas (TENUTA *et al.*, 2005). Portanto, existe a necessidade de se analisar, após um período de

envelhecimento, o possível efeito antibacteriano dos cimento de ionômero de vidro sobre os microorganismos patogênicos da cárie dentária. Além disso, é importante verificar se a ação desse material na manutenção da dureza do esmalte e dentina e na liberação de flúor para o microambiente do biofilme se conserva após um período tempo.

Entretanto, devido a razões éticas e às vantagens de um melhor controle experimental das variáveis, além de maior relação custo efetividade, parece desejável a utilização de modelos *in situ* para testar materiais e técnicas restauradoras e sua capacidade de inibir o desenvolvimento de cáries recorrentes, antes da realização de extensos e dispendiosos estudos clínicos (BENELLI *et al.*, 1993; TENUTA *et al.*, 2005). Além disso, o estresse térmico que ocorre *in vivo* é frequentemente reproduzido *in vitro* através de regimes de termociclagens (CENCI *et al.*, 2008^b).

Consequentemente, o estudo dos materiais restauradores que sejam biocompatíveis, de fácil manipulação, estéticos, anticárie e de maior durabilidade enfatiza a significância clínica deste estudo que objetiva avaliar o efeito do envelhecimento de restaurações de cimento de ionômero de vidro modificado por resina e do uso de dentifrício fluoretado na redução bacteriana, no processo desmineralização-remineralização do esmalte e da dentina e na concentração de flúor no estroma do biofilme quando submetidas a uma situação de alto desafio cariogênico *in situ*.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo objetiva avaliar o efeito do processo de envelhecimento no desenvolvimento de cárie *in situ* ao redor de restaurações de cimento de ionômero de vidro em esmalte e dentina em relação ao percentual de desmineralização dos tecidos dentários ao redor das restaurações, à composição bioquímica, por análise de flúor no estroma do biofilme formado sobre as restaurações, e à ação antibacteriana nos microorganismos formados sobre as restaurações.

As hipóteses nulas testadas foram que não haveria qualquer efeito: (1) da presença de envelhecimento induzido, (2) do tipo de material restaurador, ou (3) do uso de dentifrício fluoretado sobre as respostas das variáveis testadas.

3 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria e co-autoria do candidato (Anexo A). Por se tratarem de pesquisas envolvendo seres humanos, ou parte deles, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob protocolo nº 143/06 (Anexo B). Assim sendo, esta dissertação contém um artigo, que será submetido para a publicação no periódico “Journal of Dentistry”, tendo sido previamente analisado e corrigido por um corretor da língua inglesa.

Capítulo 1

***In situ* effects of aged glass ionomer cement restorations on biofilm and enamel-dentine demineralization.**

De-Moraes MDR, Bezerra DS, Rodrigues LKA

***In situ* effects of aged glass ionomer cement restorations on biofilm and enamel-dentine demineralization.**

De-Moraes MDR, Bezerra DS, Rodrigues LKA

Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil

Running Title – Anticaries effect of aged glass ionomer cement.

Key words – Secondary Caries, Glass Ionomer, Fluoride, Thermal Cycling.

Full address of the author to whom correspondence should be sent:

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

Dentística Operatória Clínica

Rua Monsenhor Furtado nº 1061

Bairro- Rodolfo Teófilo - CEP 60430-170

Phone- #558533668403

Fax- #558533668232

Fortaleza-CE

E-mail: lidianykarla@yahoo.com

Abstract

The beneficial of resin modified glass ionomer cement (RMGIC) restorations in caries inhibition may be questioned due to F-dentifrice use and ageing of the restorations. Objective: To evaluate the effect of an ageing process on caries around cemento-enamel junction restorations in the presence of fluoride from RMGIC or dentifrice. Methods: A randomized double-blind crossover *in situ* study was performed in 2 phases of 14 days. Sixteen volunteers wore palatal devices containing dental slabs restored with composite resin (CR) or RMGIC, either aged or unaged. The slabs were exposed to a 20% sucrose solution, 10x/day and the volunteers used a non-F or an F-dentifrice 3x/day. The biofilm formed over the slabs was analyzed to determine the counts of total streptococci, mutans streptococci and lactobacilli as well as F-concentration. Results: Enamel demineralisation was determined by cross-sectional microhardness (CSMH) at the margin of the restoration. Kruskal–Wallis and factorial ANOVA, followed by Tukey test, were used to data evaluation ($p < 0.05$). No statistically significant differences were found in the cariogenic microbiota. F-concentration in biofilm was higher for RMGIC restorations. For enamel, higher demineralization around CR restorations was observed regardless dentifrice or ageing process. For dentine, higher demineralization was observed around aged RC restorations without F-dentifrice use. Conclusions: These results suggest that RMGIC restorations provided protection against secondary caries either for enamel and dentine, while ageing process affects caries development in dentine, increasing caries progression.

Keywords: Secondary Caries, Glass Ionomer Cement, Fluoride, Thermal cycling.

Introduction

It has been known that the operator's ability to perform bonding procedures strongly influences the clinical outcome of adhesive restorations, but the main reason given by dentists for replacement of restorations is the recurrent caries.¹ Therefore, considering that fluoride plays an important role on caries control, due to its capacity of inhibiting demineralization and increasing remineralization, with the intention of providing fluoride to a

specific site at risk of secondary caries occurrence, fluoride releasing restorative materials were developed. The anticaries effect of resin modified glass ionomer cements (RMGIC) has been reported in *in situ* studies.^{2,3,4} Nevertheless, the RMGIC capability of inhibiting recurrent caries is more evident in the absence of other sources of fluoride and in well-controlled manipulation conditions.⁴

Previous study exhibited conflicting data as to whether or not these materials significantly prevent or inhibit secondary caries and affect the growth of caries-associated bacteria compared to non-fluoridated restoratives.⁵ Another thing to be considered is that the rate of fluoride releasing from these materials is not constant but it exhibits a relatively rapid initial rate, which decreases with time.⁶ Consequently, the cariostatic potential of glass ionomer cements (GIC) restorations could be reduced as their fluoride releasing rate declines through the ageing process.⁷ This fact may be particularly relevant mainly in situations where there is no use of fluoridated toothpaste, since the lack of this ion may affect the fluoride recharge presented by GIC.

Thus, this study aimed to evaluate *in situ* the effect of an ageing process on caries around cemento-enamel junction restorations in the presence of fluoride from RMGIC or dentifrice, or by a combination of them. Also, the microbiological and biochemistry composition, by analysis of fluoride, of the plaque-like biofilm (PLB) formed on the restoration was evaluated. The null hypotheses tested were that there would not be any effect of (1) presence of induced ageing, (2) type of restorative material, or (3) dentifrice use on the response of the assessed variables.

