



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

ROSANE PONTES DE SOUSA

AVALIAÇÃO *IN SITU* DO EFEITO ANTICARIOGÊNICO DE DIFERENTES
MATERIAIS RESTAURADORES

FORTALEZA
2008

ROSANE PONTES DE SOUSA

AVALIAÇÃO *IN SITU* DO EFEITO ANTICARIOGÊNICO DE DIFERENTES
MATERIAIS RESTAURADORES

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
2008

Ficha catalográfica

S698a Sousa, Rosane Pontes de
Análise *in situ* da inibição de cárie secundária por diferentes materiais restauradores/ Rosane Pontes de Sousa. 2008.
43 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues
Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza,
2008.

1. Amálgama Dentário. 2. Resinas Compostas. 3. Cimentos de Ionômeros de Vidro. 4. Cárie Dentária-Prevenção e Controle. 5. Análise Microbiológica. 6. Testes de Dureza. I. Rodrigues, Lidiany Karla Azevedo (Orient.). II. Título.
CDD 617.695

À Deus,

A quem agradeço tudo que sou ...

Aos meus pais, Edvaldo e Terezinha,

*Agradeço por terem me mostrado que o conhecimento engrandece o homem e que a
humildade é o caminho para buscá-lo incessantemente.*

Aos meus irmãos, Samara, Edvaldo e André,

*Com suas diferentes personalidades, vocês me fazem acreditar que sempre posso ir mais
adiante, porque sei que estão ao meu lado...*

Ao meu esposo Rafael,

*Que soube, antes de tudo, ser paciente. Sua compreensão e seu carinho, foram
fundamentais nesta jornada ...*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. **Lidiany Karla Azevedo Rodrigues.**

Como orientada agradeço pelos ensinamentos da graduação, pela confiança, pela paciência e, principalmente, pela constante disponibilidade. Como aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, agradeço pelo empenho determinante na concretização do Laboratório de Pesquisa, que, até pouco tempo atrás, parecia tão distante da nossa realidade.

À Profa. Dra. **Iriana Carla Junqueira Zanin.**

Que colaborou enormemente com nosso grupo de pesquisa, ensinando-nos as diretrizes das atividades laboratoriais, especialmente na área de Microbiologia.

Ao Prof. Dr. **Jaime Aparecido Cury.**

Por sua contribuição para o aprimoramento desta defesa. Pelo enriquecimento dos estudos em Cariologia através dos inúmeros estudos publicados na área. Adicionalmente, prontamente disponibilizou a utilização dos equipamentos do laboratório de Bioquímica Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. **Ícaro de Sousa Moreira**.

À Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem, na pessoa de sua diretora Profa. Dra. **Neiva Francenely Cunha Vieira**.

À Coordenadora do Curso de Odontologia Profa. Dra. **Maria Eneide Leitão de Almeida**.

À Profa. Dra. **Cristiane Sá Roriz Fonteles**, Chefe de Departamento da Clínica Odontológica, departamento ao qual o Programa de Pós-Graduação em Odontologia está ligado.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Lima Santiago**, coordenador do **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, agradeço pelas orientações e pela dedicação na função desempenhada, buscando nosso aprimoramento. Aos demais professores que fazem parte do programa e que contribuíram para meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico **CNPQ**, pelo apoio financeiro concedido em forma de apoio à Pesquisa (Processo Número 472993/2006-2), essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Haroldo César Pinheiro Beltrão** pelo empenho e pelo zelo na instalação e na manutenção dos equipamentos do Laboratório de Pesquisa e pelas considerações na defesa da dissertação.

Aos Professores **Sérgio Lima Santiago, José Jeová Siebra Moreira Neto e Vicente de Paulo Aragão Sabóia**, que em muito contribuíram com o trabalho com suas sugestões na qualificação do projeto de pesquisa.

Aos amigos da turma de Mestrado **Francisco Cláudio Fernandes Alves e Silva, Alessandra Helen Magacho Vieira, Ana Catarina de Miranda Mota, Fábio Widson**; obrigada pela agradável convivência, pelas reflexões e sugestões recebidas.

Às minhas amigas do grupo de pesquisa, **Fátima Maria Cavalcante Borges, Juliana Paiva Marques Lima, Mary Anne Sampaio de Melo e Suyane Maria Luna Cruz de Vasconcelos**, agradeço cada momento de empenho na realização deste trabalho, o apoio de vocês foi essencial para a concretização deste ideal.

Às amigas que me acolheram e me ensinaram princípios dos ensaios microbiológicos na Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, **Carolina Steiner Oliveira e Cíntia**

Maria de Souza e Silva, além dos ensinamentos, sou grata pelos momentos descontraídos e pelo companheirismo.

A todos os **meus amigos** que me incentivaram quando tudo parecia árduo.

A professora **Maria Gessy Tito Pereira** pela correção ortográfica.

A bibliotecária **Rosane Maria Costa** pela confecção da ficha catalográfica e pelas orientações na normalização da dissertação.

A Profa. **Dra. Rosa Maria Salani Mota**, pela realização e esclarecimentos da análise estatística.

Aos **voluntários** do estudo *in situ* que tornaram possível a realização da parte experimental.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação **Germano Mahlmann Muniz Filho** e **Lúcia Ribeiro Marques Lustosa** pela constante disponibilidade em ajudar.

A todos os **funcionários** da UFC pela colaboração.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na concretização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A estrutura dentária imediatamente adjacente a restaurações é suscetível ao surgimento de cárie secundária, que pode ocorrer devido a imperfeições na adaptação de materiais restauradores e subsequente colonização por microrganismos. Logo, com o objetivo de identificar os métodos de prevenção da cárie secundária e aumentar a longevidade das restaurações, diferentes materiais restauradores têm sido introduzidos e usados na clínica odontológica. Desta forma, este estudo *in situ* avaliou os efeitos de diferentes materiais restauradores na composição microbiológica do biofilme dental bem como a habilidade destes materiais em proteger o esmalte adjacente dos ataques ácidos provenientes da atividade bacteriana. Foi empregado um delineamento duplo-cego, “*split-mouth*” realizado em uma fase de 14 dias, durante a qual, 20 voluntários utilizaram dispositivos intra-orais palatinos com cinco blocos de esmalte dental humano que foram restaurados extra-oralmente, de acordo com as recomendações do fabricante com um dos seguintes materiais: Resina composta Filtek Z250/Single Bond (grupo controle), Amálgama Permite, Ionômero de vidro modificado por resina encapsulado Fuji II, Ionômero de vidro modificado por resina Vitremer e Ionômero de vidro convencional Ketac Molar. Durante o período experimental, os voluntários utilizaram dentífricio fluoretado, 3 vezes ao dia e gotejaram sobre os blocos, uma solução de sacarose a 20%, 8 vezes ao dia em horários pré-determinados. No 14^o dia, o biofilme formado sobre os blocos foi removido para determinar a contagem de estreptococos totais e estreptococos mutans, bem como lactobacilos. A desmineralização (ΔS) ao redor da restauração foi avaliada através da análise de microdureza em corte longitudinal do esmalte a 20 e 70 μm da margem da restauração. Para detectar as diferenças entre os tratamentos, foram aplicados os testes Kruskal-Wallis e ANOVA seguida do teste dos quadrados mínimos para a microbiota cariogênica e ΔS , respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na microbiota cariogênica formada sobre os blocos. Na distância 20 μm , somente o Fuji II diferiu estatisticamente dos outros grupos apresentando a menor desmineralização. A 70 μm , o Fuji II inibiu significativamente a desmineralização quando comparado ao Permite, Filtek-Z-250 e Ketac Molar. Conclui-se que na situação de uso de dentífricio fluoretado associada ao desafio cariogênico do presente estudo, somente, o ionômero de vidro modificado por resina encapsulado apresentou uma proteção adi contra o desenvolvimento de cárie secundária.

