

**Concentração de flúor no esmalte adjacente a diferentes materiais
restauradores diretos após desafio cariogênico
in vitro com *Streptococcus mutans***

*Thaís Cachutê PARADELLA, Cristiane Yumi KOGA-ITO,
Antonio Olavo Cardoso JORGE*

*Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia,
UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil*

Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Fluoride concentration on enamel adjacent to different direct restorative materials after in vitro cariogenic challenge with *Streptococcus mutans*. Rev Odontol UNESP. 2008; 37(3): 291-296.

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de flúor no esmalte dentário humano adjacente a diferentes materiais restauradores após desafio cariogênico in vitro com *Streptococcus mutans*. Para isso, 72 terceiros molares humanos, recém-extraídos receberam preparos classe V padronizados e foram restaurados conforme os grupos: RC-Z: resina composta convencional Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-F: cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX. Foram cortados espécimes de 4 x 4 x 2 mm e subdivididos em Grupo controle (n = 6 mantidos em umidade relativa 100% a 37 °C durante todo o experimento) e Grupo experimental (n = 12). No Grupo experimental, os espécimes foram submetidos ao desafio cariogênico com cultura de *S. mutans* ATCC 35688 em caldo contendo sacarose a 5%, sendo este caldo substituído a cada 48 horas. Após 14 dias, os espécimes foram imersos em solução remineralizante por 14 dias, sendo então desidratados, metalizados e submetidos à espectroscopia por dispersão de raio X (EDS). Os resultados foram submetidos à análise estatística *Kruskall-Wallis* e *Student-Newman-Keuls* ($\alpha = 5\%$) e demonstraram que somente RC-Z apresentou diferença entre o Grupo controle e experimental (p = 0,0037). No Grupo experimental, houve diferença entre RC-Z e RC-F (p = 0,0450), RC-Z e CIV-V (p = 0,0107); RC-Z e CIV-F (p < 0,0001), demonstrando que a concentração de flúor no esmalte adjacente a CIV-V e CIV-F foi superior a dos materiais resinosos, que não apresentaram alta concentração de flúor no esmalte após desafio cariogênico, em comparação aos outros materiais.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; cárie; esmalte; flúor.

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the concentration of fluoride on human tooth enamel adjacent to different direct restorative materials after in vitro cariogenic challenge with *Streptococcus mutans*. For that, 72 freshly-extracted human third molars received standard class V preps and were restored according to the groups: RC-Z: Z250 conventional composite resin; RC-F: Freedom polyacid-modified composite resin; CIV-V: Vitremer resin-modified glass-ionomer; CIV-F: Fuji IX conventional glass-ionomer cement. Specimens of 4 x 4 x 2 mm were cut and subdivided into control Group (n = 6 kept in 100% relative humidity at 37 °C during all the experiment) and experimental Group (n = 12). In the experimental Group, specimens were submitted to cariogenic challenge with *S. mutans* ATCC 35688 in 5% sucrose broth, being this broth replaced every 48 hours. After 14 days, specimens were immersed in remineralizing solution for 14 days, being then dehydrated, gold-sputtered and submitted to X-ray diffraction spectroscopy. Results were statistically analyzed by *Kruskall-Wallis* and *Student-Newman-Keuls* ($\alpha = 5\%$) tests and showed that only Group RC-Z presented difference between control and experimental Group (p = 0.0037). In the experimental Group, there were differences between RC-Z and RC-F (p = 0.0450), RC-Z and CIV-V (p = 0.0107); RC-Z and CIV-F (p < 0.0001), showing that the fluoride concentration on enamel adjacent to CIV-V and CIV-F was higher than the resinous materials, which did not present high fluoride concentration on enamel after cariogenic challenge, in comparison to the other materials.

Keywords: *Streptococcus mutans*; caries; enamel; fluoride.

Introdução

A utilização de flúor* na Odontologia, sob a forma de fluoretos, é considerada uma das medidas preventivas ao desenvolvimento da cárie dentária, tendo grande importância na queda dos índices de cárie primária. No entanto, a cárie secundária, que se desenvolve sob ou ao redor de restaurações pré-existentes, ainda representa um problema real nos consultórios odontológicos, sendo a principal causa de substituição de restaurações. Desta forma, o flúor foi incorporado a várias categorias de materiais restauradores, incluindo as resinas compostas, dando origem às resinas compostas modificadas por poliácidos, na tentativa de reduzir os índices de cárie secundária¹⁻⁴.