Materials and Methods

Study Population and Ethical Aspects

This study protocol was approved by the Ethics and Research Committee of the Medical School from Federal University of Ceará (protocol #104/2009). Twenty adult who fulfilled inclusion criteria (normal salivary flow rate, good general and oral health, ability to comply with the experimental protocol, not having used antibiotics during the 2 months prior to the study, not using fixed or removable orthodontic devices) were invited to take part in this study. If any of the following criteria were present: active caries lesions, use of fixed or removable orthodontic devices, use of any antibiotics within 2 months prior to the study initiation, unwillingness to return for following-up, or residence outside the city of Fortaleza,

the volunteers were excluded from the study. Three potential individuals refused to participate, leaving 17 volunteers who initiated the study. One volunteer gave up after using the palatal device for 72 h. Then, the sample was composed by 16 healthy adults (12 females and 4 males), from graduate and pos graduate of Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, aged from 19 to 36 years old who were able to comply with the experimental protocol. Consent forms were signed prior to enrollment in the study.

Experimental Design

This was a cross-over randomized double-blind split-mouth *in situ* study for caries induction by sucrose exposure and biofilm accumulation performed in 2 phases of 14 days. The factors under study as a factorial 2x2x2 design were: (1) Ageing status in 2 levels: with ageing (A+) and without ageing induction (A-). (2) Restorative material in 2 levels: composite resin (CR) and resin-modified glass ionomer cement (RMGIC). (3) F treatment in 2 levels: non fluoride dentifrice (NF; placebo) and fluoride dentifrice (FD; 1,100 µg F/g as NaF, silica-based). Therefore, the 8 experimental subsets obtained from the association of these factors were assigned to the volunteers.

In each experimental phase, sixteen volunteers used a palatal device loaded with 2 slabs restored with each material, with both ageing conditions: A- (2 slabs) and A+ (2 slabs) and used one of the dentifrices. Volunteers who had been assigned to one subset of restorative materials/dentifrice in one phase were randomized into different experimental subsets, characterizing a crossover design. In order to avoid any possible carry-across effect, the order in which the experimental units were assigned in the palatal device took into consideration that composite resin should be on the same side of the palatal appliance and, consequently, RMGIC on the opposite side.⁴ Thus, half of the volunteers had slabs restored with RMGIC put on the right side and the other half on the left side of the palatal appliance. The side of placement for F releasing restored slabs was randomly allocated for each volunteer, using the coin-flipping method. The head face of the coin assigned the RMGIC being placed at right side and the tail face, the contrary choice. Within each side of the palatal device, the positions of the specimens were randomly determined according to a computer generated randomization list.⁴

Specimen Preparation

Sixty extracted impacted human third molars, with roots more than two-thirds formed, free of apparent enamel defects, macroscopic cracks, abrasions and staining (as assessed by visual examination) were used to perform this in situ study. The teeth were stored in a 0.01% (v/v) thymol solution at 4°C for thirty days and refrigerated until use. A total of 120 enamel-dentine slabs were obtained using a water-cooled diamond saw and a cutting machine (IsoMet Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). The enamel-dentine (4 x 4 x 2 mm) slabs were prepared from the cervical region of nonerupted human third molars (2 mm above and 2 mm below the cementum-enamel junction) (figure 1). The tooth preparation was carried out according to Sousa et al.⁴ with the difference that the occlusal margin of the cavity was located on enamel, while the gingival margin was located in dentine. After cavity preparation, all slabs were sterilized by autoclaving according to Amaechi et al.⁸ and stored in 100% humidity until being inserted into the palatal appliances. The cavities were restored with one of the following materials: Filtek-Z-250/ Single Bond composite resin (3M ESPE Dental Products, St. Paul, MN, USA), as a control group, and Fuji II LC encapsulated resin-modified glass ionomer (GC America Incorporation, Alsip, IL, USA), according to the manufacturers' recommendations (for details see Sousa et al.⁴). The slabs were then polished with aluminum oxide discs (Sof-lex disk system 3M ESPE Dental Products Division) with each disk applied for 15 s. Sixty slabs were restored, half with CR and half with RMGIC, and submitted to accelerated ageing by thermal cycling (10,000 cycles, 5 - 55°C, 60 seconds, 14-days ageing period)⁹ by using a thermocycler equipment (THE 1100, SD Mechatronik GmbH, Feldkirchen-Westerham, Germany). The last 60 slabs were restored, half with CR and half with RMGIC, only two days before finish the ageing process of others slabs. Next, all slabs were stored in 100% humidity for 24 h and put in the palatal appliances for in situ cariogenic challenge.

Palatal appliance preparation

For each volunteers, an acrylic palatal device was fabricated, in which 4 cavities (5 × 5 × 3 mm³) were prepared on the left and right sides; one slab was attached with wax in each cavity. In order to allow biofilm accumulation, and to protect it from mechanical disturbance, a plastic mesh was positioned on the acrylic resin, leaving a 1-mm space from the slab surface.¹⁰

In situ phase

Cariogenic challenge to the restored specimens was provided by dripping 20% sucrose solution onto all slabs, 10 times/day, during 14 days.³ No restrictions were made in regard to the volunteers' diet, but they were instructed to remove the appliances during meals^{11,12} and using fluoridated water (0.7 mg F/L). Volunteers were instructed to remove the appliance and drip one drop of 20% sucrose solution onto each mesh that was above the slabs, 10 x/day at predetermined times (until 8:00 a.m. from 9:30 p.m.). When removed, the devices were kept wet in plastic boxes to keep the bacteria biofilm viable.¹³ Before replacing the palatal appliance in the mouth, a 5-min waiting time was standardized for sucrose diffusion into the dental biofilm. During the lead-in and washout periods (1-week) as well as throughout each experimental phase, the volunteers brushed their teeth using the phase-designed dentifrice (NF or FD - Fórmula & Ação Dentistry Product, São Paulo, SP, Brazil). The dentifrice treatment was performed 3 x/day, after mealtimes when volunteers' habitually performed their oral hygiene. The appliances were extra-orally brushed, except the slab area, and volunteers were asked to brush carefully over the covering meshes, to avoid disturbing the biofilm.

Microbiological analysis

On the 14th day, approximately 12 h after the last application of the sucrose solution and dentifrice, the volunteers stopped wearing the intraoral devices. The plastic mesh was removed and the biofilm formed on the specimens was collected with sterilized plastic curettes. The biofilm was weighed (± 1 mg) in pre-weighed microcentrifuge tubes, to which a 0.9% NaCl solution was added (1 ml/mg biofilm). The tubes were stirred during a 2-minute period in a Disrupter Genie Cell Disruptor (Precision Solutions, Rice Lake, WI, USA) with three 0.1 mm diameter glass beads to detach the bacterial cells. Afterwards, the suspension was serially diluted (1:10, 1:100, 1:1000, and 1:10000) with a 0.9% NaCl solution. In order to assess the microorganism viability, samples were plated in triplicate in mitis salivarius agar containing 20% sucrose, to determine total streptococci (TS), and in mitis salivarius agar plus 0.2 bacitracin/ml, to determine mutans streptococci (MS) and Rogosa agar supplemented with 0.13 % glacial acetic acid to assess the number of colony-forming units (CFU) of lactobacilli (LB). The plates were incubated for 48 h at 37°C in a 10% CO₂ atmosphere (Thermo scientific CO₂ Incubator - Thermo fisher scientific inc, Waltham, MA, USA). Representative colonies of MS, TS and LB were counted using a colony counter. The results were expressed

in CFU/mg dental biofilm (wet weight).