Palavras-chave: Amálgama Dentário. Resinas Compostas. Cimentos de Ionômeros de Vidro. Cárie Dentária. Prevenção e Controle. Análise Microbiológica. Testes de Dureza.

ABSTRACT

Tooth structure immediately adjacent to restorations is susceptible to secondary caries, which may be caused by imperfect adaptation of restorative materials and subsequent microorganism colonization. Therefore, in order to identify methods of preventing secondary caries and increasing clinical dental restoration durability, different restorative dental materials have been introduced and applied in dental clinics. Thus, this *in situ* study assessed the effects of different restorative materials on the microbiological composition of dental biofilm and evaluated their ability of protecting the adjacent enamel against acid attacks from bacterial activity. A double-blind, split-mouth design was performed in one phase of 14 days, during which, 20 volunteers wore intra-oral palatal devices with five human enamel slabs, which were extra-orally restored according to the manufacturer's specifications, using one of the following materials: Filtek Z 250/Single Bond composite resin; Permitem amalgam; Fuji II encapsulated resin-modified glass ionomer; Vitremer resin-modified glass ionomer and Ketac Molar conventional glass ionomer.. During the experimental period, all subjects used fluoride-containing dentifrice 3x/day and a 20% sucrose solution was dripped onto the slabs 8x/day in predetermined times. The biofilm formed on the slabs was analyzed to determine total and mutans streptococci as well as lactobacilli counts. Demineralization (ΔS) was determined on enamel by cross-sectional microhardness at 20 and 70 μm from the restoration margin. In order to verify the differences among the treatments, Kruskal-Wallis and ANOVA followed by Minimum Squares test were applied for cariogenic microbiota and ΔS , respectively. No statistically significant differences were found in the cariogenic microbiota grown on the slabs. At 20- μm distance, only Fuji II statistically differed from the other groups presenting the lowest demineralization. At 70- μm , Fuji II significantly inhibited demineralization when compared to Permitem, Filtek-Z-250 and Ketac Molar. Concluding, in the background of fluoride dentifrice and under the cariogenic exposure condition of this study, only the encapsulated resin-modified glass ionomer material provided additional protection against secondary caries.

Key-words: Dental Amalgam. Composite Resin. Glass Ionomer Cements. Dental Caries. Prevention and Control. Microbiological Analysis. Hardness Test.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|-----------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 | PROPOSIÇÃO..... | 18 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 18 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 18 |
| 3 | CAPÍTULOS..... | 19 |
| 4 | CONCLUSÃO GERAL..... | 37 |
| | REFERÊNCIAS..... | 38 |
| | ANEXOS..... | 41 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

Cárie secundária ou recorrente é a terminologia utilizada para identificar lesões cariosas que ocorrem no esmalte adjacente a restaurações (FEJERSKOV; KIDD, 2007). A quebra da integridade marginal das restaurações origina a microinfiltração de bactérias, fluidos e produtos ácidos ao longo da interface esmalte-restauração, favorecendo o desenvolvimento de cárie secundária. O diagnóstico clínico deste tipo de lesão é, de longe, a razão mais comum para substituir restaurações, abrangendo 50 a 60% de todas as substituições de restaurações com resinas compostas, amálgama e ionômero de vidro (MJÖR; TOFFENETTI, 2000; MJÖR; GORDAN, 2002). Por conseguinte, boa parte do tempo clínico dos cirurgiões-dentistas é gasto com a troca ou reparos na interface dente-restauração. No entanto, estas medidas não paralisam a doença cárie, somente aumentam esta interface, tornando-a mais suscetível ao surgimento de uma nova lesão cariosa (FONTANA; ZERO, 2006). Além disso, é importante ressaltar que a substituição de restaurações inevitavelmente ocasiona um maior desgaste da estrutura dentária remanescente, aumentando assim a frequência de tratamentos de maior complexidade como intervenções endodônticas e restaurações indiretas.

Dentro deste contexto, materiais e tecnologias usados para prevenir ou controlar a incidência de cárie recorrente têm sido intensamente buscados e estudados em pesquisas científicas. Desde a observação de redução de cárie ao redor de restaurações de cimento de silicato (VOLKER *et al.*, 1944), o interesse por materiais fluoretados tem aumentado, e atualmente, há uma grande variedade de materiais restauradores fluoretados que apresentam diferentes composições e, conseqüentemente, características distintas na liberação de flúor (WIEGAND *et al.*, 2007). A diminuição da recidiva de cáries nas restaurações ocorre principalmente através da liberação de fluoretos pelos materiais restauradores (YAMAN *et al.*, 2004). No entanto, são considerados produtos cariostáticos, ou seja, inibidores da cárie secundária, os materiais restauradores que possuem a capacidade de liberar íons como prata, zinco ou cobre no meio oral, assim como a habilidade de incorporar estes agentes na estrutura dental adjacente (GAMA TEIXEIRA *et al.*, 2007).

O cimento de ionômero de vidro é o material restaurador mais próximo do ideal, no controle da cárie dental. No entanto, não é o material mais utilizado na clínica, pois apresenta desvantagens como: maior fragilidade quando comparado ao amálgama e à resina composta (FEJERSKOV; KIDD, 2007). Dentre suas significativas vantagens, os cimentos de ionômero apresentam biocompatibilidade, adesão à estrutura dentária e bom coeficiente de expansão térmica linear que proporcionam bom selamento marginal. Além disso, os ionômeros

apresentam contínua reação química que minimiza as microfendas; e liberação de flúor, atributo essencial na prevenção de cáries secundárias (VERBECK *et al.*, 1993 e MILLER *et al.*, 1995).

A liberação de flúor pelos cimentos de ionômero convencionais é diretamente afetada pela sua reação de presa. O resultado da reação entre o ácido poliacrílico e as partículas de vidro (flúor-alumínio-silicato) é a liberação de vários íons, inclusive o íon F^- . Após a reação de presa, ocorre contração volumétrica, menos prejudicial que a da resina, pois o material passa por uma fase borrachóide. Já a maioria dos cimentos de ionômero fotopolimerizáveis apresenta dupla reação de presa e devido à incorporação de monômeros na sua composição, eles necessitam de polimerização, similar às resinas compostas, no entanto, também possuem a reação ácido-base dos ionômeros convencionais. No entanto, há cimentos de ionômero fotopolimerizáveis que apresentam tripla reação de presa, reação esta relacionada à presença de amins terciárias.

Segundo Verbeck *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 do pó, que já vem em uma correta proporção. Além disso, a trituração mecânica permite uma maior relação entre as partículas e o líquido, resultando em maior quantidade de matriz e menor dose de partículas não reagidas. O flúor preso na matriz é então liberado em maior quantidade.

Em geral, o efeito inibitório *in vitro* do desenvolvimento de cáries secundárias pelos cimentos de ionômero está bem aceito (SERRA; CURY, 1992; SEPPÄ *et al.*, 1995; ZAURA-ARITE *et al.*, 1999; HAYACIBARA *et al.*, 2003). No entanto, estudos clínicos têm apresentado resultados conflitantes com os experimentos laboratoriais. Após uma revisão sistemática realizada por Randall e Wilson (1999), foi concluído que não foi possível afirmar a existência de efeito antibacteriano dos cimentos de ionômero de vidro no desenvolvimento de cáries secundárias.