A pesquisa com materiais restauradores que liberam flúor intensificou-se na última década^{1-3,5-6}. No entanto, faltam estudos que avaliem estes materiais em situações de desafio cariogênico, simulando a realidade encontrada no ambiente bucal⁷. Além disso, mais estudos experimentais e clínicos são necessários para desenvolver regimes de prevenção eficazes em relação a lesões de cárie secundária e entender a complexa relação entre a restauração, o ambiente bucal e a superfície dentária⁸.

Estudos envolvendo métodos de simulação de cárie têm se tornado freqüentes nos últimos anos, pois o estudo da formação e evolução das lesões cariosas, bem como seu comportamento sob as mais variadas condições, fornece subsídio às mais variadas situações clínicas encontradas na Odontologia^{4,7}.

Diversos métodos *in vitro* são utilizados, dentre eles a imersão em solução tampão ácida, que pode ou não conter cálcio e fosfato, ou a utilização de gel acidulado, dentre outros. A imersão em solução tampão ácida apresenta a tendência de produzir erosão. Além disso, estes modelos são estáticos e não simulam as condições *in vivo*^{4,7}. Modelos de ciclagem de pH são utilizados em estudos por serem dinâmicos, pois a cárie dentária representa um processo de alterar fenômenos de desmineralização com remineralização, os quais são função direta das condições que mantêm um pH crítico no ambiente bucal¹. No entanto, este modelo descarta a participação bacteriana, fundamental na cariologia.

Modelos microbiológicos de indução de lesão de cárie secundária envolvem a imersão de amostras em cultura de *Streptococcus mutans*, espécie altamente relacionada ao desenvolvimento de cárie de superfície lisa em seres humanos, somente ou em cultura de *S. mutans* em associação a outros microrganismos, como *Lactobacillus acidophilus*. É necessária a troca constante do meio de cultura para que não haja acúmulo dos subprodutos e interferência no pro-

cesso. Após a desmineralização bacteriana, as amostras são imersas em uma solução remineralizante. Apesar de não ser um método dinâmico, o modelo microbiológico pode ser utilizado por ser um modelo de alto desafio cariogênico no qual há participação bacteriana.

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de flúor no esmalte adjacente a diferentes materiais restauradores diretos após desafio cariogênico utilizando *Streptococcus mutans*.

Material e método

A metodologia utilizada neste estudo foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOSJC - UNESP), sob o protocolo 069/2005 - PH/CEP.

Setenta e dois terceiros molares humanos recém-extraídos, não-impactados, com 1/3 de raiz formada, armazenados em soro fisiológico e congelados foram utilizados. O tecido pulpar coronário foi removido retrogradamente com limas do tipo Hedström (Maillefer) nº 45, 50 e 60 esterilizadas. As cavidades pulpares e os condutos radiculares foram irrigados retrogradamente com 10 mL de hipoclorito de sódio 0,5% para remoção dos resíduos. Os dentes foram mantidos em soro fisiológico, em freezer (-18 °C)¹, até o momento de uso. As coroas dos dentes foram analisadas em lupa estereoscópica (aumento de 10x) e iluminação direta, tendo como critério de inclusão do espécime ausência de alteração de cor, trincas e/ou fraturas. Os dentes receberam polimento coronário utilizando taças de borracha, montadas em peça de mão em baixa velocidade e pasta de pedra-pomes e água por 15 segundos¹. A seguir, as amostras foram lavadas abundantemente com spray de ar e água até a remoção da pasta. Isto feito, as amostras foram mantidas em umidade relativa 100% em estufa de cultura (Fanem Ltda. – Modelo 002 DB, Brasil) a 37 °C¹.

Os dentes receberam preparos classe V padronizados em suas superfícies vestibulares e linguais. Todos os preparos foram realizados 5 mm acima da junção cimento-esmalte, no centro da superfície vestibular ou lingual. Estes preparos foram realizados com ponta diamantada (KG Sorensen, Referência 2294, Brasil), cuja ponta ativa contém 2 mm de diâmetro e 1,5 mm de profundidade, limitados por um *stop*, o que resultou em preparos cavitários padronizados, com margens localizadas totalmente em esmalte. Esta ponta diamantada foi acoplada a uma caneta de alta rotação (Kavo Super Torque 625, Brasil), com refrigeração constante de ar e água. Cada ponta diamantada foi utilizada para realizar 5 preparos.

Todos os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, conforme o material restaurador: RC-Z, no qual os espécimes foram restaurados utilizando sistema adesivo Prime & Bond 2.1 (Dentsply – Brasil) e resina com-

* Termo genérico para definir as formas químicas (íon flúor ou fluoreto) e ionizável (iônica ou covalente) do elemento flúor. Definição em Ramires I. Manual: flúor e fluoretação da água de abastecimento público. 2005. 155p.

posta Z250 (3M ESPE, St. Paul, Minnessota, USA); RC-F, no qual os espécimes foram restaurados utilizando o sistema adesivo Prime & Bond 2.1 e resina composta modificada por poliácidos Freedom (SDI, Florida, USA); CIV-V, no qual os espécimes foram restaurados utilizando ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE); CIV-F, no qual os espécimes foram restaurados utilizando cimento de ionômero de vidro convencional Fuji IX (GC International, USA).

Os materiais restauradores foram utilizados na cor A 3,5, em incremento único⁹, sendo ativados com o fotopolimerizador Optilight Plus (Gnatus, Brasil), previamente regulado em 500 mW.cm⁻² de potência¹⁰. Os espécimes foram então mantidos em umidade relativa 100% em estufa bacteriológica a 37 °C.

Vinte e quatro horas após os procedimentos restauradores¹⁰, os espécimes receberam acabamento e polimento com o sistema Sof-lex (3M ESPE) de discos de óxido de alumínio. Para a aplicação destes materiais restauradores, as recomendações de cada fabricante foram seguidas.

Os dentes restaurados foram cortados, utilizando discos diamantados dupla face (KG Sorensen – Referência 7020), acoplados à caneta de baixa rotação e refrigeração de ar/água, em espécimes de 4 x 4 x 2 mm, contendo a restauração no centro. Cada espécime foi então analisado em lupa estereoscópica (aumento de 10x) para avaliação da superfície restaurada. Os espécimes que apresentaram trincas ou fendas na superfície restaurada foram eliminados do estudo e substituídos por outros.

Para certificação de que os corpos-de-prova não apresentavam lesão de cárie inicial ou qualquer alteração do esmalte, foram radiografados com o auxílio de radiografia digital e examinados por um único avaliador. Corpos-de-prova com alteração radiográfica visível na superfície do esmalte foram excluídos do estudo.

A seguir, os corpos-de-prova foram colocados em placa de cultura de células (Costar Cambridge, Massachusetts, USA), identificados e esterilizados, utilizando dose de 20 kGy de radiação gamma, por meio da Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD), para não alterar a microdureza nem a resistência à desmineralização do esmalte^{6,11}. Após a esterilização, os espécimes foram subdivididos em Grupo controle (n = 6), mantido em umidade relativa 100% em estufa bacteriológica a 37 °C, sem ser submetido aos processos de desmineralização ou remineralização, e grupo experimental (n = 12).

No Grupo experimental, os espécimes foram submetidos ao desafio cariogênico utilizando cultura de *Streptococcus mutans* (ATCC 35688), semeada em meio de cultura proposto por Gibbons, Nygaard¹² (1968). A amostra padrão de *S. mutans* foi mantida em sangue de coelho, desfibrinado, a -10 °C. Para a semeadura, a amostra foi descongelada e repicada em caldo infusão cérebro-coração (*BHI Brain*

Heart Infusion, Difco) e incubada por 24 horas, em microaerofilia, a 37 °C. Foram feitos três repiques antes da inoculação em meio sólido. A partir do crescimento em meio sólido, os microrganismos foram transferidos para tubo de ensaio contendo 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%), com o auxílio de alça de platina e as suspensões foram padronizadas em 10⁶ células.mL⁻¹, com o auxílio de espectrofotometria (Shinadzu modelo UV-1203, Kyoto, Japan). Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda utilizados para *S. mutans* foram, respectivamente, 0,620 e 398 nm¹³.

Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar) e com auxílio de micropipetas de 1 mL e 1 µL (Labmate, HTL, USA) e pinça esterilizada, foram colocados em cada poço da placa de cultura de células: 1 espécime; 2 mL de meio de cultura para *S. mutans*; e 0,1 mL da suspensão de *S. mutans*. Os corpos-de-prova foram incubados a 37 °C em microaerofilia. A cada 48 horas, o meio de cultura foi trocado em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), utilizando-se micropipeta de 1 mL. A turvação do meio, após a troca, denotou crescimento bacteriano. Para certificar que não houve contaminação, a cada troca de meio, foi obtido o esfregaço e realizada a coloração de Gram, que evidenciou a ausência de contaminação.

Os espécimes ficaram imersos em cultura de *S. mutans* por 14 dias, conforme descrito por Itota et al.¹⁴ (2005) e Seeman et al.¹⁵ (2005). Após este período, os espécimes foram imersos em solução remineralizante durante 14 dias, conforme descrito por Seeman et al.¹⁵, (2005), com pH igual a 6,8 e mucina em sua composição¹⁶⁻¹⁷.

Findados os 28 dias de metodologia microbiológica de indução de lesão de cárie secundária (14 dias de imersão em cultura de *S. mutans* e 14 dias de imersão em solução remineralizante), os espécimes foram submetidos à análise por espectroscopia por dispersão de raio X (EDS).

A análise por EDS das lesões de cárie formadas foi realizada no Laboratório de Integração e Testes (LIT), Qualificação e Confiabilidade de Componentes, do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) em São José dos Campos, SP e no Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo (IGc-USP) em São Paulo, SP. Para isso, os espécimes foram desidratados, sendo imersos em soluções crescentes de álcool a 70% por 15 minutos, 80% por 15 minutos, álcool 90% por 15 minutos e 100% por 30 minutos¹⁸⁻¹⁹ e secos com papel de filtro. No LIT-INPE e no IGc-USP, os espécimes foram colocados em um *stubs*, sob fita de alumínio (3M Adhesives, Ltd., USA), submetidos a vácuo em um metalizador (Fisions Instruments, USA), no qual formou-se o plasma, e uma fina camada de ouro foi depositada sobre cada corpo-de-prova.

Em seguida, os *stubs* contendo os espécimes foram colocados sob microscópio eletrônico de varredura (Link Isis Oxford Instrument PLC. Leica, USA) para serem submetidos

novamente a vácuo. Com a fotomicrografia do espécime disposta no monitor acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, três janelas de 1 x 1 mm, sendo separadas por 1 mm, cobrindo a área desmineralizada, foram selecionadas, conforme demonstrado na Figura 1. Após a seleção da área desmineralizada, um feixe de elétrons de 20 KeV e 20 kV de voltagem de aceleração atingiu a janela e, após 50 segundos, o programa Isis *Suíte Revision 3.35* providenciou o cálculo da energia liberada pelo flúor (resultados em KeV) e a porcentagem relativa deste respectivo elemento químico²⁰⁻²³. No caso do Grupo controle, a área selecionada para a análise por EDS foi a de três *windows* no esmalte hígido adjacente à restauração.

O espectrômetro de dispersão de raio X (Link Isis Oxford Instrument PLC, Leica, USA) foi calibrado a cada quatro *stubs* (cada um contendo 8 espécimes), utilizando amostras-padrão de Cr_2O_3 , titânio e sílica e CaSiO_3 ²⁴, com desvio padrão de 1%. O tempo de medida foi de 25 segundos, sendo três medidas realizadas para cada espécime. Uma média aritmética foi obtida para cada espécime.

Os dados foram submetidos à análise estatística não-paramétrica utilizando os testes de *Kruskal-Wallis* e *Student-Newman-Keuls*, em nível de significância de 5%, utilizando o programa *Biostat 4.0*. A hipótese nula (H_0) foi que não haveria diferença estatística entre os grupos de materiais restauradores, bem como entre os Grupos controle e experimental.

Resultado

Os resultados do Grupo controle estão demonstrados na Tabela 1 e os do Grupo experimental na Tabela 2.

H_0 foi rejeitada, uma vez que houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais restauradores dentro do Grupo controle e dentro do Grupo experimental.

Os materiais restauradores do Grupo controle foram analisados estatisticamente entre si e os resultados demonstraram que os materiais apresentaram diferença estatística significativa na concentração de flúor entre os grupos RC-Z e CIV-V ($p = 0,0261$); RC-Z e CIV-F ($p = 0,0008$), com maior concentração de flúor no esmalte dos espécimes restaurados com os materiais ionoméricos.

Quando os materiais restauradores foram analisados dentro do Grupo experimental de indução de cárie por *S. mutans*, foi possível observar que houve diferença estatística significativa na concentração de flúor entre os materiais RC-Z e RC-F ($p = 0,0450$); RC-Z e CIV-V ($p = 0,0107$); RC-Z e CIV-J ($p < 0,0001$).

Discussão

A liberação de flúor por materiais restauradores é amplamente discutida na literatura^{1-3,6}. A metodologia mais

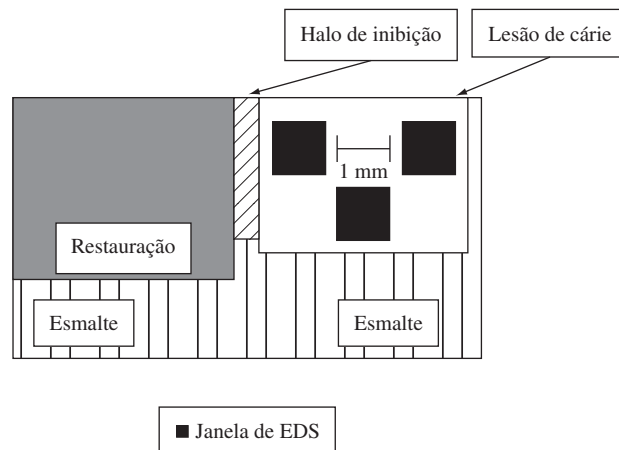


Figura 1. Representação esquemática das medidas obtidas por EDS.

freqüentemente encontrada é a avaliação da liberação de flúor por meio de eletrodos²⁻³. Embora seja uma metodologia fácil de ser executada e reprodutível, seus resultados devem ser analisados com cuidado, uma vez que se trata de uma metodologia *in vitro*, com limitações. Além disso, a liberação de flúor pelo material restaurador não significa sua incorporação imediata pelo substrato dentário. Desta forma, a análise da superfície de esmalte adjacente ao material restaurador nos parece fornecer dados mais substanciais.

Em adição à EDS, outras metodologias são encontradas na literatura para a análise química da superfície de amostras, dentre elas a WDS (*Wavelength Dispersion Spectroscopy* - espectroscopia por dispersão de ondas), a qual mede a concentração de elementos químicos leves, dentre eles o flúor, na superfície de amostras biológicas ou não. Para isso, é necessário que as amostras sejam metalizadas com carbono (e não ouro) e submetidas a vácuo por mais uma vez²⁵, se comparada à técnica da EDS. Uma vez que os espécimes do presente trabalho eram relativamente pequenos e finos, optou-se pela técnica da EDS, que embora possa parecer menos sensível que a técnica da WDS, preserva mais as amostras, pois o vácuo pode causar a quebra dos espécimes finos.

Os materiais restauradores utilizados no presente estudo procuraram abranger representantes de diferentes categorias de materiais estéticos diretos: resina composta convencional (Grupo RC-Z), resina composta modificada por poliácidos (Grupo RC-F), ionômero de vidro modificado por resina (Grupo CIV-V) e cimento de ionômero de vidro convencional (Grupo CIV-J). Dentre estes materiais, o único que não apresenta flúor em sua composição é a resina composta Z250. No entanto, Franci et al.⁵ afirmaram em seu estudo

Tabela 1. Resultados em % da massa do Grupo controle

Grupo	Média %F	Desvio padrão
RC-Z	0,26	± 0,3
RC-F	2,19	± 1,97
CIV-V	2,42	± 1,05
CIV-F	3,91	± 1,79

RC-Z: resina composta convencional Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-F: cimento de ionômero de vidro convencional Freedom.

Tabela 2. Resultados em % da massa do Grupo experimental

Grupo	Média %F	Desvio padrão
RC-Z	1,71	± 0,93
RC-F	3,26	± 2,39
CIV-V	3,77	± 2,32
CIV-F	5,18	± 2,65

RC-Z: resina composta convencional Z250; RC-F: resina composta modificada por poliácidos Freedom; CIV-V: ionômero de vidro modificado por resina Vitremer; CIV-F: cimento de ionômero de vidro convencional Freedom.

que esta resina, segundo seu próprio fabricante, não contém flúor em sua composição. Mas correspondências pessoais com o fabricante revelaram que flúor, em pequenas concentrações, é adicionado como catalisador⁵.

Em relação aos resultados obtidos no presente estudo, pode-se observar que os grupos restaurados com materiais ionoméricos (CIV-V e CIV-F) apresentaram maior concentração de flúor no esmalte adjacente, tanto nos Grupos controle quanto nos Grupos experimentais. Os resultados corroboram o trabalho de Francci et al.⁵, o qual relatou o efeito positivo da liberação de flúor por cimentos de ionômero de vidro, incluindo Fuji IX, na resistência à desmineralização dentária, quando os espécimes restaurados foram colocados em desafio cariogênico com *S. mutans*, embora a metodologia utilizada diferisse consideravelmente do presente trabalho.

O ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (grupo CIV-V) apresentou resultados melhores que outros cimentos de ionômero de vidro convencionais no estudo de Herrera et al.²⁶, com metodologia diferente da aplicada no presente estudo, uma vez que os espécimes foram associados a diferentes microrganismos relacionados ao desenvolvimento de lesões de cárie, dentre eles *Streptococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Actinomyces* spp, *Porphyromonas* spp e *Clostridium* spp. Os autores concluíram que a ação antibacteriana dos materiais ionoméricos não é limitada a microrganismos do esmalte, como os estreptococos, mas

também contra microrganismos envolvidos em cárie cementária, como *Actinomyces* spp e periodontopatógenos, como *Porphyromonas* spp, afirmando que estudos in vivo envolvendo materiais restauradores pudessem logo corroborar os resultados obtidos.

Em relação aos resultados obtidos neste estudo, pode-se observar maior concentração de flúor no esmalte adjacente às restaurações de materiais ionoméricos (CIV-V e CIV-F), tanto no Grupo experimental como no Grupo controle, confirmando os resultados encontrados na literatura^{1-3,6}, nos quais as resinas compostas modificadas por poliácidos não apresentaram alta liberação de flúor no esmalte adjacente e os cimentos de ionômero de vidro apresentam maior liberação de flúor do que outros materiais resinosos², embora diferentes fatores devam ser avaliados, quando se considera o desenvolvimento de cárie dentária secundária, tais como dieta, higiene oral, suplementação de flúor, etc., e não somente o conteúdo de flúor no dente² ou do material restaurador.

Conclusão

Com as limitações da metodologia aplicada neste estudo, pode-se concluir que houve maior concentração de flúor no esmalte adjacente aos materiais ionoméricos (CIV-V e CIV-F) após desafio cariogênico in vitro com *S. mutans*, quando comparados aos materiais resinosos, incluindo a resina modificada por poliácido, a qual demonstrou baixa concentração de flúor no esmalte adjacente, em relação aos demais materiais.

Agradecimento

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) o apoio financeiro a este estudo (#05/58458-6 e 06/52513-8); ao Laboratório de Integração e Testes do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (LIT-INPE) e ao Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo (IGc-USP) o auxílio com a espectroscopia por dispersão de raio X.

Referências

1. Nogueira EC, Serra MC, Morais PMR, Marchi GM. Avaliação in vitro da ação cariostática de híbridos de ionômero de vidro/resina composta. Rev Paul Odontol. 2001;23(3): 30-3.
2. Terada RSS, Navarro MFL, Carvalho RM, Taga E, Fernandes RBDH. Avaliação in vitro da liberação de flúor de cimentos de ionômero de vidro e outros materiais que contêm flúor. Rev Odontol Univ São Paulo. 1998;12:81-9.
3. Pereira IVA, Ribeiro PEBC, Paravini A, Tárzia O. Liberação de flúor por dois cimentos de ionômero de vidro com

- relação às proteções por presa – estudo in vitro. Rev Fac Odontol Bauru. 1999;7(3/4):21-6.
4. Ten Cate JM, Mundoff-Shrestha AS. Working group report 1: laboratory models for caries (in vitro and animal models). Adv Dent Res. 1995;9:323-4.
 5. Francci C, Deaton TG, Arnold RR, Swift EJ Jr, Perdigão J, Bawden JW. Fluoride release from restorative materials and its effects on dentin demineralization. J Dent Res. 1999;78:1647-54.
 6. Lennon AM, Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Approximal caries development in surfaces in contact in fluoride-releasing and non-fluoride releasing restorative materials: an *in situ* study. Eur J Oral Sci. 2007;115:497-501.
 7. Serra MC, Rodrigues Júnior AL. Potencial cariostático de materiais restauradores contendo flúor. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1998;52:359-63.
 8. Arnold WH, Sonkol T, Zoellner A, Gaengler P. Comparative study of in vitro caries-like lesions and natural caries lesions at crown margins. J Prosthodont. 2007;16(6):1-7.
 9. Asmussen E, Peutzfeldt A. Direction of shrinkage of light-curing resin composites. Acta Odontol Scand. 1999;57:310-5.
 10. Liporoni P, Paulilo LAMS, Cury JA, Santos Dias CT, Paradella TC. Surface finishing of resin-modified glass ionomer. Gen Dent. 2003;51:541-3.
 11. Rodrigues LK, Cury JA, Santos MN. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization in vitro. J Oral Sci. 2004;46:215-20.
 12. Gibbons RJ, Nygaard M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. Arch Oral Biol. 1968;13:1249-62.
 13. Carreto CFP, Navas EAFA, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência in vitro de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica. Rev Odontol UNESP. 2007;36:281-6.
 14. Itota T, Nakabo S, Narukami T, Tashiro Y, Torii Y, McCabe JF, et al. Effect of two-step adhesive systems on inhibition of secondary caries around fluoride-releasing resin composite restoration in root dentin. J Dent. 2005;33:147-54.
 15. Seeman R, Bizhang M, Klück I, Loth J, Roulet JF. A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation – development and initial testing. Caries Res. 2005;39:185-90.
 16. Samarawickrama DYD. Saliva substitutes: how effective and safe are they? Oral Dis. 2002;8:177-9.
 17. Eick S, Glockmann E, Brandl B, Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. J Oral Rehabil. 2004;31:278-85.
 18. Paradella TC, Fava M. Bond strength of adhesive systems to human tooth enamel. Braz Oral Res. 2007;21(1):4-9.
 19. Pelino JEP, Mello JB, Eduardo CP, Jorge AOC. In vitro study of the Nd:YAG laser effect on human dental enamel: optical and scanning electron microscope analysis. J Clin Laser Med Surg. 1999;17:171-7.
 20. Okazaki M. Crystallographic morphology of heterogeneous fluoridated carbonate apatites. J Dent Res. 1993;72:1285-90.
 21. Massara MLA, Alves JB, Brandão PRG. Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. Caries Res. 2002;36:430-6.
 22. Asaka Y, Miyazaki M, Aboshi H, Yoshida T, Takamizawa T, Kurokawa H, et al. EDX fluorescence analysis and SEM observation of resin composites. J Oral Sci. 2004;46:143-8.
 23. Fu B, Yuan J, Qian W, Shen Q, Sun X, Hannig M. Evidence of chemisorption of maleic acid to enamel and hydroxyapatite. Eur J Oral Sci. 2004;112:362-7.
 24. Statham PJ. A check total for validating standardless and normalized EDX analysis at low kv. Microchim Acta. 2004;145:229-35.
 25. Tantbirojn D, Douglas WH, Ko CC, McSwiggen PL. Spatial chemical analysis of dental stain using wavelength dispersive spectrometry. Eur J Oral Sci. 1998;106:971-6.
 26. Herrera M, Castillo A, Baça P, Carrion P. Antibacterial activity of glass-ionomer restorative cements exposed to cavity-producing microorganisms. Oper Dent. 1999;24:286-91.

Recebido: 15/04/2008

Aceito: 12/08/2008