Cross-sectional microhardness testing (CSMH)

Enamel-dentine slabs were longitudinally sectioned through the center of the restoration. The segments were embedded in acrylic resin and serially polished. Cross-sectional microhardness measurements were made with a microhardness tester (Future Tech Corp FM-ARS 9000; Tokyo, Japan) with a Knoop diamond under a 25 g/5 s load on enamel and 5g/5 s on dentine. One lane of 11 indentations was made, being 30 and 120 μm from the preparation margin. The indentations were made at the following depths: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140 and 180 μm from the outer enamel and dentine. Integrated demineralization (DS) was calculated according Sousa et al.⁴

Fluoride analysis of the biofilm

Finished the cariogenic challenge, the biofilms over the slabs were collected with sterile plastic spatula, put in sterile pre-weighed microcentrifuge tubes, identified, and dehydrated for a 24-hour period. After this period the weight of dry biofilm was obtained by using a digital weighing-machine of 5 digits. The samples were treated with 100 μL of 0.5 M HCl for each 1 mg of biofilm, stirred for 3 h at room temperature, centrifuged, and the supernatant collected was neutralized with 2 M NaOH (0.125 mL/10 mg biofilm wet weight) and kept frozen until analysis.² After this period it was added to the samples the same volume of TISSAB II (containing 20 g NaOH / L, pH 5.0). Quantification of fluoride in the solution was done with an ion selective electrode connected to an ion analyser (Orion EA-940), which was previously calibrated with a series of 8 standard solutions (from 0.025 to 32.0 ppm F^-), in triplicate. The readings of the samples were expressed in millivolt (mV) and transformed into $\mu\text{gF}^-/\text{m}$ (ppm F^-) by linear regression of the calibration curve and calculated according the weight of the biofilm in milligrams.¹²

Statistical Analysis

This study has a randomized complete block with factorial treatment structure 2x2x2, where volunteers were considered experimental blocks and factors under study were restorative material, ageing process and dentifrice. Response variables were: ΔS at 30 and 120 μm , LB, TS, MS and as well as F-concentration in the biofilm. The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for each variable, and in case of assumption violation, data were transformed by Log_{10} . For variables LB, TS, MS equality of

variances, normal distribution of errors and absence of outliers were not satisfied, thus it was not possible to normalize these data. Therefore, a non-parametric test for comparing multiple independent samples (Kruskal–Wallis) was applied. For the other variables, Tukey's test was applied. SAS System 9.1.3 software (SAS Institute) was used as a statistical program. The significance level was set at 5%.

Results

In regard to microbiological composition of the biofilm formed on the slabs restored with the different materials, no significant differences were found between the treatments ($p > 0.05$, table 1) by any studied factor. In regard to fluoride concentration of the biofilm, the effects of restorative material was significant, fluoride levels were higher for the groups restored with RMGIC, regardless of toothpaste and ageing ($p < 0.05$, table 3). There was a interaction between dentifrice and material showing higher fluoride levels (Figure 2).

According to our results, the first null hypothesis that there is no effect of the presence of induced ageing was partially accepted, inasmuch significant differences were found for the DS parameter only for dentine, where aged restorations presented higher demineralization despite the type of material ($p < 0.05$, table 2). In addition, the second null hypothesis that stated the effects of restorative material was partially accepted, the groups restored with RMGIC presented lower demineralization than CR regardless the ageing process, only in enamel substrate ($p < 0.05$, table 2). The third null hypothesis tested were rejected.

Discussion

The *in situ* model used has been shown to be adequate to study secondary caries.^{10,16} In addition, subjecting the specimen to thermal cycling can give some insight into the temperature - dependent degradation of the material.¹⁷ Thermal cycling induces stress between a tooth substrate and a restorative material at the bonding interface⁵ and, by simulating intra-oral conditions, 10,000 thermal cycles might represent one year of *in vivo* functioning. However, there is no concrete evidence that failures in practice occur because of thermal stresses.⁹

Microbiological analysis from oral biofilm revealed no differences between treatments (Table 1). These results are supported by other *in situ* studies,^{3,4} who demonstrated that the effect of fluoride on caries inhibition is rather physicochemical than antibacterial.

Fluoride analysis from biofilm showed that treatments performed in the presence of fluoride from restorative material presented higher amounts of this ion in solids of biofilm. Since no F-dentifrice effect was found it can be suggested that F-releasing from dental material was similar to that found for F-dentifrice and that it was high enough to inhibit demineralization in enamel.

Secondary caries are lesions present at the margin of an existing restoration. This kind of lesion may be a result from microleakage¹⁸, marginal gap or discrepancies between tooth and restoration. In regard to the lower demineralization found in dentine for unaged fluoride restorations, it can be speculated that the ageing process caused a reduction of marginal fit inducing microleakage¹⁹ and or the presence of marginal gaps²⁰ and more secondary caries. However, to the best of our knowledge no other study has correlated ageing processes with wall lesion or recurrent caries.

Another thing to be emphasized is that thermal cycling was only relevant for caries induction in dentine, showing that water storage affects the bond stability and simulate hydrolytic-degradation processes.²¹ While enamel is predominantly mineral, dentine contains a significant amount organic material, and this humid and organic nature of dentine makes this tissue very difficult to bonding.²² The the stability of the bonded interface over time is related to the generation of a compact and homogenous hybrid layer, that can reduce the integrity with physical changes.²¹ Additionally, ageing causes an increase in surface roughness of composite restorations, leading to an increase accumulation of biofilm, thereby increasing secondary caries.¹⁹

It has been stated that a constant supply of low levels of intraoral fluoride presents more benefits in preventing caries.⁵ Furthermore, the presence of fluoride (F), either from dentifrice use or released from a dental material, may interfere significantly on the initiation and progression of these lesions.^{10,16,5} However, in the present study fluoride from dentifrice was not able to inhibit demineralization around enamel-dentine restorations. This surprising result may be attributed to the very high cariogenic challenge used (10x/day) and agrees with the results found by Duggal et al.²³, which demonstrated that more than 7 daily sucrose exposures are needed to mimick a high cariogenic situation. This is not in agreement with Cenci et al.³, who showed that in the presence of fluoridated dentifrice demineralization was inhibited around RC or GI restorations. One possible explanation may be due to the variability of our study, since numerical difference was found for the DS parameter being

lower the demineralization found in groups that submitted to the F-dentifrice use.