O amálgama constitui-se de uma liga de mercúrio que pode ser adicionada a um ou mais metais. Introduzido na odontologia em 1835, não foi alterado em sua essência até os anos 60, quando ligas de alto teor de cobre foram introduzidas. O incremento do cobre possibilitou a redução da corrosão e da degradação marginal. Atualmente, o uso do amálgama tem diminuído em decorrência do desejo por materiais mais estéticos. Contudo, é um material que apresenta uma técnica de aplicação simples e com características mecânicas satisfatórias

(FERJESKOV; KIDD, 2007). Ainda apresenta longevidade, fácil uso e bom custo-benefício (MARSHALL; MARSHALL Jr., 1992). Entre os fatores que justificam a menor incidência de cáries secundárias ao redor de restaurações de amálgama, está o coeficiente de contração volumétrica que se acredita ser, no máximo, 0,2 %. Além disso, com o passar do tempo, o material se expande e os produtos de sua corrosão podem selar as margens da restauração, efeito este conhecido como auto-selamento, que reduz as fendas e proporciona maior durabilidade e menor índice de cárie recorrente (MARSHALL; MARSHALL JR., 1992). O amálgama contém alguns agentes cariostáticos, como íons de Ag, Cu e Zn, os quais podem ser liberados das restaurações. De acordo com as condições do meio oral, estes íons podem atuar como agentes antibacterianos, o que, clinicamente, pode representar cáries recorrentes pequenas e de desenvolvimento lento, quando comparado a restaurações de resina composta (GAMA TEIXEIRA *et al.*, 2007).

As resinas compostas entraram no mercado de produtos restauradores com a grande vantagem de serem estéticas. No entanto, sua baixa resistência ao desgaste, alto coeficiente de contração e sensibilidade da técnica operatória colocaram sua aplicação em questionamento. Constantes alterações nas formulações foram feitas, buscando suprir suas desvantagens. A resistência foi aumentada por novos tamanhos de carga, incluindo as nanométricas. Entretanto, os materiais resinosos não podem ser aceitos como material restaurador ideal (FEJESRSKOV; KIDD, 2007). Quando comparada a dos cimentos de ionômero, a menor liberação de flúor das resinas compostas deve-se ao fato da matriz orgânica restringir o contato do flúor com a água. No entanto, o sistema adesivo proporciona bom selamento marginal, o que provavelmente pode evitar desenvolvimento de cáries secundárias (GAMA TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Existe uma necessidade de determinar, previamente, a relativa eficiência de determinados materiais quanto a suas propriedades mecânicas, estéticas e quanto a sua capacidade antimicrobiana, de modo que os resultados de estudos laboratoriais auxiliem, clinicamente, na escolha dos produtos, antecipando possíveis problemas e expectativas do material. Com este objetivo, foram criados modelos *in vitro* e *in situ*. Entretanto, a validade dos dados somente é possível se o modelo de estudos é aplicado de forma apropriada e se os resultados são corretamente interpretados. Devemos atentar ainda para o fato de que o modelo deve ter peculiaridades inerentes ao produto que está sendo avaliado. Aliás, deve ser adequado às condições que os pesquisadores pretendem simular (ERICKSON; GLASSPOOLE, 1995).

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que materiais restauradores como o amálgama e o ionômero de vidro apresentam características ou componentes que proporcionam atividade antibacteriana (TYAS, 1991; MORRIS *et al.*, 1998; MOUNT, 1999; MJÖR; TOFFENETTI, 2000; WANG; LIU, 2000; HAYACIBARA *et al.*, 2003; BRAMBILLA *et al.*, 2005) e, conseqüentemente, conseguem inibir cárie recorrente em laboratório (LOBO *et al.*, 2005; ITOTA *et al.*, 2005). No entanto, um estudo realizado por Mjor & Gordan (2002) demonstrou que cerca de metade das restaurações de amálgama e ionômero de vidro que foram substituídas num período de dois ou três anos, foram-no devido ao diagnóstico de cárie secundária. Os resultados controversos entre os experimentos laboratoriais e clínicos não permitem afirmar se a incidência de cárie secundária pode ser significativamente reduzida pela liberação de flúor destes materiais (WIEGAND *et al.*, 2007). Possivelmente, essa discrepância de resultados pode ser justificada pelo fato de que em restaurações recém-confeccionadas há liberação do flúor em maior intensidade e que este padrão anticariogênico diminui com o passar do tempo. Ou seja, à medida que a restauração envelhece há uma menor liberação de flúor (RANDALL; WILSON, 1999).

No entanto, os modelos *in vitro* não oferecem uma série de fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie, como por exemplo: a ação da saliva e de substâncias provenientes do metabolismo bacteriano (RANDALL; WILSON, 1999). Adicionalmente, embora não se deva desprezar a utilidade de modelos *in vitro*, geralmente estes modelos não são adequados como preceptores da eficácia clínica dos agentes testados (ERICKSON; GLASSPOOLE, 1995). Em se tratando de materiais fluoretados, isto se torna ainda mais preocupante já que implica em uma relação dose-resposta exagerada quando comparada àquela obtida em estudos *in vivo*. É importante ressaltar também, que em sistemas *in vitro*, em que se utilizam tampões ou géis ácidos, o efeito na concentração de flúor nos fluidos orais da ação de limpeza da saliva bem como, o da presença de outras fontes de fluoretos que ocorrem *in vivo*, não são considerados. Além do mais, a liberação de flúor pode até ocorrer da mesma forma que acontece na boca, no entanto, a desmineralização é grandemente acelerada em modelos estáticos (ERICKSON; GLASSPOOLE, 1995). Quando modelos *in vitro* microbiológicos são usados, o estágio de remineralização e o controle do pH são difíceis de serem obtidos, a não ser que sejam utilizados fermentadores ou “bocas artificiais” (TANG *et al.*, 2003). Até onde vai o conhecimento dos pesquisadores envolvidos neste estudo, tais dispositivos não estão disponíveis em nosso país na atualidade.

Neste contexto, os estudos *in situ* apresentam significativa relevância, devido a razões éticas e às vantagens de um melhor controle experimental das variáveis, além de uma melhor

relação custo-efetividade. Desta forma, 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). Os estudos *in situ* podem refinar a compreensão sobre o desenvolvimento de novos materiais fluoretados, especialmente no que se refere às informações sobre o mecanismo de dose-resposta. Apesar disso, 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. Desta forma, estes estudos demonstram ser uma área de pesquisa frutífera, que deve ser explorada em maior escala (ERICKSON; GLASSPOOLE, 1995). Porém, apresentam certa subjetividade em relação à variação biológica de uma gama de voluntários, além de depender profundamente do comprometimento dos mesmos, especialmente nos modelos de longa duração (RANDALL; WILSON, 1999).

A busca incessantemente da comunidade científica por um material restaurador ideal, ou seja, de fácil manipulação, baixo custo, estético, alta longevidade e biocompatível enfatiza a significância clínica deste estudo que objetiva identificar materiais restauradores com atividade anticárie que possa se traduzir em uma menor incidência de cárie recorrente.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial anticárie de diferentes materiais restauradores quando submetidos a uma situação de desafio cariogênico *in situ*.

2.2 Objetivos específicos

- avaliar a perda mineral, através de análise de microdureza em corte longitudinal do esmalte, ao redor de restaurações confeccionadas com diferentes materiais restauradores submetidas a desafio cariogênico *in situ*;
- avaliar a composição microbiológica do biofilme formado sobre restaurações confeccionadas com diferentes materiais restauradores e submetidas a desafio cariogênico *in situ*.

3 CAPÍTULOS

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 Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado (Anexo B). Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo contendo um artigo submetido para publicação no periódico “Journal of Dentistry”, conforme descrito abaixo (Anexo C):

✓ Capítulo 1

Effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation.

Sousa RP, Rodrigues LKA, Zanin ICJ, Lima JPM, Vasconcelos SMLC, Melo MAS, Beltrão HCP.

Effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation.

Sousa RP¹, Zanin ICJ², Lima JPM¹, Vasconcelos SMLC¹, Melo MAS¹, Beltrão HCP¹,
Rodrigues LKA¹

¹Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ce,
Brazil

² Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará, Sobral, Ce, Brazil

Running Title –restorative materials and secondary caries.

Key words – Amalgam, Resin, Glass Ionomer, Caries prevention, Secondary Caries.

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 Cap. Francisco Pedro s/n -

Bairro- Rodolfo Teófilo - CEP 60430-170

Phone- #558533668410

Fax- #558533668232

Fortaleza-CE

E-mail: lidianykarla@yahoo.com

Effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation.