In situ studies have shown that restorative materials containing fluoride can inhibit caries adjacent to restorations in enamel^{10,24,25,4} and dentine³. For enamel, our results are supported by these previous studies, however this effect was observed in dentine in the presence of until one source of fluoride. It can be suggested that the likelihood of caries development around restorations may be more common in root dentine, since the rate of mineral loss can be twice as fast from root as it is from enamel.²⁶

Conclusions

These results suggest that RMGIC restorations provided protection against secondary caries either for enamel and dentine, while ageing process affects caries development in dentine, increasing caries progression

Acknowledgments

We thank the volunteers for their valuable participation, Waldomiro Vieira Filho for the fluoride analysis and CNPq (477070/2008-6) for financial support.

Table 1. Microbiological analysis of dental biofilm according to treatment (Mean values with their standard deviation).

Microorganism (CFU/mg x 10 ⁷)	No-F dentifrice				F-dentifrice			
	Composite resin		Glass ionomer cement		Composite resin		Glass ionomer cement	
	Unged	Aged	Unged	Aged	Unged	Aged	Unged	Aged
Total streptococci	1.6 ± 2.26	1.44 ± 2.63	1.52 ± 2.10	1.79 ± 2.33	5.46 ± 4.82	2.90 ± 4.63	3.87 ± 5.89	3.32 ± 4.63
Mutans streptococci	2.40 ± 3.04	2.92 ± 4.47	1.80 ± 2.28	1.59 ± 2.06	3.97 ± 4.69	2.67 ± 4.80	4.52 ± 7.80	3.06 ± 5.03
Lactobacilli	2.22 ± 3.43	1.74 ± 2.94	2.10 ± 2.72	2.02 ± 3.44	2.49 ± 3.12	1.39 ± 2.50	1.76 ± 2.92	2.01 ± 3.73

CFU, colony-forming units; p ≥ 0.05

Table 2. P values of mineral loss.

	Dentifrice	Material	Ageing	Interaction		
				Dent*mat	Dent*age	Mat*age
Substrate/Distance						
Enamel, µm						
30	0,399	<0,001	0,093	0,278	0,876	0,135
100	0,064	<0,001	0,475	0,232	0,877	0,837
Dentine, µm						
30	0,036	<0,001	0,031	0,573	0,201	0,756
100	0,483	<0,001	<0,001	0,355	0,456	0,257

Tabela 3. ANOVA Results (p values) of fluoride levels on biofilm.

	Dentifrice	Material	Ageing	Interaction		
				Dent*mat	Dent*age	Mat*age
Level of Fluoride						
ugF/g biofilm	0,206	0,005	0,569	0,028	0,918	0,392

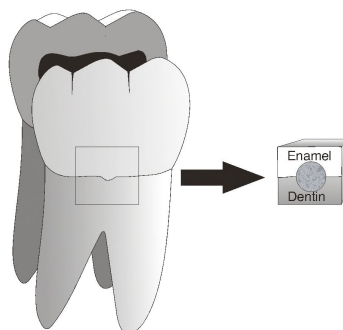


Figure 1- Blocks human tooth, enamel-dentine, prepared from the cervical region of nonerupted human third molars. The occlusal margin of the cavity was located in enamel, while the gingival margin was located in dentine.

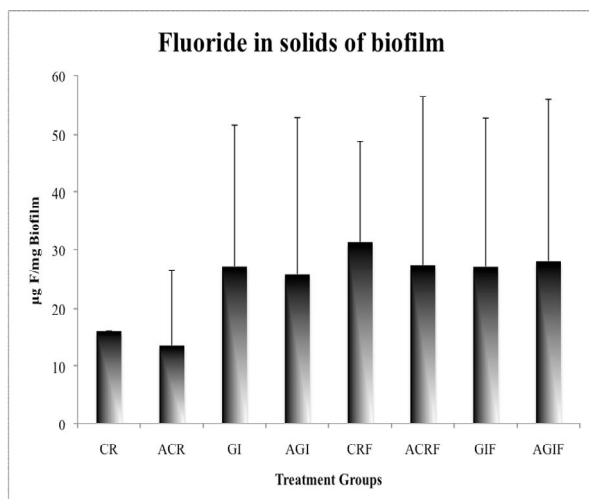


Figure 2. F concentrations in the solids of biofilm.

References

1. Mjör IA, Toffenetti F. Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence International* 2000; **31**:165-79.
2. Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the Fluid of Biofilm Formed under Sucrose. *Journal of Dental Research* 2006; **85**:834-838.
3. Sousa RP, Zanin ICJ, Lima JPM, Vasconcelos SMLC, Melo MAS, Beltrão HCP, et al. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *Journal of Dentistry* 2009; **37**:44-51.
4. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials- Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dental Materials* 2007; **23**:343-362.
5. Burke FM, Ray NJ, McConnell RJ. Fluoride-containing restorative materials. *International Dental Journal* 2006; **56**:33-43.
6. Carvalho AS, Cury JA. Fluoride release from some dental materials in different solutions. *Operative Dentistry* 1999; **24**:14-19.
7. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM: Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel demineralization. *Caries Research* 1998; **32**:441-6.

8. Gale MS, Darvell BW: Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *Journal of Dentistry* 1999; **27**:89-99.
9. Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL Jr, Cury JA. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Research* 1993; **27**:280-284.
10. Cenci MS, Tenuta LMA, Cenci TP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of Microleakage and Fluoride on Enamel-Dentine Demineralization around Restorations. *Caries Research* 2008^a; **42**:369-79.
11. Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Research* 1997; **31**:356-360.
12. Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Research* 2000; **34**:491-7.
13. Zero TD. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health* 2006; **6**:1-13.
14. Lobo MM, Gonçalves RB, Ambrosano GM, Pimenta LA. Chemical or microbiological models of secondary caries development around different dental restorative materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2005; **74**:725-31.
15. Hara AT, Queiroz CS, Freitas PM, Giannini M, Serra MC, Cury JA. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentine. *European*

Journal of Oral Sciences 2005; **113**:245-250.

16. Hara AT, Turssi CP, Ando M, González-Cabezas C, Zero DT, Rodrigues AL Jr, et al. Influence of fluoride-releasing restorative material on root dentine secondary caries in situ. *Caries Research* 2006; **40**:435-439.
17. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *Journal of Dental Research* 2005; **84**:118-132.
18. Kidd EAM. Diagnosis of Secondary Caries. *Journal of Dental Education* 2001; **65**: 997-1000.
19. Cenci MS, Cenci T-P, Donassollo TA, Sommer L, Strapasso A, Demarco FF. Influence of thermal stress on marginal integrity of restorative materials. *Journal of Applied Oral Science* 2008^b; **16**:106-10.
20. Coelho-de-Souza FH, Camacho GB, Demarco FF, Powers JM. Fracture Resistance and Gap Formation of MOD Restorations: Influence of Restorative Technique, Bevel Preparation and Water Storage. *Operative Dentistry* 2008; **33**:37-43.
21. Saboia VPA, Silva FCFA, Nato F, Mazonni A, Cadenaro M, Mazzoti G, Giannini M, Breschi L. Analysis of differential artificial ageing of the adhesive interface produced by a two-step etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci* 2009; **117**: 618–624.
22. Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials* 2010; **26**:24-37.