Abstract *Objectives.* Since secondary caries is one of the main reasons for replacing restorations, this study assessed the effects of different restorative materials on the microbiological composition of dental biofilm and on enamel demineralisation around the restoration.

Methods. A randomized, double-blinded, split-mouth *in situ* design was conducted in one phase of 14 days, during which, 20 volunteers wore palatal devices containing five human dental enamel slabs. Each slab was randomly restored with one of the following materials: Filtek-Z-250/Single Bond, control group (composite resin); Permite (amalgam); Fuji II (encapsulated resin-modified glass ionomer); Vitremer (resin-modified glass ionomer) and Ketac Molar (conventional glass ionomer). The volunteers used fluoride dentifrice, 3x/day and a 20% sucrose solution was dripped onto the slabs 8x/day. The biofilm formed on the slabs was analyzed to determine the counts of total streptococci, mutans streptococci and lactobacilli. Enamel demineralisation was determined by cross-sectional microhardness (CSMH) at 20 and 70 μm from the margin of the restoration. Kruskal-Wallis and Analysis of variance, followed by Minimum Squares test, were respectively used to evaluate microbiota and CSMH among the groups. The significance level used was 5%.

Results. No statistically significant differences were found in the cariogenic microbiota grown on the slabs. At 20- μm distance, only Fuji II statistically differed from the other groups presenting the lowest demineralisation. At 70- μm , Fuji II significantly inhibited demineralisation when compared to Permite, Filtek-Z-250 and Ketac Molar.

Conclusions. In the background of fluoride dentifrice and under the cariogenic exposure condition of this study, only the encapsulated resin-modified glass ionomer material provided additional protection against secondary caries.

Introduction

Enamel margins immediately adjacent to restorations are susceptible to secondary caries development, due to the possible presence of marginal gaps, porosities and imperfect adaptation of restorative materials. Consequently, the diagnosis of secondary caries is the main reason given by dentists for replacement of all types of restorations in permanent and primary teeth^{1,2}, being a major part of the dental treatment provided to patients in a general dental practice.³ Limited durability of dental restorations makes the restorations larger, increasing complexity of the required therapy. Hence, preventing or slowing down lesion progression could reduce the rate of restoration replacement, thereby reducing cost and the need for additional restorative treatment.

Although, little is known about the microbiology of secondary caries, one can suggest that the amount of plaque and its cariogenicity at restoration margins depend on the restorative material or luting cement used.⁴⁻⁸ These findings may indicate that resin-based materials accumulate more plaque, and this plaque would be more cariogenic than that seen on amalgam or ionomeric materials. Therefore, in order to identify methods of preventing secondary caries and increasing clinical dental restoration durability, different restorative materials with the promise of having anticaries properties have been developed. These properties may include the release of copper, Ag-Cu alloy, zinc, calcium, aluminum and fluoride, which are able to inhibit bacterial growth, decreasing both superficial colonization and acidogenicity of oral biofilms.⁹⁻¹¹

In vitro studies have demonstrated that amalgam and glass ionomers have potential for inhibiting growth of cariogenic bacteria, cariogenicity of oral biofilms or enamel demineralisation.¹²⁻¹⁹ However, *in situ* and in vivo studies have found controversial results regarding the anticaries effects of these restorative materials.^{8,20-23} Therefore, the lack of agreement between laboratory tests and clinical experiments do not confirm that the incidence of secondary caries can be significantly reduced by using either one of these materials.^{24,25}

Several in vitro and *in situ* models have been successfully used to evaluate the effects of F released from glass-ionomer cements.^{8,19,20,22,23,26} Nevertheless, in vitro models present limitations, and *in situ* studies testing amalgam and different formulations of glass ionomers in the presence of fluoridated dentifrice are rare. Thus, this study aimed to evaluate the *in situ* secondary caries inhibiting potential of restorative materials currently used in dental practice, to test the null hypothesis that there was no difference in the caries inhibiting properties of these different materials or in the composition of the biofilm formed on the slabs.

Materials and Methods

Panelists and Ethical Aspects

The study protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the Federal University of Ceará Medical School (protocol # 111/2006). Twenty healthy adults (14 females and 6 males), aged 19-36 years, with normal salivary flow rates, able to comply with the experimental protocol, not using fixed or removable orthodontic devices, were invited to participate in this study. None of the participants underwent antibiotic use 2 months prior to study initiation. Consent forms were signed prior to enrollment in the study.

Experimental design

A randomized, double-blind, split-mouth *in situ* design was conducted in one phase of 14 days, during which, 20 volunteers wore palatal devices containing five human dental enamel slabs. Each slab was randomly restored with one of the following materials: Filtek-Z-250TM/Single BondTM composite resin, control group, (3M ESPE Dental Products, St. Paul, Minn., USA); PermiteTM amalgam (SDI Limited, Bayswater, Australia); Fuji IITM encapsulated resin-modified glass ionomer (GC America Inc. Alsip, IL; USA); VitremerTM resin-modified glass ionomer (3M ESPE Dental Products, St. Paul, Minn., USA) and Ketac MolarTM conventional glass ionomer (3M ESPE Dental Products, St. Paul, Minn., USA). The study was not double-blinded only with regard to amalgam treatment, since volunteers could identify its characteristic appearance. 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 non-fluoride releasing materials should be on the same side of the palatal appliance and, consequently, fluoride releasing materials on the opposite side (Fig. 1A)^{27,28}. Within each side of the palatal device, the positions of the specimens were randomly determined. To test the null hypothesis, the following response variables were evaluated: loss of hardness (ΔS) at 20 and 70 μm from the restoration. Additionally, total streptococci (TS), mutans streptococci (MS) and lactobacilli (LB) counts were analyzed in the biofilm formed on the restored dental enamel slabs. For statistical analysis, the volunteer was considered as an individualized block.

Enamel slabs and Restoration of enamel cavities

Fifty extracted impacted human third molars, with more than two-thirds of formed roots, 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 one month. One hundred and twenty enamel slabs (5 x 5 x 2 mm³) were obtained using a water-cooled diamond saw and a cutting

machine (IsoMet™ Low Speed Saw, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), and the surfaces to be treated were polished for 30 seconds using a 5 µm alumina/water suspension in order to expose fresh enamel. A # 2294 cylindrical diamond bur (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) that provides a stop to limit the depth of penetration was used in a high-speed turbine with air-water spray. The diamond burs were changed after 10 preparations. A standard cavity was prepared with all margins in enamel on buccal/lingual surfaces (diameter 1.8 ± 1 mm, and depth of 1.5 mm) and the specimens were kept moist throughout all the steps. After preparation, all slabs were sterilized by autoclaving according to Ameachi *et al.*²⁹ Afterwards, they were randomly divided into five groups of 20 specimens according to the treatments.

All cavities were restored according to the treatment group following the manufacturer's specifications. Before placement of restorations, all cavities and slabs surfaces were cleaned with rotating brushes and abrasive paste and washed with distilled water. For photo-activated materials, cavities were restored in one increment and light-polymerized using a halogen-based light-curing unit (Optilux 400™- Demetron Research Corp, Danbury, CT, USA). The light output was tested ($480 \pm 32\text{mW/cm}^2$) before each use with a Demetron Model 100 radiometer (Demetron Research Corp, Danbury, CT, USA). Ionomeric materials were placed in a single bulk with a syringe (Centrix Inc., Shelton, CT, USA), but for Fuji II, which capsule was placed in its applicator for delivery. The slabs were then polished with aluminum oxide discs (Sof-lex disk system 3M ESPE Dental Products Division) being each disk applied for 15 seconds. Slabs restored with amalgam were polished using an Amalgam Polishing Kit (Shofu Dental Corporation, San Marcos, California, USA). Next, all slabs were stored in 100% humidity for 24 hours and put in the palatal appliances for *in situ* cariogenic challenge.

Palatal device preparation

For each volunteer, an acrylic custom-made palatal device was made in which 5 cavities ($6 \times 6 \times 3 \text{ mm}^3$) were prepared on the left and right sides, and into each of them, one slab was placed. In order to allow biofilm accumulation, and protect it from mechanical disturbance a plastic mesh was positioned on the acrylic resin, leaving a 1-mm space from the slab surface.²⁷

Intra-oral Phase

During the lead-in (7 days) and experimental periods, the volunteers brushed their teeth with a fluoridated dentifrice (Sorriso Dentes Brancos® – calcium carbonate-based dentifrice,

1,500 µg F/g, as MFP, Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brazil) and manual Indicator® 35 toothbrushes (Procter & Gamble do Brasil, São Paulo, SP, Brazil).

In order to provide a cariogenic challenge, the volunteers were instructed to take out the appliance from the mouth, to remove the excess of saliva with gauze and drip one drop of 20% sucrose solution onto each mesh that was above the enamel slab, eight times per day at predetermined times (8.00, 9.30, 11.00, 14.00, 15.30, 17.00, 19.00 and 21.00)³⁰ (Fig. 1B). Before replacing the palatal appliance in the mouth, a 5-min waiting time was standardized for sucrose diffusion into the dental biofilm.

The dentifrice treatment was performed 3 times a day, after main meal-times and when volunteers' habitually performed oral hygiene. The appliances were extra-orally brushed, except the enamel slabs, and volunteers were asked to brush carefully over the covering meshes, to avoid disturbing the biofilm. They were asked to brush their teeth and appliance for up to 5 minutes. All volunteers consumed fluoridated water (0.70 mg F/l) and received oral and written instructions to wear the appliances at all time, including nights. They were allowed to remove the appliances only during meals and when performing oral hygiene. When removed devices were kept moist in plastic boxes.³¹

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 device. The plastic mesh was removed and the biofilm formed on the specimens was collected with sterilized plastic curettes (Fig. 1C). The biofilm was weighed (± 1 mg) in pre-weighed microcentrifuge tubes, to which 0.9% NaCl solution was added (1 mL/mg biofilm). The tubes were agitated during a 2-min period in a Disrupter Genie™ Cell Disruptor (Precision Solutions, Rice Lake, Wisconsin, USA) with three 0.1-mm diameter glass beads to detach the bacterial cells. Afterwards, the suspension was serially diluted (1:100 1:1000, 1:10000, and 1:100000) with 0.9% NaCl solution. Samples were plated in triplicates in mitis salivarius agar containing 20% sucrose, to determine TS, and in mitis salivarius agar plus 0.2 bacitracin/ml, to determine MS³² and Rogosa agar supplemented with 0.13 % glacial acetic acid to assess the number of CFU of lactobacilli (LB) (Fig. 1C). The plates were incubated for 48 h at 37°C using candle-extinguish jars obtaining a 5-10% carbon dioxide atmosphere. Representative colonies with typical morphology of MS, TS and LB were counted using a colony counter. The results were expressed in CFU/mg dental biofilm (wet weight) and in percentage of mutans streptococci group (%MS) in relation to total streptococci.

Cross-Section Microhardness Testing (CSMH)

Enamel slabs were longitudinally sectioned through the center of the restoration (Fig 1D). The segments were embedded in acrylic resin and serially polished. Cross-sectional microhardness measurements were made with a microhardness tester (Future Tech FM-ARS; Tokyo, Japan) with a Knoop diamond under a 25 g load for 5 s.

Two lanes of twelve indentations each were made, one lane being 20 μm distant from the preparation margin and the other, 70 μm distant. The indentations were made at the following depths: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 μm from the outer enamel (Fig. 1E).²⁷

The mean Knoop hardness number (KHN) values, at each position from the surface, and at 20 and 70 μm distance from the enamel-restoration interface, were obtained. Thus, KHN was plotted against depth for each specimen and the integrated hardness profile of the demineralisation was calculated relative to underlying sound enamel. The mean sound enamel values of KHN for computation of integrated demineralisation were obtained from inner sound enamel under the lesion in the same tooth. To compute ΔS (integrated demineralisation), the integrated hardness profile of the demineralisation was subtracted from the value obtained for sound enamel. The data were expressed in Knoop hardness number (kg/mm^2) to calculate ΔS since there is discrepancy in the literature to convert the values in mineral volume percent.^{20,33}

Statistical Analysis

In order to assess the effect of the treatments, the dependent variables TS, MS, LB counts, %MS and ΔS were analyzed; the assumptions of equality of variances (Levene Test) and normal distribution of errors (Shapiro Wilks test) were checked, and in case of assumptions violation, data were transformed. For variables LB, TS, MS and %MS, equality of variances, normal distribution of errors and absence of outliers were not satisfied, thus since it was not possible to normalize these data, a non-parametric test for comparing multiple independent samples (Kruskal-Wallis) was applied. For ΔS parameters at both distances, a Split-Split Plot ANOVA in blocks (20 volunteers) according to the treatments (plot factor- 5 treatments and sub-plot factor - 2 distances) was followed by Minimum Squares test to evaluate the significance of all pair wise comparisons and the significance limit was set at 5%. Additionally, Mann-Whitney U Test was applied in order to compare fluoride releasing and non-fluoride releasing materials placed in opposite sides of the device. The software SPSS 15.0 for Windows was used.

Results

With regard to microbiological composition of the biofilm formed on the slabs restored with the different materials, no significant differences were found between the treatments (Table 1).

For ΔS parameter, at 20- μm distance, only Fuji II statistically differed from all other groups, presenting the lowest ΔS value. At 70- μm , Fuji II significantly inhibited demineralisation, when compared to Permite, Filtek-Z-250 and Ketac Molar, no other comparison was statistically significant (Table 2).

When ΔS parameter was compared between F-releasing and non-F-releasing materials (comparison between sides of the device), the values were statistically significant, lower for F-releasing materials (Table 3).

Discussion

Secondary or recurrent caries are the terms used to define the primary caries lesions that occur along the margins of an existing restoration over time.^{3,34} This kind of lesion has been known since the beginning of restorative dentistry, and it was the basis for one of the G.V. Black's well-established principles of cavity preparation, the extension-for-prevention.³⁵ However, secondary caries is still considered the main cause for replacement of restorations;³ consequently, controlling secondary caries is an important clinical issue.

This study was designed to explore the effects of different restorative materials on the initiation of caries adjacent to enamel restorations in controlled *in situ* conditions under fluoride presence. The current study used an *in situ* caries model which was previously reported to be cariogenic to human dental enamel.^{30,36} The use of fluoride-containing dentifrice was included in this experimental model, since over 95% of all dentifrices sold in the U.S., Brazil and Western Europe contain fluoride.³⁷⁻³⁹ Additionally, it has been demonstrated that, in the presence of fluoridated toothpaste, demineralisation is evident with a frequency of carbohydrate consumption equal or higher than 7-times/day.⁴⁰ Another important point is that as significant differences were found between treatments placed in different sides of the palatal appliance carry-across effect was not evidenced. Thus, the present *in situ* model was considered suitable for testing the possible anticaries effects of restorative materials.

Only enamel specimens restored with encapsulated resin-modified glass ionomer presented significantly less demineralisation than specimens restored with resin composite (non-ion releasing material). Possibly, this has occurred because the encapsulated resin-modified glass ionomer has pre-determined powder/liquid formulations, and ease in the

manipulation of this material, could reduce the variability of results for this cement. In addition, the mechanic mixing may allow a greater fluoride release when compared to conventional glass ionomer.^{41,42} Indeed, since no other material was able of inhibiting demineralisation around the restoration when compared to composite resin, these *in situ* data confirm previous reports, in which demineralisation inhibition on enamel secondary caries by non-encapsulated ionomeric materials was not observed.^{8,20,22} However, the current results do not corroborate with previous *in vitro* studies, where a significant effect of fluoride containing restorative materials on secondary caries inhibition was found.^{13,15-19,43-47} This difference in our results may be attributed to the fact that these studies did not consider the relevance of the dental biofilm in cariogenicity and fluoride-retention processes, as was presently done. Moreover, *in vitro* methodologies for testing inhibition of secondary caries have some question points, mainly related to the type of dose–response relationship, thus results are exaggerated and deviated considerably from the *in vivo* condition. Furthermore, for most microbiological models only one bacteria type is involved in the caries process.⁴⁸ The results of these *in vitro* model systems may not be directly transposed to clinical reality.

Since statistically significant caries inhibitory effects were found only for Fuji II and when F-releasing materials were compared to non-F-releasing, our results do not agree with previous work that found *in situ* inhibitory effects for non-encapsulated glass ionomers.⁴⁹⁻⁵² One possible explanation may be due to experimental differences used in these studies. Tenuta *et al.*⁵⁰ applied a short-term *in situ* model, which in our opinion may have super estimated the favorable effects of glass ionomers, because fluoride release tends to be higher in the period immediately following placement of fresh material.⁵³ Similarly, Amaral *et al.*⁵² have used glass ionomer cement for sealing pit and fissures, thus presenting different characteristics. Furthermore, Benelli *et al.*⁴⁹ and Yamamoto *et al.*⁵¹ have tested the materials without the added use of any kind of fluoride-containing toothpaste. Therefore, it may be suggested that fluoride release from restorative materials may not be necessary to prevent secondary caries in human enamel when fluoridated dentifrice is frequently used⁸, since salivary fluoride concentrations after insertion of different fluoride-releasing restorative materials are lower when compared to fluoride concentrations observed immediately after brushing with fluoride dentifrices.⁵⁴ Furthermore, regular use of fluoridated agents, such as fluoridated mouthrinses or dentifrices, may result in a long-term change in baseline salivary fluoride concentration.⁵⁵ In the same way, Cenci *et al.*²⁶ recently showed that in the presence of F dentifrice demineralisation adjacent to composite resin and glass ionomer was similar,

demonstrating that ionomeric material use is more important when fluoride from other sources is not present.

Microbiological analysis of oral biofilm revealed no differences between treatments (table 1). These results are supported by another *in situ* study²⁶ but do not support those found by Benelli *et al.*⁴⁹, who determined a lower level of mutans streptococci in the biofilm formed on glass ionomer cement. It is important to remember that the later study was performed using non-fluoridated dentifrice, which could have made more evident the antibacterial effect of fluoride released from glass ionomer material. To our knowledge, no other *in situ* studies have evaluated the antibacterial effects of amalgam on cariogenic bacteria. In addition to the ability of inhibiting caries development, other factors should be evaluated when choosing a restorative material. Adhesion, marginal sealing and mechanical as well as aesthetic properties are also relevant characteristics that should be taken into account.⁴⁷ Thus, in an *in situ* setting dental hygiene habits and the use of fluoridated dentifrice seem to be more important than the choice of restorative material for the control of secondary caries.

Conclusions

Only well controlled manipulated glass ionomer were able to inhibit secondary caries in the presence of fluoride, thus further clinical studies are yet needed to evaluate the impact of the anticaries efficacy of restorative materials on secondary caries development and progression, especially in groups of patients with limited access to or low compliance with prophylactic measures, such as the use of fluoridated toothpastes.

Acknowledgements

We thank the volunteers for their valuable participation. This research was supported by CNPq, grant # 472993/2006-2. The authors especially thank the Oral Biochemistry Laboratory of Faculty of Dentistry of Piracicaba for the use of their microhardness tester. The Oral-B Indicator® toothbrushes used in this study were donated by Shirley Caminha from Oral-B Division (Procter & Gamble do Brasil, São Paulo, SP, Brazil). The # 2294 cylindrical diamond bur were donated by KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil. This paper was based on a thesis submitted by the first author to Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing of Federal University of Ceará, in partial fulfillment of the requirements for a MS degree in Dentistry.

References

1. Mjör Ia, Toffenetti F. Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence Interanational* 2000;**31**:165-79.

2. Qvist V, Laurberg L, Poulsen A, Teglers PT. Eight-year study on conventional glass ionomer and amalgam restorations in primary teeth. *Acta Odontologica Scandinavica* 2004;**62**:37-45.
3. Mjör IA. Clinical diagnosis of recurrent caries. *Journal of the American Dental Association* 2005;**136**:1426-33.
4. Sønju T, Glantz PO. Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. *Archives of Oral Biology* 1975;**20**:687-91.
5. Ørstavik D, Ørstavik J. In vitro attachment of *Streptococcus sanguis* to dental crown and bridge cements. *Journal of Oral Rehabilitation* 1976;**3**:139-44.
6. Skjørland KK. Auger analysis of integuments formed on different dental filling materials in vivo. *Acta Odontologica Scandinavica* 1982;**40**:129-34.
7. Svanberg M, Mjör IA, Ørstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass ionomer restorations. *Journal of Dental Research* 1990;**69**:861-4.
8. Moura JS, Lima EM, Paes Leme AF, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of luting cement on dental biofilm composition and secondary caries around metallic restorations in situ. *Operative Dentistry* 2004;**29**:509-14.
9. Oppermann RV, Rölla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque *in vivo*. *Caries Research* 1980;**14**:422-7.
10. Morrier JJ, Suchett-Kaye G, Nguyen D, Rocca JP, Blanc-Benon J, Barsotti O. Antimicrobial activity of amalgams, alloys and their elements and phases. *Dental Materials* 1998;**14**:150-7.
11. Hayacibara MF, Rosa OPS, Koo H, Torres SA, Costa B, Cury JA. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. *Journal of Dental Research* 2003;**82**:267-71.
12. Palenik CJ, Behnen MJ, Setcos JC, Miller CH. Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers in vitro. *Dental Materials* 1992;**8**:16-20.
13. Tantbirojn D, Retief DH, Russell CM. Enamel, cementum and dentin fluoride uptake from a fluoride releasing resin composite. *American Journal of Dentistry* 1992;**5**:226-32.
14. Seppä L, Korhonen A, Nuutinen A. Inhibitory effect on *S. mutans* by fluoride-treated conventional and resin modified glass ionomer cements. *European Journal of Oral Science* 1995;**103**:182-5.

15. Tarn, 1997 Tarn LE, Chan GP, Yim D. In vitro caries inhibition effects byconventional and resin-modified glass-ionomer restorations. *Operative Dentistry* 1997;**22**:4–14.
16. Wandera A. In vitro enamel effects of a resin-modifiedglass ionomer: fluoride uptake and resistance to demineralization. *Pediatric Dentistry* 1998;**20**:411–7.
17. Glasspoole EA, Erickson RL, Davidson CL. A fluoride-releasing composite for dental applications. *Dental Materials* 2001;**17**:127–33.
18. Attar N, Önen A. Artificial formed caries-like lesions around esthetic restorative materials. *Journal Clinical Pediatrics Dentistry* 2002;**26**:289–296.
19. Yaman SD, Er O, Yetmez M, Karabay GA. In vitro inhibition of caries-like lesions with fluoride-releasing materials. *Journal of Oral Science* 2004;**46**:45–50.
20. Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Archives of Oral Biology* 1999;**44**:243-8
21. Papagiannoulis L, Kakaboura A, Eliades G. In vivo vs in vitro anticariogênico behavior of glass-ionomer and resin composite restorative materials. *Dental Materials* 2002;**18**:561-9.
22. Kielbassa AM, Schulte-Monting J, Garcia-Godoy F, Meyer-Lueckel H. Initial in situ secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. *Operative Dentistry* 2003;**28**:765-72.
23. 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 Oral Sciences* 2005;**113**:245-50.
24. ten Cate JM, van Duinen RNB. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *Journal of Dental Research* 1995;**74**:1266–71.
25. Kotsanos N. An intraoral study of caries induced on enamel in contact with fluoride-releasing restorative materials. *Caries Research* 2001;**35**:200–4.
26. Cenci MS, Tenuta LMA, Pereira-Cenci, Del Bel Cury AA, ten Cate JM, Cury JA. Effesct of microleakage and fluoride on enamel-dentine demineralisation around restorations. *Caries Research*, 2008 (In press).
27. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme, AF, Serra MC, Cury JA. Caries Progression and inhibition in Human and Bovine Root Dentine in situ. *Caries Research* 2003;**37**:339-44.

28. Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *Journal of Dental Research* 2004;**83**:71-5.
29. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Efficacy of sterilisation methods and their effect on enamel demineralisation. *Caries Research* 1998;**32**:441-6.
30. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL *et al.* Effect of Sucrose Containing Iron (II) on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ. *Caries Research* 2005;**39**:123-9.
31. 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.
32. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology* 1973;**18**:1357-64.
33. Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 1983;**17**:385-91.
34. Kidd EA: Diagnosis of secondary caries. *Journal Dent Education* 2001;**10**:997:1000.
35. Black GV. A work on operative dentistry: Medico-Dental Publishing. The technical in filling teeth. Chicago, Medico-Dental Publishing Co;1908, vol 11.
36. Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Featherstone JD. In situ mineral loss inhibition by CO2 laser and fluoride. *Journal of Dental Research*, 2006;**85**:617-21.
37. Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Brazilian Dental Journal* 2004;**15**:167-74.
38. Zero T Domenick: Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health*; 2006;**6**:1-13.
39. Mullen J. History of water fluoridation. *British Dental Journal* 2005;**8**:1-4.
40. Duggal MS, Toumba KJ, Amaechi BT, Kowash, Higham SM. Enamel Demineralization in situ with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. *Journal of Dental Research* 2001;**80**:1721-4.

41. Verbeeck RMH, Morr RJG, van Even, Martens LC. The short-term fluoride release of a hand-mixed vs. capsulated system of a restorative glass-ionomer cement. *Journal of dental research* 1992;**3**:577-81.
42. Miller BH, Komatsu H, Nakajima H, Okabe T. Effect of glass ionomer manipulation on early fluoride release. *American Journal of Dentistry* 1995;**8**:182-6.
43. Donly K, Gomez C. In vitro demineralization–remineralization of enamel caries at restoration margins utilizing fluoride-releasing composite resin. *Quintessence International* 1994;**25**:355–8.
44. Mayer T, Lenhard M, Pioch T. Effects of plastic filling materials on the demineralization behaviour of enamel. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 1996;**51**:235–7.
45. Pereira PN, Inokoshi S, Tagami J. In vitro secondary caries inhibition around fluoride releasing materials. *Journal Dentistry* 1998;**26**:505–10.
46. Hicks MJ, Flaitz CM. Resin-modified glass-ionomer restorations and in vitro secondary caries formation in coronal enamel. *Quintessence International* 2000;**31**:570–8.
47. Gama Teixeira A, Simionato MRL, Elian SN, Sobral MAP, Luz MAAC. Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro. *Brazilian Oral Research* 2007; **21**:368-74.
48. 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**:343-62.
49. Benelli EM, Serra MC, Rodrigues Jr. AL, Cury JA. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. *Caries Research* 1993;**27**:280–4.
50. Tenuta LM, Ribeiro CC, Goncalves 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 Dentistry* 2005;**33**:491-7.
51. 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;**2**:157-60. Duckworth RM, Morgan SN: Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. *Caries Res* 1991;**25**:123–9.

52. Amaral MT, Guedes-Pinto AC, Chevitarese O. Effects of a glass-ionomer cement on the remineralization of occlusal caries--an in situ study. *Brazilian Oral Research* 2006;**2**:91-6.
53. Randall RC, Wilson NHF. Glass-ionomer restoratives: a systematic review of a secondary caries treatment effect. *Journal of Dental Research* 1999;**78**:628-37.
54. Duckworth RM, Morgan SN. Oral fluoride retention after use of fluoride dentifrices. *Caries Research* 1991;**25**:123-9.
55. Duckworth RM, Morgan SN, Murray AM. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. *Journal of Dental Research* 1987;**66**:1730-4.

Table 1. Microbiological analysis of dental biofilm according to treatment (Medians values with Median Error and *p*-value for each analysis).

| Microorganism (CFU/mg x 10 ⁶) | Treatment | | | | | <i>p</i> -value |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------------|
| | Z250 | Permite | Fuji II | Vitremer | Ketac Molar | |
| Total streptococci | 2.56±0.08 | 2.30±3.69 | 2.36±0.11 | 1.86±0.09 | 2.30±0.32 | 0.72 |
| Mutans streptococci | 0.02±0.06 | 0.03±0.36 | 0.02±0.02 | 0.04±0.03 | 0.02±0.07 | 0.99 |
| %SM | 1.80±1.39 | 3.10±0.51 | 2.10±1.18 | 3.10±1.68 | 2.10±0.79 | 0.87 |
| Lactobacilli | 2.46±0.88 | 1.41±3.51 | 3.36±0.70 | 0.70±1.17 | 2.36±1.24 | 0.58 |

CFU, colony-forming units; %SM, percentage of mutans streptococci group in relation to total streptococci

Table 2. Demineralisation (ΔS), for each treatment studied distances.

| Treatment/Groups | Distance from the restoration margin (μm) | |
|--|---|-------------------------------|
| | 20 | 70 |
| | ΔS | |
| Filtek Z 250 composite resin | 6220.8 ± 3863.6 ^a | 4780.5 ± 2149.5 ^a |
| Permite amalgam | 5149.1 ± 2430.9 ^a | 5874.7 ± 2292.2 ^a |
| Fuji II resin-modified glass ionomer | 3439.3 ± 2266.1 ^b | 3099.8 ± 1466.7 ^b |
| Vitremer resin-modified glass ionomer | 5916.5 ± 2208.5 ^a | 4393.0 ± 1956.0 ^{ab} |
| Ketac Molar conventional glass ionomer | 5809.8 ± 3727.3 ^a | 4682.0 ± 2052.3 ^a |

Data are expressed as mean value ± standard deviation (n=20).

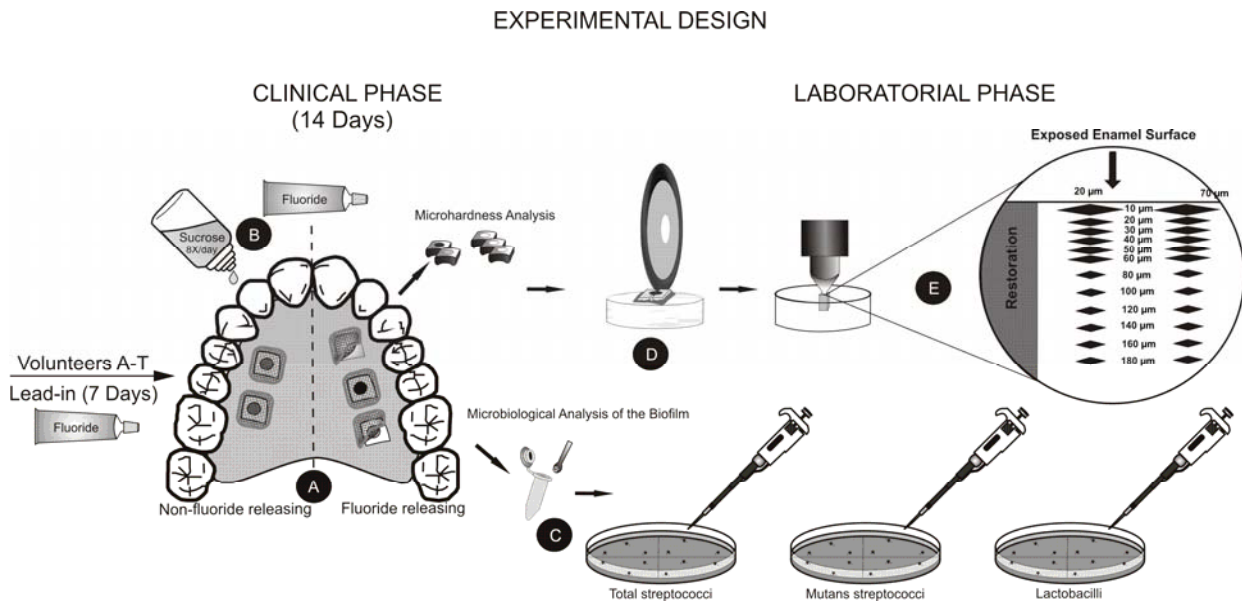
*Means followed by distinct letters are significantly different by Minimum Squares test (*p* < 0.05).