23. Duggal MS, Toumba KJ, Amaechi BT, Kowash MB, Higham SM. Enamel demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. *Journal of Dental Research* 2001; **80**:1721-1724.

24. Tenuta LM, Ribeiro CC, Gonçalves NC, Del Bel Cury AA, Aires CP, Tengan C, et al. The short-term in situ model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. *Journal of Dentistry* 2005; **33**:491-7.

25. 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 Research* 2005; **39**:157-60.

26. Featherstone JDB. Fluoride, remineralisation and root caries. *American Journal of Dentistry* 1994; **7**:271-4.

4 CONCLUSÃO GERAL

Nas condições deste estudo *in situ*:

Esses resultados sugerem que restaurações de cimento de ionômero de vidro, envelhecido e recém manipulado, promoveu proteção contra cárie secundária em esmalte. Enquanto que o envelhecimento afetou o desenvolvimento de cáries em dentina, resultando em aumento da progressão de cárie.

REFERÊNCIAS

BENELLI, E. M.; SERRA M. C.; RODRIGUES, A. L. JR; CURY, J. A. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res.**, v. 27, n. 4, p. 280-4, 1993.

CENCI, M. S.; TENUTA, L. M. A.; PEREIRA-CENCI, T.; CURY, A. A.; CURY, J. A. Effect of Microleakage and Fluoride on Enamel-Dentine Demineralization around Restorations. **Caries Res.**, v. 42, n. 5, p. 369-79, 2008^a.

CENCI, M. S.; PEREIRA-CENCI, T.; DONASSOLLO, T. A.; SOMMER, L.; STRAPASSON, A.; DEMARCO, F. F. Influence of thermal stress on marginal integrity of restorative materials. **J Appl Oral Sci.**, v. 16, n. 2, p. 106-10, 2008^b.

DIONYSOPOLOUS, P.; KOTSANOS, N.; KOLINIOTOU-KOUBIA, E.; PAPADOGIANNIS, Y. Secondary Caries Formation In Vitro around Fluoride-releasing Restorations. Clinical Relevance: Fluoride releasing restorations inhibit caries-like lesions. **Oper Dent.**, v. 19, n. 5, p. 183-8, 1994.

FEATHERSTONE, J. D. B. Fluoride, remineralisation and root caries. **Am J Dent.**, v. 7, n. 5. p. 271-4, 1994.

GJORGIEVSKA E.; NICHOLSON, W. J.; ILJOVSKA, S.; SLIPPER, I. The potential of fluoride-releasing dental restoratives to inhibit enamel demineralization: an SEM study. **Prilozi**, v. 30, n. 1, p. 191-204, 2009.

HAYACIBARA, M. F.; ROSA, O.P.; KOO, H.; TORRES, S. A.; COSTA, B.; CURY, J. A. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. **J Dent Res.** v. 82, n. 4, p. 267-71, 2003.

HARA, A. T.; TURSSI, C. P.; SERRA, M. C.; NOGUEIRA, M. C. Extent of the cariostatic effect on root dentin provided by fluoride-containing restorative materials. **Oper Dent.**, v. 27, n. 5, p. 480-7, 2002.

HARA, A. T.; TURSSI, C. P.; ANDO, M.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; ZERO, D. T.; RODRIGUES, A. L. JR.; SERRA, M. C.; CURY, J. A. Influence of fluoride-releasing

restorative material on root dentine secondary caries in situ. **Caries Res.**, v. 40, p. 435-439, 2006.

HSU, C. -Y. S., DONLY, K. J., DRAKE, D. R., WEFEL, J. S. Effects of Aged Fluoride-containing Restorative Materials on Recurrent Root Caries. **J Dent Res.**, v. 77, n. 2, p. 418-425, 1998.

KIDD E. A.; TOFFENETTI, F.; MJÖR, I. A. Secondary caries. **Int Dent J.**, v. 42, n. 3, p. 127-38, 1992.

KIDD, E. A. M. Diagnosis of Secondary Caries. **J Dent Educ.**, v. 65, n. 10, p. 997-1000, 2001.

LING, L.; XU, X.; CHOI, G. -Y.; BILLODEAUX, D.; GUO, G.; DIWAN, R. M. Novel F-releasing Composite with Improved Mechanical Properties. **J Dent Res.**, v. 88, n. 1, p. 83-88, 2009.

MILLER, B. H.; KOMATSU, H.; NAKAJIMA, H.; OKABE, T. Effect of glass ionomer manipulation on early fluoride release. **Am J Dent.**, v.8, n. 4, p.182-6, 1995.

MJÖR, I. A.; TOFFENETTI F. Secondary caries: a literature review with case reports. **Quintessence Int.**, v. 31, n. 3, p. 165-79, 2000.

SABOIA, V. P. A.; SILVA, F. C. F. A.; NATO, F.; MAZONNI, A.; CADENARO, M.; MAZZOTI, G.; GIANNINI, M.; BRESCHI, L. Analysis of differential artificial ageing of the adhesive interface produced by a two-step etch-and-rinse adhesive. **Eur J Oral Sci.**, v. 117, n. 1, p. 618-624, 2009.

SOUSA, R. P.; ZANIN, I. C. J.; LIMA, J. P. M.; VASCONCELOS, S. M. L. C.; MELO, M. A. S.; BELTRÃO, H. C. P.; RODRIGUES, L. K. A. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. **J Dent.**, v. 37, n. 1, p. 44-51, 2009.

TEN CATE, J. M.; LARSEN, M. J.; PEARCE, E. I. F.; FEJERSKOV, O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. *In*: Fejerskov O, Kidd EAM. **Dental caries: the disease and its clinical management**. Copenhagen: Blackwell Munksgaard; p.49-69, 2003.

TENUTA, L. M.; RIBEIRO, C. C.; GONÇALVES, N. C.; DEL BEL CURY, A. A.; AIRES, C. P.; TENGAN, C.; TAGLIAFERRO, E. P.; PECHARKI, G. D.; NAPIMOGA, M. H.; TABCHOURY, C. P.; CURY, J. A. The short-term in situ model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. **J Dent.**, v. 33, n. 6, p. 491-7, 2005.