Table 3. Demineralisation (ΔS), for groups of treatment according to F-releasing capacity.

| Groups of Materials | Demineralisation (ΔS) | <i>p</i> -value |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Non-F-releasing materials | 6192.5±234.3 | 0.005 |
| F-releasing materials | 4556.7±770.6 | |

Data are expressed as mean value ± standard error (of Mean).

Figure 1- Representation of the experimental design used in the study.



4 CONCLUSÃO GERAL

- O ionômero de vidro modificado por resina encapsulado apresentou melhor habilidade para inibir cárie secundária, quando comparado a diferentes materiais restauradores numa situação de desafio cariogênico *in situ*.
- Futuros estudos clínicos devem ser realizados para avaliar a eficácia de materiais restauradores anticáries no desenvolvimento e progressão de cáries secundárias, especialmente em grupos de pacientes com acesso limitado a medidas preventivas;
- Além da ação antimicrobiana, o material restaurador deve possuir outras características relevantes que interferem diretamente na sua escolha, entre elas pode-se citar: bom selamento marginal, adesão, resistência ao desgaste e estética.

REFERÊNCIAS

- BENELLI, E. M.; SERRA, M.C.; RODRIGUES JR., A. L.; CURY, J. A. In situ anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res.**, v. 27, p.280–284,1993.
- BRAMBILLA, E.; CAGETTI, M.G.; GAGLIANI, M.; FADINI, L.; GARCIA-GODOY, F.; STROHMENGER, L. Influence of different adhesive restorative materials on mutans streptococci colonization. **Am. J. Dent.**, v.18, n. 3, p.173-176, 2005.
- ERICKSON, R. L.; GLASSPOOLE, E. A. Model investigations of caries inhibition by fluoride-releasing dental materials. **Adv. Dent. Res.**, v. 9, p. 315-323, 1995.
- FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dental: a doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Editora Santos, 2007.
- FONTANA, M.; ZERO, D. T. Assessing patients' caries risk. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 137, p. 1231-1239, 2006.
- GAMA TEIXEIRA, A.; SIMIONATO, M. R. L.; ELIAN, S. N.; SOBRAL, M. A. P.; LUZ, M. A. A. C. Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations *in vitro*. **Braz. Oral. Res.**, v. 21, p. 368-374, 2007.
- 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, p. 267-271, 2003.
- ITOTA, T.; AL-NAIMI, O. T.; CARRICK, T. E.; YOSHIYAMA, M.; MCCABE, J. F. Fluoride release and neutralizing effect by resin-based materials. **Oper. Dent.**, v. 30, p. 522-527, 2005.
- LOBO, M. M.; GONCALVES, R. B.; AMBROSANO, G. M.; PIMENTA, L. A. Chemical or microbiological models of secondary caries development around different dental restorative materials. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 2, p. 725-731, 2005.

MARSHALL, S. J.; MARSHALL, G. W. Jr. Dental amalgam: the materials. **Adv. Dent. Res.**, v. 6, p. 94-99, 1992.

MILLER, B.H.; KOMATSU, H.; NAKAJIMA, H.; OKABE, T. Effect of glass ionomer manipulation on early fluoride release. **Am. J. Dent.**, v. 8, p. 182-186, 1995.

MJÖR I. A.; GORDAN, V. V. Failure, repair, refurbishing and longevity of restoratives. **Oper. Dent.**, v.5, p.528-524, 2002.

MJÖR, I. A.; TOFFENETTI, F. Secondary caries: a literature review with case reports. **Quint. Int.**, v.31, p. 165-179, 2000.

MOUNT, G. J.; DAVIDSON, C. L.; MJÖR, I. A. Glass ionomer: advantages, disadvantages and future implications. *In*: DAVIDSON, C. L.; MJÖR, I. A. (Ed.). **Advances in glass ionomer cements**. Chicago, Il: Quintessence, 1999. p. 269-294.

MORRIER, J. J.; SUCHETT-KAYE, G.; NGUYEN, D.; ROCCA, J. P.; BLANC-BENON, J.; BARSOTTI, O. Antimicrobial activity of amalgams, alloys and their elements and phases. **Dent. Mater.**, v. 14, p. 150-157, 1998.

RANDALL, R. C.; WILSON, N. H. F. Glass-ionomer restoratives: a systematic review of a secondary caries treatment effect. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 2, p. 628-637, 1999.

SEPPA, L.; KORHONEN, A.; NUUTINEN, A. Inhibitory effect on *S. mutans* by fluoride-treated conventional and resin modified glass ionomer cements. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 103, p. 182–185, 1995.

SERRA, M. C.; CURY, J. A. The *in vitro* effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. **Quint. Int.**, v. 23, p.143–147, 1992.

TANG, G.; YIP, H. K.; CUTRESS, T. W.; SAMARANAYAKE, L. P. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **J. Dent.**, v. 31, p.161-171, 2003.

TENUTA, L. M.; RIBEIRO, C. C.; GONCALVES, 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, p. 491-497, 2005.

TYAS, M. J. Cariostatic effect of glass ionomer cement: a five-year clinical study. **Austr. Dent. J.**, v. 36, p. 236-239, 1991.

VERBEECK, R. M. H.; DEMOOR, R. J. G.; VAN EVAN, D. F. J.; MARTENS, L. C. The short-term fluoride release of hand-mixed versus casted restorative glass-ionomer cement. **J. Dent. Res.**, v. 72, n.3, p. 5777-5581, 1993.

VOLKER, J.; BEKARIS, B.; MELILLO, S. Some observations on the relationship between plastic filling materials and dental caries. **Tufts Dent. Outlook**, v.18, p. 4, 1944.

WANG J., LIU Z. Influence of amalgam on the growth of mutans streptococcus: an in vivo study: **Chin. J. Dent. Res.**, v. 3, p. 33-37, 2000.

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. Mat.**, v. 23, p.343-362, 2007.

YAMAN, S. D.; ER, O.; YETMEZ, M.; KARABAY, G. A. *In vitro* inhibition of caries-like lesions with fluoride-releasing materials. **J. Oral Sci.**, v. 46, p.45-60, 2004.

ZAURA-ARITE, E.; EXTERKATE, R. A. M.; TEN CATE, J. M. Effect of high fluoride concentration on bovine dentin demineralization in narrow grooves *in vitro*. **Eur. J. Oral. Sci.**, v.107, p. 55–460, 1999.

ANEXO A

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
AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 476/06 Fortaleza, 04 de setembro de 2006
Protocolo COMEPE nº 111/06
Pesquisador responsável: Lidiany Karla Azevedo Rodrigues
Deptº./Serviço: Departamento de Odontologia/ UFC
Título do Projeto: "Avaliação in Situ do efeito anticariogênico de diferentes materiais restauradores"

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 27 de julho de 2006.

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

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F. Frota'.

Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

ANEXO C
COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Print

<http://us.mg2.mail.yahoo.com/dc/launch?.rand=4gf9v4k0uc7gg>

From: Journal of Dentistry (JoD@elsevier.com)
To: lidianykarla@yahoo.com; lidianykarla@ufc.br
Date: Wednesday, June 4, 2008 5:31:23 AM
Subject: A manuscript number has been assigned

Dear Professor Rodrigues,

Your submission entitled "Effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation." has been assigned the following manuscript number: JJOD-D-08-00283.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/jjod/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Marie Dymond
Journal Manager
Journal of Dentistry