VERBEECK, R.M.; DE MOOR, R. J.; VAN EVEN, D. F.; MARTENS, L. C. The short-term fluoride release of a hand-mixed vs. capsulated system of a restorative glass-ionomer cement. **J Dent Res.**, v.72, n. 3, p.577-81, 1993.

WIEGAND, A.; BUCHALLA, W.; ATTIN, T. Review on fluoride-releasing restorative materials-Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. **Dent Mater.**, v. 23, n. 3, p. 343-362, 2007.

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.**, v. 39, n. 2, p. 157-60, 2005.

APÊNDICE A - TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES

Eu, _____, CRO _____, estou doando ___ dentes terceiros molares retidos, extraídos em meu consultório localizado a _____ (Rua e Cidade), por razões independentes da pesquisa e sob consentimento do paciente, para a pesquisa intitulada “EFEITO DO ENVELHECIMENTO DE RESTAURAÇÕES DE CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA: ESTUDO *in situ*.”, que será realizada na Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará pela pesquisadora: Maria Denise Rodrigues de Moraes.

Fortaleza, ___ de ____ de 200__.

Assinatura do Cirurgião-Dentista

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa- EFEITO DO ENVELHECIMENTO DE RESTAURAÇÕES DE CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA: ESTUDO *in situ*.

Objetivo da Pesquisa: avaliar *in situ* o potencial anticárie de materiais restauradores quando submetidos a uma situação de envelhecimento acelerado e de alto desafio cariogênico *in situ*.

Você está sendo convidado a contribuir com a realização de uma pesquisa. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os questionamentos sejam esclarecidos.

Convidamos você a participar da pesquisa intitulada EFEITO DO ENVELHECIMENTO DE RESTAURAÇÕES DE CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DENTINA: ESTUDO *in situ*.

A cárie dental ainda está entre as doenças mais relevantes em termos de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Grupos de crianças continuam apresentando alta atividade da doença. Em termos mundiais, cerca de 20 a 25% das crianças e adolescentes apresenta 60 a 80% do total de cárie da população. Tal fato enfatiza a necessidade de se aperfeiçoar métodos preventivos já existentes, com a introdução de técnicas inovadoras que possam agir como coadjuvantes na prevenção e controle da cárie dental neste segmento da população.

Desta forma, novos materiais são frequentemente lançados no mercado odontológico com o apelo de conseguirem controlar, ainda que de uma forma localizada, o aparecimento de novas lesões de cárie.

Entretanto, devido a razões éticas e às vantagens de um melhor controle experimental das variáveis além de maior custo efetividade, parece desejável a utilização de

modelos *in situ* para testar materiais e técnicas restauradoras e sua capacidade de inibir o desenvolvimento de cáries recorrentes antes da realização de extensos e dispendiosos estudos clínicos. No entanto, há na literatura científica uma escassez de estudos *in situ* que testem todas as categorias de materiais restauradores existentes visando uma maior objetividade na ocasião de sua indicação.

Procedimentos

Será realizado um estudo do tipo cruzado que compreenderá 4 tratamentos, sendo duas fases de 14 dias, durante a qual você utilizará um dispositivo intra-oral palatino contendo blocos de esmalte e dentina dental humano. Os 4 tratamentos serão:

Tratamento 1: Restauração com Resina Composta (Z-250) envelhecida

Tratamento 2: Restauração com Resina Composta (Z-250) não envelhecida

Tratamento 3: Restauração com Ionômero de vidro modificado por resina encapsulado (Fuji II) envelhecido

Tratamento 4: Restauração com Ionômero de vidro modificado por resina encapsulado (Fuji II) não envelhecido

Em um período anterior ao início das fases do experimento (7 dias), você deverá fazer uso do dentífrício pré-determinado a fim de padronizar as concentrações de flúor na saliva.

Instruções:

a) Na fase clínica: Todos os blocos contidos no dispositivo deverão ser gotejados com a solução de sacarose a 20% dez vezes ao dia respeitando os horários pré-determinados pelo pesquisador (**8:00, 9:30, 11:00, 12:30, 14:00, 15:30, 17:00, 18:30, 20:00, 21:30 horas**).

Após cinco minutos do gotejamento (**uma gota sobre cada bloco**), o dispositivo deverá ser recolocado na boca sem ser lavado;

b) utilizar o dispositivo intra-oral palatino diariamente, inclusive para dormir;

c) remover o dispositivo intra-oral somente durante as refeições ou ingestão de qualquer bebida ácida, durante este período o mesmo deve ser conservado no estojo fornecido e em ambiente úmido com o objetivo de manter as bactérias da placa viáveis;

d) fazer uso do dentifrício padronizado três vezes ao dia durante a escovação. Durante a escovação, o dispositivo deverá ser removido e os voluntários deverão limpar seus aparelhos cuidadosamente para evitar a remoção do biofilme dental formado sobre os blocos. O tempo de escovação do dispositivo e dos dentes não deve exceder a 3 minutos e a região da telinha deve ser escovada delicadamente para evitar remoção ou perturbação da placa bacteriana.

e) fazer uso de água fluoretada de abastecimento de Fortaleza (0,7 ppm F).

Desconfortos e Riscos

Vocês poderão apresentar discreta halitose apenas durante o período experimental, o que poderá ser resolvido com adequada higiene dental. Mesmo com remotas possibilidades, caso esta halitose persista após o período experimental será realizada uma profilaxia dentária, bem como será lhe fornecido enxaguatório bucal com clorexidina até que o problema seja resolvido. O uso das soluções será apenas como gotas sobre os blocos presentes nos dispositivos intra-orais, não implicando em qualquer aumento de cárie dental nos voluntários. No entanto, caso haja o surgimento de alguma lesão de carie inicial a mesma receberá tratamento adequada com compostos fluoretados anticariogênicos. O dispositivo intra-oral pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos semanais serão realizados, para verificar as condições do aparelho e da sua saúde bucal. Cabe ressaltar que não haverá consumo direto da substância, pois a mesma será gotejada sobre os blocos.

O benefício que vocês terão será um auxílio indireto, contribuindo para a realização deste projeto e o conhecimento que vocês adquirirão sobre o potencial anticárie de materiais restauradores. Este conhecimento poderá ser utilizado futuramente em prol da população alto risco à cárie.

Forma de acompanhamento e assistência

Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição de vocês para ajuste no aparelho intra-oral a fim de minimizar qualquer desconforto.

Garantia de esclarecimento

Você tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à

pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema com o dispositivo intra-oral, por favor, comunicar-nos com a maior brevidade possível.

Tel: 3366-8410 (Clínica de Dentística)

Formas de ressarcimento

Vocês serão ressarcidos de eventuais despesas com o transporte-alimentação para a retirada das amostras contidas nos dispositivos.

Formas de indenização

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

Garantia de sigilo

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

Liberdade para se recusar em participar da pesquisa

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e por isso DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura do voluntário

Endereço do Voluntário:

Documento (RG):

Telefones:

Assinatura do Profissional que aplicou o TCLE

Assinatura do Responsável pelo estudo

Universidade Federal do Ceará

Rua Cap. Francisco Pedro s/n. Rodolfo Teófilo. CEP. 60430-170

Fone: 33668410/33668426

Departamento de Odontologia Restauradora

ATENÇÃO: A SUA PARTICIPAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE PESQUISA É VOLUNTÁRIA. EM CASO DE DÚVIDAS REALIZAR CONTATO COM O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFC.

Telefone do Comitê de Ética: (85)33668338.

APÊNDICE C - INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Cada voluntário receberá:

- 2 tubos de dentifrício, 1 escova dental, 7 frascos conta-gotas com solução de sacarose a 40%, isopor 500mg a fim de manter em congelador os frascos com solução de sacarose, estojo de aparelho ortodôntico (acomodação do dispositivo), 1 pacote de gaze estéril.

Os voluntários deverão seguir as seguintes instruções:

a) Na fase clínica: todos os blocos contidos no dispositivo deverão ser gotejados com a solução de sacarose a 20% dez vezes ao dia respeitando os horários pré-determinados pelo pesquisador (8:00, 9:30, 11:00, 12:30, 14:00, 15:30, 17:00, 18:30, 20:00, 21:30 horas).

Após cinco minutos do gotejamento (uma gota sobre cada bloco), o dispositivo deverá ser recolocado na boca sem ser lavado;

b) utilizar o dispositivo intra-oral palatino diariamente, inclusive para dormir;

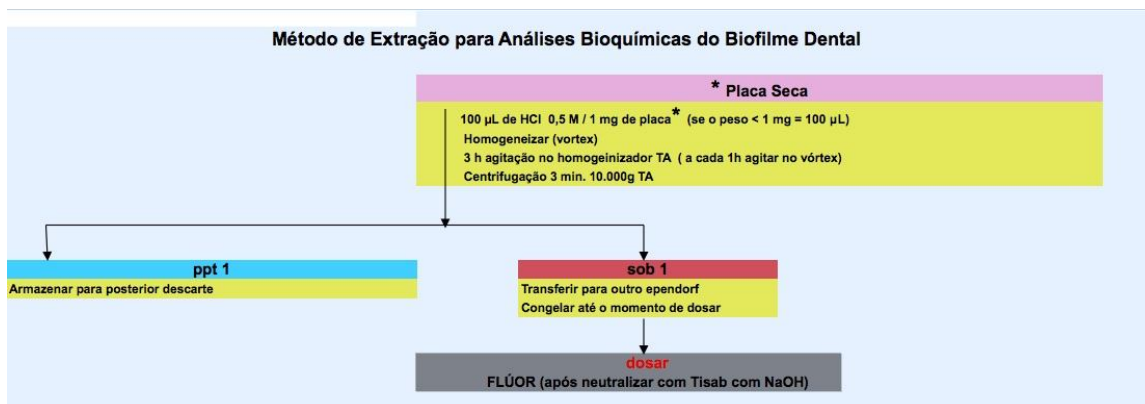
c) remover o dispositivo intra-oral somente durante as refeições ou ingestão de qualquer bebida ácida, durante este período o mesmo deve ser conservado no estojo fornecido e em ambiente úmido com o objetivo de manter as bactérias da placa viáveis;

d) fazer uso do dentifrício padronizado três vezes ao dia durante a escovação. Durante a escovação, o dispositivo deverá ser removido e os voluntários deverão limpar seus aparelhos cuidadosamente para evitar a remoção do biofilme dental formado sobre os blocos. O tempo de escovação do dispositivo e dos dentes não deve exceder a 3 minutos e a região da telinha deve ser escovada delicadamente para evitar remoção ou perturbação da placa bacteriana.

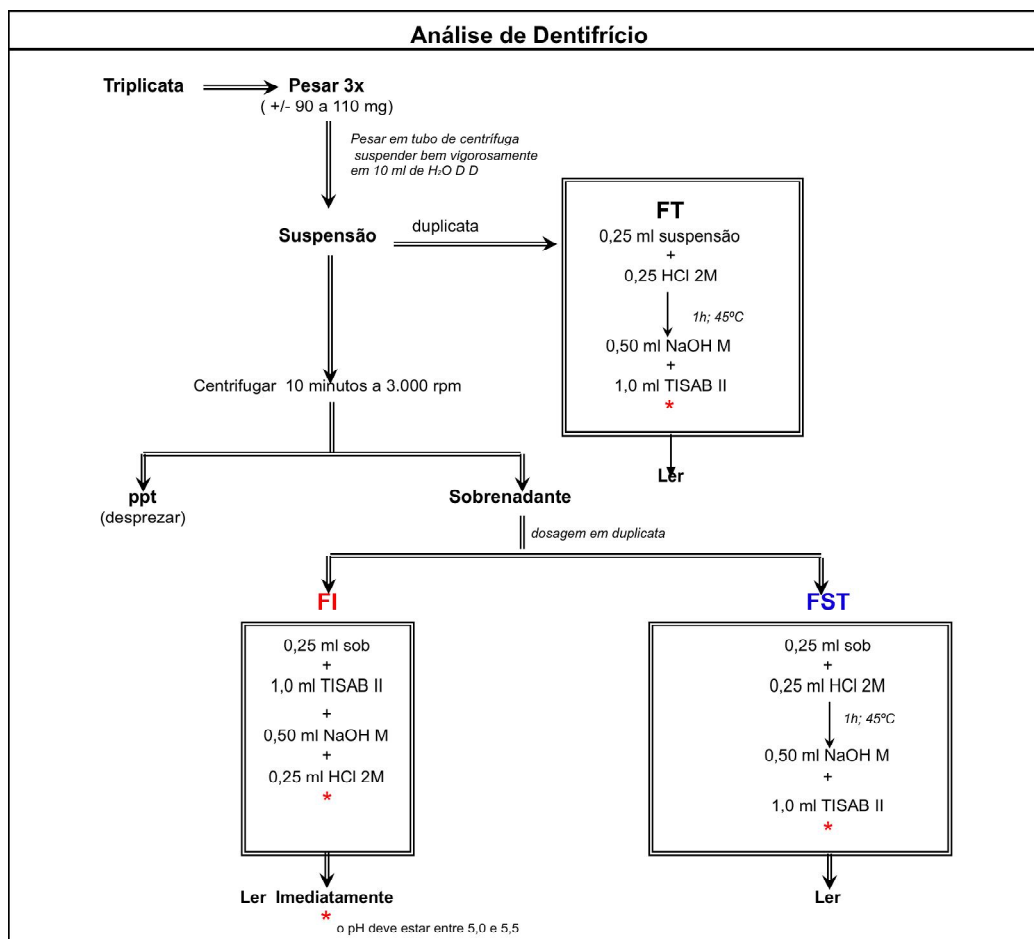
e) fazer uso de água fluoretada de abastecimento de Fortaleza (0,7 ppm F).

Caso haja necessidade de ingestão de antibióticos, comunicar imediatamente ao pesquisador.

APÊNDICE D – Representação esquemática do método de extração de flúor para análise do biofilme sólido

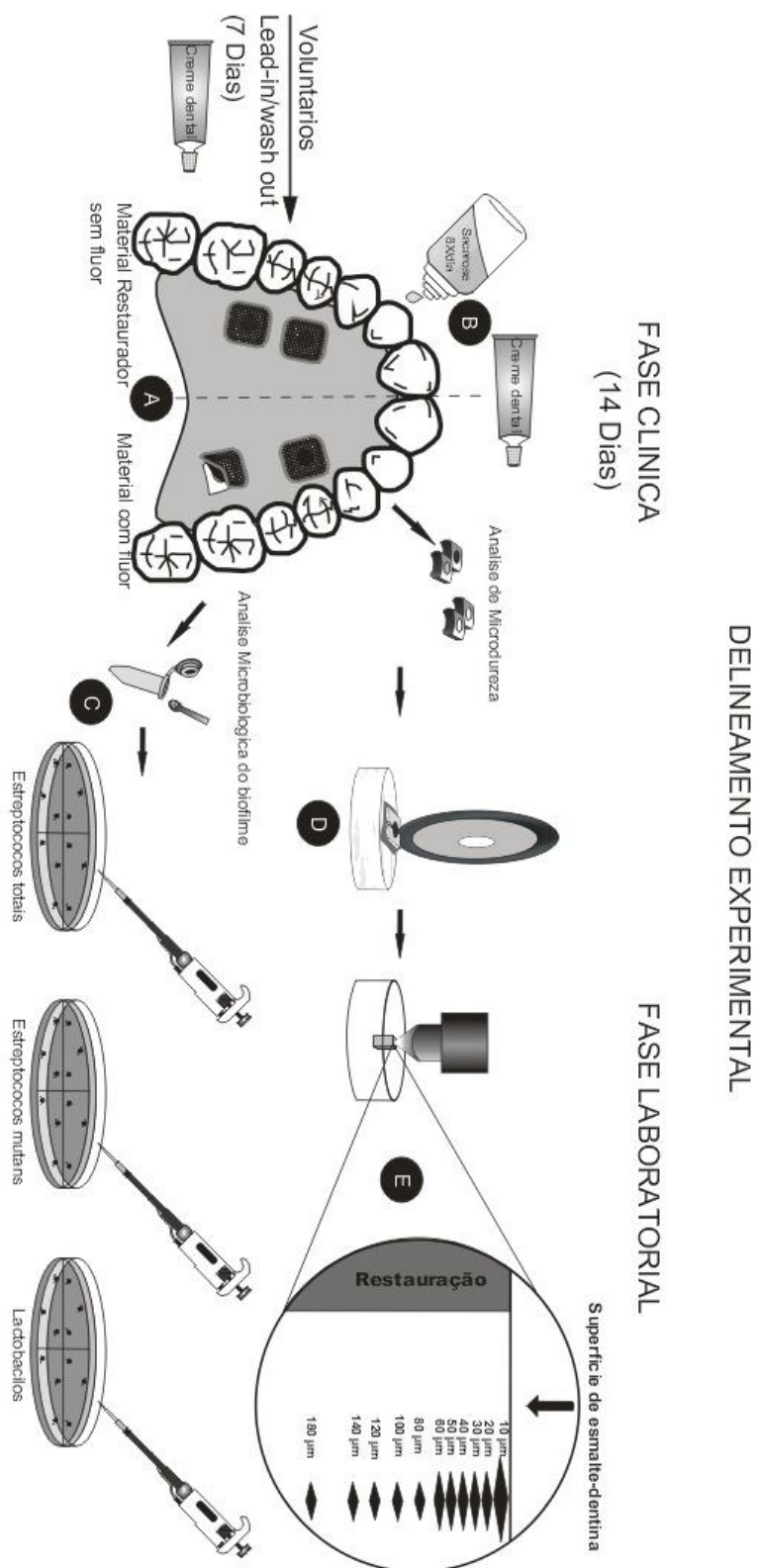


APÊNDICE E – Representação esquemática do método de extração de flúor para análise dos dentifrícios



FT- Flúor Total; FST Flúor Solúvel Total; FI- Flúor Iônico Solúvel

APÊNDICE F – Representação esquemática do delineamento experimental do estudo.



ANEXO A - Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós- Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará

13

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

§2º - No caso de não cumprimento do prazo estipulado no §1º, o orientador deverá encaminhar, antes de seu vencimento e ouvido o aluno, solicitação de ampliação do prazo, mediante justificativa e descrição da etapa de desenvolvimento do projeto.

§3º - O aluno que não obtiver aprovação no Exame Geral de Conhecimentos, terá direito à nova oportunidade, desde que respeitados os artigos 4 e 5 das Normas para os Cursos de Pós-Graduação da UFC.

§4º - O aluno só poderá defender a Dissertação após aprovação no Exame Geral de Conhecimentos de que trata este artigo.

Artigo 46 – As dissertações apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação em formato tradicional ou as sessões gerais do formato alternativo deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no site <http://www.biblioteca.ufc.br/servicos.html#apoio>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o *MANUAL DE NORMALIZAÇÃO PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO E TESE DE DOUTORADO NO FORMATO ALTERNATIVO do PPGO*.

Artigo 47 – Para cada aluno deverá ser constituída uma banca examinadora, que será formada por 03 (três) professores ou especialistas, com o título de Doutor, como membros efetivos e dois suplentes.

§1º - Os membros da banca examinadora de que trata o *caput* deste artigo constituirão a Comissão Julgadora, cuja presidência caberá ao orientador da Dissertação.

§2º - Dentre os membros efetivos da banca examinadora, 01 (um) deverá ser professor ou especialista de outra Instituição, com título de Doutor, sugerido pelo orientador e homologado pela Coordenação do Programa.

§3º - Dentre os membros suplentes da banca examinadora, 01 (um) deverá ser professor ou especialista de outra Instituição, com título de Doutor, sugerido pelo orientador e homologado pela Coordenação do Programa.

§4º - Quando na orientação da dissertação houver a participação de co-orientador, este não poderá participar da banca examinadora.

ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 80/09

Fortaleza, 24 de abril de 2009

Protocolo COMEPE nº 104/ 09

Pesquisador responsável: Maria Denise Rodrigues de Moraes

Dept°./Serviço: Departamento de Odontologia/ UFC

Título do Projeto: "Efeito do envelhecimento de materiais restauradores no biofilme dental e desmineralização do esmalte e dentina: estudo in situ"

Levamos ao conhecimento de V.S^ª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 23 de abril de 2009.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC