

**FERNÃO HELIO DE CAMPOS LEITE JUNIOR**  
**CIRURGIÃO-DENTISTA**

Análise quantitativa e qualitativa do acúmulo de placa  
bacteriana *in situ* em resinas compostas com  
superfícies lisas e rugosas

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título  
de Doutor em Clínica  
Odontológica, Área de  
Concentração Dentística

**PIRACICABA**

**2005**

**FERNÃO HELIO DE CAMPOS LEITE JUNIOR**  
**CIRURGIÃO-DENTISTA**

Análise quantitativa e qualitativa do acúmulo de placa  
bacteriana *in situ* em resinas compostas com  
superfícies lisas e rugosas

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, da  
Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Doutor em  
Clínica Odontológica, Área de  
Concentração Dentística

**Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo**

**Banca Examinadora:**

**Prof. Dr. José Roberto Lovadino**

**Prof. Dr. Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo**

**Prof. Dr. Luís Roberto Marcondes Martins**

**Profa. Dra. Claudia Cia Worschech**

**Profa. Dra. Silmara Aparecida Milori Corona**

**PIRACICABA**

**2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

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

L536a      Leite Junior, Fernão Helio de Campos.  
Análise quantitativa e qualitativa do acúmulo de placa bacteriana  
*in situ* em resinas compostas com superfícies lisas e rugosas. /  
Fernão Helio de Campos Leite Junior. -- Piracicaba, SP : [s.n.],  
2005.

Orientador: Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Polimento dentário. 2. Reação em cadeia polimerase. 3.  
Polimorfismo de fragmento de restrição. I. Paulillo, Luís  
Alexandre Maffei Sartini. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Quantitative and qualitative analysis of *in situ* bacterial plaque retention  
in composites with smooth and rough surfaces

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Dental polishing; Polymerase chain reaction;  
Polymorphism, restriction fragment length

Área de concentração: Dentística

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: José Roberto Lovadino; Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo; Luís  
Roberto Marcondes Martins; Claudia Cia Worschech; Silmara Aparecida Milori Corona

Data da defesa: 28/02/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública  
realizada em 28 de Fevereiro de 2005, considerou o candidato FERNÃO HÉLIO DE  
AMPOS LEITE JÚNIOR aprovado.



---

PROF. DR. LUIS ALEXANDRE MAFFEI SARTINI PAULILLO



---

PROFa. DRa. SILMARA APARECIDA MILORI CORONA



---

PROFa. DRa. CLAUDIA CIA WORSCHACH



---

PROF. DR. LUIS ROBERTO MARCONDES MARTINS



---

PROF. DR. JOSE ROBERTO LOVADINO

*Aos meus pais Fernão e Isolina  
À minha esposa Regina  
E aos nossos filhos Lucas e Carolina*

***DEDICO***

**“Comece fazendo o que é necessário,  
depois o que é possível e, de repente,  
você estará fazendo o impossível.”**

*São Francisco de Assis*

# AGRADECIMENTOS

---

**Ao Prof. Dr. Luís Alexandre Maffei Sartini Paulillo**

Amigo de muitos anos, agradeço pela oportunidade que me proporcionou na realização deste curso de Doutorado, com grande admiração pela sua competência profissional, sinceridade, senso crítico, perfeccionismo e dedicação à pesquisa científica.

# AGRADECIMENTOS

---

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho e do Diretor Associado Prof. Dr. Mário Fernando de Góes.

Ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação da UNICAMP/FOP, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e ao Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos no ano de 2002.

Ao Dr. Rui Pereira Leite Junior, do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pelo auxílio e orientação para a realização das atividades de laboratório do estudo *in situ* e à Bióloga M.Sc. Michele Regina Lopes da Silva, pela execução dos procedimentos laboratoriais.

À Cirurgiã-Dentista M.Sc. Marlise Inês Klein, pela contribuição para o desenvolvimento da metodologia da análise qualitativa desta tese.

Aos voluntários do estudo *in situ*: Aretha, Barbizan, Dotto, Francielli, Francisco, Katia, Michelli, Raquel, Rodrigho e Silvia, pelo tempo precioso de dedicação e empenho, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.



À Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira, da Embrapa Soja, e ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos, do Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, pela realização das análises estatísticas.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, pelos conhecimentos e, em especial, aos Profs. Drs. José Roberto Lovadino, Luís Roberto Marcondes Martins e Marcelo Giannini, pelo acolhimento e incentivo.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, área de Dentística: Alex José Sousa Santos, Claudia Cia Worschech, Fabiana Mantovani Gomes e Flávio Henrique Baggio Aguiar, pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários da Área de Dentística, Reinaldo José Casagrande e Ana Carolina Ferraz e à secretária do Departamento de Odontologia Restauradora Denize Lumena Pinho, pelo apoio e atenção dispensados.

À Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, nas pessoas do Chanceler Prof. Marco Antônio Laffranchi e da Reitora Prof. Elisabeth Bueno Laffranchi, pelo apoio que possibilitou a realização do curso de pós-graduação.

Às demais pessoas que contribuíram para realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

---

|                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTAS .....                                                                                                                       | 1   |
| RESUMO .....                                                                                                                       | 5   |
| ABSTRACT.....                                                                                                                      | 7   |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                 | 9   |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                     | 15  |
| 2.1. Acúmulo de placa bacteriana e estudos <i>in situ</i> .....                                                                    | 15  |
| 2.2. Rugosidade superficial e estudos <i>in vitro</i> .....                                                                        | 32  |
| 2.3. Identificação de bactérias bucais pela técnica de reação em cadeia da<br>polimerase (“polymerase chain reaction”) - PCR ..... | 40  |
| 3. PROPOSIÇÃO.....                                                                                                                 | 51  |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                        | 53  |
| 4.1. Materiais .....                                                                                                               | 53  |
| 4.2. Métodos .....                                                                                                                 | 55  |
| 4.2.1. Confeção dos corpos de prova .....                                                                                          | 55  |
| 4.2.2. Tratamento superficial.....                                                                                                 | 57  |
| 4.2.3. Avaliação da rugosidade superficial <i>in vitro</i> .....                                                                   | 58  |
| 4.2.4. Avaliação do acúmulo de placa bacteriana <i>in situ</i> .....                                                               | 60  |
| 4.2.5. Avaliação qualitativa da placa bacteriana <i>in situ</i> .....                                                              | 66  |
| 5. RESULTADOS .....                                                                                                                | 73  |
| 5.1. Análise estatística da avaliação da rugosidade superficial <i>in vitro</i> .....                                              | 73  |
| 5.2. Análise estatística da avaliação do acúmulo de placa bacteriana <i>in situ</i> .....                                          | 76  |
| 5.3. Avaliação qualitativa da placa bacteriana <i>in situ</i> .....                                                                | 79  |
| 6. DISCUSSÃO.....                                                                                                                  | 87  |
| 7. CONCLUSÃO .....                                                                                                                 | 101 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                  | 103 |
| ANEXOS .....                                                                                                                       | 111 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Resinas compostas utilizadas nos ensaios <i>in situ</i> e <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                     | 53 |
| Tabela 2 - Sistemas de acabamento utilizados nos ensaios <i>in situ</i> e <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                | 55 |
| Tabela 3 - Delineamento estatístico, em esquema fatorial (3 x 2) para a<br>avaliação da rugosidade superficial <i>in vitro</i> .....                                                                                                           | 59 |
| Tabela 4 - Delineamento estatístico para a avaliação do acúmulo de placa <i>in<br/>situ</i> .....                                                                                                                                              | 66 |
| Tabela 5 - <i>Primers</i> utilizados nas análises de PCR.....                                                                                                                                                                                  | 68 |
| Tabela 6 - Resultado da Análise de Variância com dados transformados para<br>o estudo da rugosidade superficial <i>in vitro</i> , para a variável resposta<br>Ra ( $\mu\text{m}$ ) .....                                                       | 74 |
| Tabela 7 - Resultado da decomposição da Análise da Variância com dados<br>transformados para o estudo de rugosidade superficial <i>in vitro</i> ,<br>para a variável resposta Ra ( $\mu\text{m}$ ) .....                                       | 74 |
| Tabela 8 - Resultado do teste de Variação Múltipla de Duncan com dados<br>transformados para a interação Acabamento x Material no<br>ensaio de rugosidade superficial <i>in vitro</i> , para a variável resposta<br>Ra ( $\mu\text{m}$ ) ..... | 75 |
| Tabela 9 - Resultado da Análise de Variância para o estudo de acúmulo de<br>placa bacteriana <i>in situ</i> , para a variável resposta absorbância .....                                                                                       | 77 |
| Tabela 10 - Resultado da decomposição da Análise da Variância para o estudo<br>de acúmulo de placa bacteriana <i>in situ</i> , para a variável resposta<br>absorbância .....                                                                   | 77 |

|                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 11 - Resultado do teste de Tukey para o fator Acabamento no ensaio de acúmulo de placa bacteriana <i>in situ</i> , para a variável resposta absorbância .....                    | 78 |
| Tabela 12 - Perfis de PCR-RFLP dos genes de RNA ribossômico 16S de bactérias do grupo mutans streptococci, para as enzimas de restrição <i>HaeIII</i> , <i>CfoI</i> e <i>RsaI</i> ..... | 86 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Resinas compostas: Durafill VS, TetricCeram e Filtek P60.....                                                                                                       | 54 |
| Figura 2 - Materiais de acabamento dos corpos de prova: Tira Matriz e discos Sof-Lex de granulação grossa .....                                                                | 54 |
| Figura 3 - Matriz de teflon utilizada para confecção dos corpos de prova .....                                                                                                 | 56 |
| Figura 4 - Preparo dos corpos de prova em matriz de teflon.....                                                                                                                | 56 |
| Figura 5 - Corpos de prova das resinas compostas .....                                                                                                                         | 57 |
| Figura 6 - Rugosímetro utilizado na leitura da rugosidade superficial <i>in vitro</i> .....                                                                                    | 59 |
| Figura 7 - Dispositivo palatino com os corpos de prova, posicionado na cavidade bucal .....                                                                                    | 62 |
| Figura 8 - Exemplo do esquema de rodízio do posicionamento dos corpos de prova nos dispositivos palatinos, para um voluntário .....                                            | 63 |
| Figura 9 - Espectrofotômetro utilizado para leitura da quantificação da placa bacteriana .....                                                                                 | 65 |
| Figura 10 - Termociclador utilizado para processar a reação de PCR .....                                                                                                       | 69 |
| Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose .....                                                                                                                               | 69 |
| Figura 12 - Transiluminador de luz ultra-violeta utilizado para visualizar as bandas nos géis e sistema de digitalização de imagens.....                                       | 70 |
| Figura 13 - Rugosidade superficial <i>in vitro</i> de corpos de prova confeccionados com resinas compostas, com superfície lisa - Tira Matriz ou rugosa - Discos Sof-Lex ..... | 76 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14 - Avaliação do acúmulo de placa <i>in situ</i> de corpos de prova confeccionados com resinas compostas, com superfície lisa -Tira Matriz ou rugosa - Discos Sof-Lex .....                                                                                                      | 79 |
| Figura 15 - Amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os <i>primers</i> universais 8UA e 1492R .....                                                                                   | 81 |
| Figura 16 - Perfis gerados pela digestão com a enzima de restrição <i>HaeIII</i> do produto da amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os <i>primers</i> universais 8UA e 1492R..... | 83 |
| Figura 17 - Perfis gerados pela digestão com a enzima de restrição <i>CfoI</i> do produto da amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os <i>primers</i> universais 8UA e 1492R.....   | 84 |
| Figura 18 - Perfis gerados pela digestão com a enzima de restrição <i>RsaI</i> do produto da amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os <i>primers</i> universais 8UA e 1492R.....   | 85 |

## RESUMO

---

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da rugosidade superficial das resinas compostas de diferentes partículas de carga, sobre o acúmulo de placa bacteriana *in situ*, através da quantificação por meio de espectrofotometria e qualificação para o grupo mutans streptococci pela técnica da reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction” - PCR). Assim, foram confeccionados corpos de prova cilíndricos com os compósitos: Durafill VS, Tetric Ceram e Filtek P60, apresentando duas superfícies produzidas pela fotoativação do compósito em contato com a tira matriz de poliéster - superfície lisa e pelos Discos Sof-Lex de granulação grossa - superfície rugosa. Da interação resina composta e textura superficial foram constituídos 6 grupos experimentais: Durafill VS/Superfície Lisa, Durafill VS/Superfície Rugosa, Tetric Ceram/Superfície Lisa, Tetric Ceram/Superfície Rugosa, Filtek P60/Superfície Lisa e Filtek P60/Superfície Rugosa. A rugosidade superficial dos corpos de prova foi avaliada pela leitura em rugosímetro (Ra). Para a avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, foram selecionados dez voluntários, para os quais foram confeccionados dispositivos palatinos em acrílico, onde foram fixados seis corpos de prova correspondentes a cada grupo experimental. Os voluntários utilizaram o dispositivo com os corpos de prova por três dias na semana. No quarto dia das primeiras seis semanas, a placa formada sobre cada corpo de prova foi extraída em NaOH 1,0M e quantificada em espectrofotômetro. Os corpos de prova com superfície rugosa apresentaram maior acúmulo de placa bacteriana do que aqueles com superfície lisa, independente da resina composta utilizada. Entre os corpos de prova lisos, apesar de haver diferença estatística significativa entre a menor rugosidade superficial da resina composta de micropartículas (Durafill VS) e

a maior rugosidade das outras duas resinas compostas (Filtek P60 e Tetric Ceram), não foi observada diferença no acúmulo de placa entre os materiais testados. Na sétima semana, o DNA da placa bacteriana acumulada sobre os corpos de prova foi extraído e comparado através de PCR utilizando primers universais para bactérias do grupo mutans streptococci, que amplificam genes de RNA ribossômico 16S e digestão do produto da amplificação com as enzimas de restrição *HaeIII*, *CfoI* e *RsaI*. Constatou-se a presença de bactérias do grupo mutans streptococci nos corpos de prova confeccionados com as três resinas compostas testadas. Verificou-se semelhança nos perfis gerados pela análise de PCR-RFLP das amostras dos voluntários, indicando que as resinas compostas, Tetric Ceram, Durafill VS ou Filtek P60 e o tipo de superfície, lisa ou rugosa, não afetaram significativamente a composição da placa bacteriana acumulada nos corpos de prova para o grupo mutans streptococci.

**Palavras-chaves:** polimento dentário, reação em cadeia da polimerase, polimorfismo de fragmento de restrição.

# ABSTRACT

---

## **Quantitative and qualitative analysis of *in situ* bacterial plaque retention in composites with smooth and rough surfaces**

The aim of this study was to evaluate the effect of surface roughness of different filled composites on *in situ* bacterial plaque retention, quantified by spectrophotometry and qualified for mutans streptococci group by polymerase chain reaction (PCR). Specimens were prepared with the composites Durafill VS, Tetric Ceram and Filtek P60, with smooth and rough surfaces, produced by photoactivation through Mylar strip or Sof-Lex discs, respectively. The interaction composite x texture surface generated six experimental groups: Durafill VS/smooth surface, Durafill VS/rough surface, Tetric Ceram/smooth surface, Tetric Ceram/rough surface, Filtek P60/smooth surface and Filtek P60/rough surface. Surface roughness of samples was evaluated by profilometer reading (Ra). For *in situ* experiment, ten subjects were chosen which wore acrylic palatal appliances containing samples of the six experimental groups. All subjects wore the appliances for three days a week. In the fourth day of the first six weeks, the amount of dental plaque formed on the samples were extracted in 1.0M NaOH and analyzed by spectrophotometry. Rough surface samples showed significantly greater amount of bacterial plaque than smooth surface samples, for the three composites tested. For the smooth samples, in spite of the significant difference between the lower roughness of Durafill VS composite and the higher roughness of both Filtek P60 and Tetric Ceram composites, no difference was observed in the amount of bacterial plaque among the tested materials. In the seventh week, DNA of the bacterial plaque formed on the samples was extracted and compared by



PCR using universal primers for mutans streptococci group, which amplify ribosomal RNA 16S genes, and digestion of PCR products with the restriction enzymes *HaeIII*, *CfoI* e *RsaI*. Bacteria of mutans streptococci group were found in all composites samples. The profiles generated by the PCR-RFLP analysis of the volunteers' samples were similar, indicating that the composites Tetric Ceram, Durafill VS or Filtek P60 and the smooth or rough surfaces did not affect significantly the composition of the bacterial plate formed on the samples for mutans streptococci group.

**Key-words:** dental polishing, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism.

# 1. INTRODUÇÃO

---

As resinas compostas tiveram desenvolvimento acentuado no início da década de 60, quando Bowen desenvolveu a molécula de Bis-GMA, derivada de uma reação entre o bisfenol-A e o glicidilmetacrilato e partículas de carga silanizadas, as quais apresentavam potencial para se unir quimicamente à matriz orgânica, de modo a otimizar as propriedades físicas do material (Oshima & Conceição, 2000). Assim, os compósitos rapidamente substituíram os cimentos de silicato e as resinas acrílicas em restaurações estéticas de dentes anteriores (Anusavice, 1998).

A resina composta é um material formado, principalmente, por dois componentes, carga e matriz, insolúveis entre si. Para que esses dois componentes se mantenham unidos, as partículas de carga recebem um tratamento superficial através de sinterização ou silanização. O silano é uma molécula bifuncional que se une quimicamente à matriz e às partículas de carga (Lutz & Phillips, 1983). Além desses componentes principais, outros aditivos são misturados à matriz resinosa, tais como sistema ativador/inibidor, pigmentos e opacificadores (Anusavice, 1998).

Os compósitos odontológicos podem ser classificados com base na média do tamanho das partículas das cargas: macroparticuladas ou convencionais - partículas com tamanho entre 15 e 100 $\mu$ m, microparticuladas - tamanho de 0,04 $\mu$ m, híbridas - macro e micropartículas com tamanho médio entre 1 e 5 $\mu$ m e as micro-híbridas, que apresentam uma combinação entre micropartículas - 0,04 $\mu$ m e partículas maiores - com tamanho máximo de 2 $\mu$ m (Oshima & Conceição 2000). O tamanho das partículas de carga tem relação direta com a rugosidade superficial das resinas compostas e, conseqüentemente, com o acabamento e polimento (Van Noort & Davis, 1984).

Diferentes métodos para acabamento e polimento dos materiais estéticos têm sido utilizados para as resinas compostas. Esses métodos incluem discos de óxido de alumínio, pontas de resinas com abrasivos e pastas de polimento (Reis *et al.*, 2002). Estudos com compósitos têm demonstrado que a superfície mais lisa é obtida através da tira matriz (Wilson *et al.*, 1990; Stoddard & Johnson, 1991; Chung, 1994; Hoelscher *et al.*, 1998). Porém, é muito difícil realizar um procedimento restaurador apenas com essa matriz. Por isso, os procedimentos de acabamento e polimento são necessários.

Entre os materiais disponíveis para o acabamento e polimento de resinas compostas, os discos de óxido de alumínio promovem a superfície mais lisa (Van Noort & Davis, 1984, Wilson *et al.*, 1990; Hoelscher *et al.*, 1998). As pastas para polimento, usadas como agente intermediário de acabamento, ou as

brocas produzem uma superfície mais rugosa do que a obtida pelos discos (Van Noort & Davis, 1984, Wilson *et al.*, 1990; Hoelscher *et al.*, 1998).

Um dos parâmetros na avaliação de uma restauração com compósitos é a rugosidade da superfície que pode influenciar o acúmulo de placa bacteriana, levando à cárie secundária e inflamações gengivais nos tecidos adjacentes, bem como a alterações na cor e na textura dos materiais restauradores utilizados (Waerhaug, 1956; Paulillo *et al.*, 1997).

Baseado nas diferentes características genéticas, antigênicas e bioquímicas, as bactérias do grupo mutans streptococci estão, usualmente, subdivididas em sete espécies, que incluem *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* e *Streptococcus rattii* (Sato, 2003a). Dessas espécies, *S. mutans* e *S. sobrinus* têm sido encontradas em humanos e estão associadas à cárie dental, porque são freqüentemente isoladas da placa bacteriana, onde produzem polissacarídeos extracelulares para fixação e grande quantidade de ácidos que promovem desmineralização dos tecidos duros, caracterizando a cárie (Allaker *et al.*, 1998).

A identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus* é, normalmente, realizada pela análise da morfologia da colônia no meio de cultura mitis-salivarius ágar (Gold *et al.*, 1973). A confirmação pode ser feita por testes bioquímicos, imunológicos ou genéticos (Igarashi *et al.*, 1998).

Entre os testes genéticos, um dos mais utilizados é o método de reação em cadeia da polimerase - (“polymerase chain reaction” - PCR), que se baseia na replicação de uma sequência de DNA definida, de forma que sua quantidade é aumentada exponencialmente e pode ser visualizada em géis de eletroforese (Atlas & Bej, 1994). A técnica consiste em ciclos repetitivos de desnaturação do DNA, convertendo a fita dupla do ácido nucleico em fitas simples, anelamento de *primers* e extensão da fita de DNA pela ação de uma DNA polimerase (Atlas & Bej, 1994). Esta técnica tem sido utilizada para detectar e identificar bactérias do grupo mutans streptococci, bem como outros microrganismos da placa dental (Saarela *et al.*, 1996; Allaker *et al.*, 1998; Igarashi *et al.*, 1998; Rupf *et al.*, 1999; Marchant *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2001, 2003a, 2003b; Kato *et al.*, 2004).

Após a reação em cadeia da polimerase, a digestão dos produtos de PCR com enzimas do tipo endonucleases de restrição, que cortam o DNA entre uma sequência de nucleotídeos conhecida, pode trazer informações adicionais, resultando na técnica conhecida por análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (“restriction fragment length polymorphism” - RFLP), que é utilizada na construção de mapas genômicos (Brown, 2003).

Assim, a técnica da reação em cadeia da polimerase, utilizando *primers* universais para bactérias do grupo mutans streptococci, que se unem a sequências do gene de RNA ribossômico 16S (Rupf *et al.*, 1999, Sato *et al.*, 2001), seguido da digestão dos produtos de amplificação com enzimas de restrição (Sato *et al.*, 2003a, 2003b) consiste no método de PCR-RFLP, que pode ser utilizado

em experimentos para estudar a presença dessas bactérias associadas à cárie dental.

Da mesma forma, os estudos *in situ* proporcionam melhor entendimento da cárie e possibilitam antever os fatores para a sua prevenção (Ten Cate, 1992). Esses estudos têm sido utilizados para avaliar produtos para profilaxia da cavidade bucal (Featherstone & Zero, 1992; Proskin, 1992), influência de componentes alimentares (Featherstone & Zero, 1992), desmineralização do esmalte (Arends *et al.*, 1992), efeito de fluoretos na cariogenicidade (Koulourides & Chien, 1992; Benelli *et al.*, 1993), morfologia e composição da placa bacteriana (Zee *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 2004) e também para avaliar procedimentos de acabamento e polimento em cerâmicas ou materiais ionoméricos (Mendonça, 1999; Magalhães, 2000; Leite Jr., 2001).

Assim, torna-se relevante estudar a influência da rugosidade superficial de resinas compostas com diferentes tamanhos de partículas de carga, no acúmulo de placa bacteriana, utilizando-se metodologias *in situ* para quantificar e comparar as bactérias do grupo mutans streptococci intimamente relacionadas com a formação da cárie dental.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### **2.1. Acúmulo de placa bacteriana e estudos in situ**

Quirynen *et al.* (1990) realizaram um estudo clínico para avaliar as características das superfícies, como energia livre de superfície e rugosidade superficial, no acúmulo de placa bacteriana supragengival. Duas tiras, confeccionadas com polímeros de fluoretilenopropileno (FEP) e acetato de celulose (AC), com energia superficial livre de 20 e 58erg/cm<sup>2</sup>, respectivamente, foram afixadas na superfície vestibular de incisivos centrais de 16 voluntários. Metade da superfície de cada tira era lisa (Ra de 0,1µm) e metade era rugosa (Ra de 2,2µm). A formação de placa bacteriana nas tiras foi acompanhada por seis dias e comparada com a formação na superfície dental adjacente. As amostras foram analisadas em microscópio de luz para avaliar a proporção de células cocóides, tipo bastonetes e fusiformes. No terceiro dia, uma diferença significativa no acúmulo de placa foi observada na comparação da superfície rugosa com a lisa. Entretanto, no sexto dia, menor quantidade de placa, com diferença significativa, foi observada na tira FEP lisa (19,4%), quando comparada com a tira AC lisa (39,5%). Entre as tiras FEP rugosa (96,8%) e AC rugosa (98,2%), não foi observada diferença significativa. Os índices observados para as superfícies



rugosas foram maiores do que os obtidos para as superfícies lisas, com diferença estatística significativa. Pequenas diferenças na composição da placa bacteriana foram observadas: a maior percentagem de células bacterianas cocóides foi observada na tira FEP lisa (86,2%) e as menores percentagens foram verificadas nas tiras FEP rugosa (78,5%) e AC rugosa (82,8%). Os resultados do estudo indicaram que a influência da rugosidade superficial no acúmulo e na composição de placa bacteriana é mais proeminente que a influência da energia livre de superfície.

Koidis *et al.* (1991) avaliaram quatro técnicas para confecção de restaurações metalo-cerâmicas sem colar cervical, na tentativa de melhorar as qualidades estéticas da peça protética. Foram investigados a consistência final da cor, o acúmulo de placa bacteriana e as características da margem de porcelana. Vinte coroas para incisivo central superior foram confeccionadas de acordo com o protocolo dos fabricantes e na cor A<sub>2</sub> da escala Vita. Dados iniciais revelaram que o preparo das coroas sobre superfície de platina resultou em uma cor mais consistente. As superfícies metálicas exibiram o maior acúmulo de placa bacteriana *in vitro* (42,43%) e as margens de porcelana acumularam menos placa (7,23%), mesmo apresentando superfícies mais distintas e irregulares, observadas por microscopia eletrônica de varredura. Através dos resultados obtidos, os autores concluíram que a rugosidade superficial não é um fator predominante no processo inicial de acúmulo de placa bacteriana.

Para quantificar os parâmetros de perda mineral ao longo do tempo, é importante obter informações da cinética e, conseqüentemente, do mecanismo de formação da cárie dental. O trabalho de Arends *et al.* (1992) relatou dados da desmineralização *in situ* do esmalte humano em função do tempo. Os resultados mostraram que, para uma desmineralização do esmalte *in situ*, a profundidade da lesão, bem como a perda mineral, variaram linearmente com o tempo de desmineralização. Isto contrasta com a formação das lesões *in vitro*, já que a profundidade da lesão elevada ao quadrado foi linearmente relacionada com o tempo de desmineralização. Os autores concluíram que a desmineralização *in situ* foi bastante diferente da desmineralização *in vitro*, que utilizou soluções para o desenvolvimento de cárie artificial. A fase determinante da taxa do processo de desmineralização *in situ* foi o controle-inibidor do processo de dissolução nas superfícies dos cristais do esmalte. O conteúdo do inibidor, fluoreto, proteínas, etc., originado do fluido da placa bacteriana, saliva e esmalte deve ser alto. Além disso, o estudo indicou que na desmineralização *in situ* a perda mineral interprismática é muito importante.

Ten Cate (1992) afirma que as conclusões derivadas dos estudos *in situ* são influenciadas pelas escolhas feitas com respeito aos parâmetros dos sistemas de modelo intra-bucal, como seleção dos voluntários e desenho do dispositivo utilizado. Os objetivos do estudo intra-bucal podem variar desde a determinação de parâmetros fisiológicos bucais até o estudo dos efeitos dos tratamentos preventivos de cárie, o que influencia a escolha das condições experimentais.

Conclui-se que poucas informações são disponíveis sobre os efeitos de parâmetros individuais na execução dos modelos. Entretanto, para uma avaliação da prevenção de cárie eficiente, um modelo intra-bucal deve ser validado com testes clínicos. Somando-se a isto, as condições devem ser escolhidas para limitar o grau de artificialidade dos modelos.

Segundo Featherstone & Zero (1992), os modelos *in situ* para avaliar a capacidade dos produtos para cuidados dentais ou os componentes dos alimentos para aumentar a remineralização e/ou inibir a desmineralização do esmalte dental ou das raízes devem ser cuidadosamente planejados, para minimizar os efeitos de muitas variáveis envolvidas. Os critérios de seleção de voluntários para os estudos *in situ* incluíram: boa saúde geral, boa saúde dental, próteses parciais removíveis inferiores com a presença de pelo menos oito dentes naturais, sem lesões de cárie ativa, história de fluoretos conhecida, função salivar normal e sem medicações que afetam a função salivar. O modelo consistiu no posicionamento de lâminas de esmalte sadio ou com lesões de cárie pré-formadas, desmineralizadas *in vitro*, de cada lado da cavidade bucal, por um período de teste de duas ou quatro semanas. As mudanças na desmineralização foi controlada pela imersão extra-oral dos aparelhos em solução de sacarose a 10%, três vezes ao dia, durante 10 minutos. O nível de viscosidade da saliva, sem estímulo, acidogenicidade da placa bacteriana e fluoreto salivar foram monitorados durante o período de teste. Ao final do período de teste, as lâminas foram seccionadas e avaliadas para as mudanças minerais, pela medição de microdureza ou microradiografia. Nesse modelo, a

desmineralização ocorreu em esmalte sadio e em lesões pré-formadas, na ausência de fluoretos ou outros agentes protetores. Concluindo, os modelos *in situ* que utilizam a cavidade bucal simulam mais a realidade quando comparados aos modelos *in vitro*, mas existem variações maiores e de difícil controle.

Koulourides & Chien (1992) utilizaram o teste intra-bucal de cariogenicidade (ITC), modelo experimental *in situ*, introduzido em 1964, para o estudo da cárie em amostras de esmalte na cavidade bucal, para avaliar o efeito do fluoreto na cariogenicidade. Nesse modelo, lâminas de esmalte humano ou bovino são montadas com uma gaze, cobrindo as laterais com acrílico de uso protético. A extensão da desmineralização ou remineralização das lesões no esmalte é avaliada pelas medidas de microdureza da superfície e microrradiografias do esmalte seccionado. No trabalho, comparou-se a cariogenicidade da solução de sacarose a 10% contendo 1, 3, 10, e 30ppm de flúor com uma solução controle, de sacarose a 10% (sem fluoreto). Os tratamentos foram aplicados para o ITC, com imersões extra-orais de 10 minutos. Os resultados indicaram um potente efeito do fluoreto na redução da desmineralização do esmalte sadio e aumento na remineralização do esmalte pré-amolecido no ITC. Os autores concluíram que esse modelo *in situ* é interessante para um estudo experimental da cárie que segue o desenvolvimento e/ou a regressão das lesões na subsuperfície do esmalte, incorporação de fluoretos, aumento da resistência ao ácido, cariogenicidade dos substratos e outros

parâmetros da cárie que podem ser avaliados sobre condições padronizadas do substrato dental e proteção microbiana.

Proskin (1992) fez uma abordagem sobre a análise estatística em estudos *in situ*. Todo modelo é um processo que simula algum fenômeno real de interesse. Assim, estudando esse modelo, o pesquisador obtém informações sobre o fenômeno real. Nos estudos intra-bucais, os modelos são usados para se obter uma informação sobre o processo de cárie no ambiente clínico. O principal interesse estatístico são duas propriedades que relacionam estes modelos para o desenvolvimento da cárie dental: validade e confiabilidade. A validade pode ser definida como o grau de sucesso no qual o modelo realmente produz informações sobre o fenômeno ou processo em estudo. A confiabilidade é relacionada à maneira pela qual o pesquisador obtém as medidas no experimento. Atenção especial tem sido dada para a emissão de pareceres e interpretações dos dados desse tipo de estudo, com ênfase particular na consideração da função de cada estudo como um componente no processo de aprovação de produtos pela Associação Americana de Odontologia (ADA).

A proposta do estudo de Benelli *et al.* (1993) foi comparar a quantidade de fluoreto formado na placa bacteriana do cimento de ionômero de vidro ou em compósitos, avaliando os efeitos do fluoreto liberado no crescimento da microbiota cariogênica, a absorção de fluoretos e a formação de cárie secundária sobre condições *in situ* de alto desafio cariogênico. Dez voluntários adultos participaram

do estudo realizado em duas fases, durante 28 dias cada. Oitenta blocos de esmalte foram restaurados, ao acaso, com cimento de ionômero de vidro (Chelon-Fil - Espe) ou compósito (Silux - 3M). Para cada fase do estudo, um dispositivo de resina acrílica, contendo quatro blocos de esmalte restaurados com o mesmo material, foi confeccionado para cada voluntário. Durante o período do experimento, todos os voluntários usaram dentífrico sem fluoreto e foram instruídos a não realizarem a escovação dos blocos em esmalte restaurados. Os dispositivos foram imersos em solução de sacarose a 20% oito vezes ao dia. Os níveis de fluoreto, *S. mutans* e lactobacilos presentes na placa bacteriana foram quantificados através do peso úmido. O perfil da absorção de fluoretos e microdureza foram determinados no esmalte ao redor das restaurações. A análise estatística indicou aumento significativo no nível de fluoretos e um baixo nível de *S. mutans* na placa bacteriana formada ao redor da restauração do cimento ionomérico. Também verificou-se que, no esmalte ao redor da restauração do cimento de ionômero de vidro, a absorção de fluoretos foi significativamente maior e a perda mineral significativamente mais baixa. Os autores concluíram que o cimento de ionômero de vidro apresenta efeito anticariogênico e pode ser importante na prevenção de cárie secundária, mesmo sob condições de alto desafio cariogênico.

Quirynen & Bollen (1995), em uma revisão de literatura, explicam que, na cavidade bucal, a adesão às superfícies é a única forma de sobrevivência, para a maioria das bactérias. A adesão bacteriana ocorre em quatro fases: transporte

da bactéria para a superfície, adesão inicial em estágios reversíveis e irreversíveis, retenção por interações específicas e, finalmente, a colonização, de maneira a formar um biofilme. As superfícies duras disponíveis na cavidade bucal, como dentes, materiais de preenchimento, implantes dentais ou próteses, têm características superficiais diferentes. Numa situação saudável, existe um equilíbrio dinâmico entre as forças de retenção e as de remoção. Entretanto, um aumento no acúmulo de bactérias, freqüentemente, resulta numa situação de doença. Dois mecanismos favorecem a retenção da placa bacteriana: adesão e estagnação. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam a importância da rugosidade superficial e da energia livre da superfície no processo de adesão, resultando na formação de placa supragengival. Superfícies rugosas promovem a formação e a maturação da placa bacteriana, enquanto que superfícies com alta energia livre coletam mais placa, ligam a placa bacteriana mais fortemente e selecionam bactérias específicas. Apesar das duas variáveis interagirem, a influência da rugosidade superficial sobrepõe à da energia livre da superfície. Os autores concluíram que a influência da rugosidade superficial e da energia livre da superfície justifica a necessidade de se obter superfícies lisas, com baixa energia superficial, para minimizar a formação de placa bacteriana, reduzindo, assim, a ocorrência de cárie e de periodontite.

Zee *et al.* (1997) investigaram a morfologia da placa bacteriana supragengival com formação rápida ou lenta, avaliando seu desenvolvimento através de microscopia eletrônica de varredura. Quarenta e nove voluntários

saudáveis foram utilizados para induzir a formação de placa bacteriana após três dias sem higiene bucal, quando foi calculado para cada voluntário o índice de formação de placa bacteriana. Foram selecionados cinco voluntários com índice de placa bacteriana mais alto e os seis com índice mais baixo, que constituíram os grupos rápido e lento na formação da placa bacteriana, respectivamente. Após uma série de profilaxia e instruções de higiene bucal para garantir a saúde gengival, seis blocos de esmalte medindo 2x2x1mm foram aderidos à superfície vestibular do canino esquerdo, pré-molar e primeiro molar para cada participante selecionado. Um período de 14 dias sem higiene bucal foi considerado. O bloco de esmalte foi removido de cada indivíduo após 3h, 6h, 1 dia, 3 dias, 7 dias e 14 dias, fixado e processado por microscopia eletrônica de varredura. Quantitativamente, mais bactérias foram observadas nos blocos de esmalte retirados entre 3h e 1 dia, para o grupo formador rápido de placa bacteriana. Os espécimes de 1 dia no grupo rápido mostraram uma estrutura de placa supragengival mais complexa do que do grupo lento. Para os blocos removidos entre 3 e 14 dias, durante o período de maturação de placa supragengival, não houve diferenças entre os 2 grupos, exceto que a matriz intermicrobiana foi mais proeminente no grupo rápido. Em geral, o desenvolvimento da placa supragengival seguiu padrões conhecidos. Essas observações indicaram que as características morfológicas das placas supragengivais nos grupos de formação lenta e rápida diferem, especialmente, nas fases de desenvolvimento iniciais.



O objetivo do estudo desenvolvido *in vitro* por Zalkind *et al.* (1998) foi de examinar o acúmulo de *S. mutans* em compósitos fotopolimerizáveis e em amálgama. Amostras de compósitos foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, polimerizadas contra a tira matriz e divididas em seis grupos, de acordo com o acabamento e polimento a que foram submetidas. Essas foram comparadas com dois grupos de amostras em amálgama e um grupo de amostras em dentina de dentes extraídos. Três amostras foram colocadas em suspensão bacteriana cultivada em meio líquido, que foi substituída diariamente, durante quatro dias. No final do experimento, as amostras foram removidas e 1ml de NaOH 0,5M foi adicionado. A concentração de bactérias foi determinada, medindo a turbidez através de espectrofotometria. As amostras em amálgama acumularam mais bactéria com diferença estatística significativa, quando comparadas com as amostras de compósitos e com a amostra em dentina. Não houve diferença estatística significativa no acúmulo de placa bacteriana nos diferentes compósitos após os procedimentos de acabamento e polimento, comparado com o acúmulo de placa bacteriana nos compósitos polimerizados junto à Tira Matriz.

Em situações de grande destruição coronária, restaurações do tipo “onlay/inlay” cerâmicas são indicadas. Ajustes oclusais são realizados após a cimentação da peça, removendo-se o glaze final, levando ao maior desgaste nos dentes naturais antagonistas e ao acúmulo de placa bacteriana. Para minimizar esses problemas, procedimentos de acabamento e polimento devem ser

realizados. Mendonça (1999) avaliou a rugosidade superficial *in vitro* e o acúmulo de placa bacteriana *in situ* de superfícies cerâmicas submetidas a sete procedimentos de acabamento e polimento. A rugosidade superficial medida em rugosímetro (Ra) mostrou que os procedimentos realizados não foram capazes de promover a lisura superficial do glaze final e os melhores resultados foram apresentados pelos grupos sistema Kota, pasta diamantada e sistema Viking. Para o estudo *in situ*, foram confeccionadas placas palatinas, onde sete amostras correspondendo aos grupos experimentais foram posicionadas. Nove voluntários utilizaram os dispositivos intra-bucais durante três dias por semana, num total de sete semanas. Os aparelhos foram imersos em sacarose 20%, oito vezes ao dia, para estimular a formação de placa bacteriana. Após a utilização dos aparelhos intra-bucais, a placa bacteriana foi extraída e quantificada em espectrofotômetro. Os resultados obtidos não demonstraram diferença estatística significativa em relação ao acúmulo de placa bacteriana, entre os diferentes materiais de acabamento e polimento.

Tanagawa *et al.* (1999) avaliaram o efeito inibitório de resinas compostas com atividade antibacteriana contra *S. mutans*. Três tipos de materiais antibacterianos (Novaron, Amenitop e AIS) foram incorporados às resinas compostas fotopolimerizáveis, de base TEGDMA-UDMA e a atividade antibacteriana desses compósitos foi avaliada. Os compósitos com a incorporação de 5% em peso ou mais de Novaron e 7% em peso ou mais de Amenitop inibiram o crescimento de *S. mutans*, enquanto que compósitos com até 10% de AIS não

inibiram. Não houve alteração nas propriedades mecânicas do compósito com incorporação de Novaron após um dia e 6 meses de armazenamento em água, quando comparado com o controle. Os resultados indicaram que a resina composta fotoativada incorporando materiais antibacterianos em base de prata, como Novaron, pode ser clinicamente útil devido ao seu efeito inibitório contra *S. mutans* e propriedades mecânicas favoráveis.

Magalhães (2000) avaliou a rugosidade superficial de duas resinas modificadas por poliácidos, Compoglass F e Dyract AP, e de um ionômero de vidro modificado por resina, Fuji II LC Improved, submetidos a dois tratamentos superficiais de acabamento e polimento, em função do tempo, através de um modelo experimental *in situ*. Vinte voluntários utilizaram, durante 28 dias consecutivos, dispositivos acrílicos intra-bucais, contendo corpos de prova confeccionados com os três materiais. Os espécimes foram submetidos ao acabamento e polimento com sistema de discos de lixa, à base de óxido de alumínio, Sof-Lex, ou com pontas de resina impregnadas com óxido de alumínio, Enhance. O grupo controle não recebeu acabamento e polimento, sendo apenas polimerizado junto à superfície de matriz de poliéster. A cada voluntário foi fornecido o mesmo tipo de escova dental e dentifrício, além de instruções específicas sobre a utilização e higienização do dispositivo intra-bucal. A rugosidade superficial dos materiais foi quantificada através da medida da rugosidade média (Ra) de nove segmentos lineares predeterminados de cada corpo de prova, imediatamente após os procedimentos de acabamento e

polimento e após 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de permanência no meio bucal. Os resultados foram significativos para a interação Material x Tratamento, exceto aos 28 dias. Inicialmente, para os materiais Compoglass F e Dyract AP, o tratamento com Sof-Lex parece ter promovido maior lisura superficial que Enhance. Os tratamentos com Sof-Lex e Enhance não diferiram entre si e aumentaram a rugosidade superficial de Fuji II LC em relação ao controle. Após 28 dias, os materiais híbridos de ionômero de vidro e resina composta submetidos ao acabamento e polimento apresentaram rugosidade superficial semelhante ao controle, a despeito da técnica utilizada.

De acordo com Nelson & Cox (2000), uma ampla variedade de biomoléculas absorvem luz em comprimentos de ondas característicos. Os aminoácidos aromáticos constituintes das proteínas, como o triptofano e a tirosina, absorvem luz no comprimento de onda de 280nm. A medida da absorção de luz por um espectrofotômetro é usada para detectar e identificar moléculas e medir sua concentração nas soluções. A fração de luz incidente absorvida por uma solução num dado comprimento de onda é conferida pela espessura da camada absorvente e a concentração da espécie absorvente. O logaritmo da relação entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz transmitida é chamada absorbância.

Leite Jr. (2001) avaliou o efeito de sistemas de acabamento e polimento para materiais restauradores híbridos de ionômero de vidro e resina composta, no

acúmulo de placa bacteriana *in situ* e na rugosidade superficial *in vitro*. Assim, foram testados quatro sistemas para acabamento e polimento, tira matriz, discos Sof-Lex, pontas Viking e Enhance, em duas resinas compostas modificadas por poliácidos, Compoglass F - Vivadent e Dyract AP - Dentsply. Para a avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, foram selecionados dez voluntários, para os quais foram confeccionados dispositivos palatinos em acrílico, onde foram fixados quatro corpos de prova correspondentes a cada grupo experimental. Durante oito semanas, os voluntários utilizaram o dispositivo com os corpos de prova por três dias na semana, gotejando solução de sacarose a 20%, oito vezes ao dia. No quarto dia, a placa bacteriana formada sobre cada corpo de prova foi extraída em NaOH 1,0M e quantificada em espectrofotômetro. Entre os materiais estudados, o Dyract AP obteve maior acúmulo de placa bacteriana, com diferença estatística significativa do Compoglass F, pela Análise de Variância e teste t de Student. Entre os sistemas de acabamento e polimento, não houve diferença estatística significativa quanto ao acúmulo de placa bacteriana. Para avaliação da rugosidade, após o acabamento superficial, os corpos de prova foram submetidos à leitura pelo rugosímetro (Ra), considerando-se a média aritmética de três leituras. Nessa avaliação *in vitro*, as menores médias de rugosidade foram apresentadas pelos tratamentos com Tira Matriz e discos Sof-Lex, com diferenças estatísticas das pontas Viking e Enhance, pela Análise de Variância e teste de Variação Múltipla de Duncan. As resinas compostas modificadas por poliácidos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si em relação a rugosidade superficial.

Boeckh *et al.* (2002) investigaram os efeitos antibacterianos de vários materiais restauradores contra *S. mutans*. Suspensões de bactérias foram colocadas em cavidades cônicas confeccionadas com os materiais e incubadas por 0h, 4h, 8h, 24h, 48h e uma semana, quando foram removidas das restaurações e os números de bactérias viáveis determinados. Após o período de incubação de 8h ou mais, todos os materiais restauradores menos o material experimental FH-RC mostraram uma significativa inibição do crescimento quando comparadas com o controle. A maior atividade antibacteriana foi observada no material à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE). O efeito inibitório foi similar para o cimento de ionômero de vidro e para o modificado por resina. No segundo ensaio, a inibição do crescimento foi avaliada em cultura líquida, pela incubação de suspensões de *S. mutans* nos materiais. O crescimento bacteriano foi determinado após 6h pelo medida da absorção a 600nm. O mais marcante efeito inibitório foi observado com ZOE.

Karanika-Kouma *et al.* (2003) examinaram a atividade antibacteriana dos sistemas adesivos Syntac, EBS e Scotchbond 1, das resinas compostas modificadas por poliácidos HyTac e Compoglass e das resinas compostas Tetric, Z100 e Scalp-it. Foram avaliadas *in vitro* as bactérias cariogênicas *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus salivarius* e *Actinomyces viscosus*. Todos os adesivos e as resinas compostas modificadas por poliácidos exibiram vários graus de atividade antibacteriana nos testes. Ao contrário, as resinas compostas não afetaram o desenvolvimento bacteriano. Os dados sugerem que o uso desses adesivos e das

resinas compostas modificadas por poliácidos podem reduzir as conseqüências da microinfiltração devido a suas propriedades antibacterianas.

Konishi *et al.* (2003) analisaram quantitativamente a placa bacteriana inicial formada em resinas compostas e esmalte humano *in vivo*, usando microscopia de varredura a laser. Amostras de resinas compostas e esmalte foram mantidas na superfície bucal dos primeiros molares superiores de três voluntários por 4, 8 e 24h, para a formação de placa bacteriana. Depois, os espécimes foram imersos em corante e observados em microscópio. As relações entre área ocupada por microrganismos e área total do campo óptico foram calculadas usando um sistema de análise de imagens fotográficas. A espessura da placa bacteriana também foi medida. A análise quantitativa revelou que as resinas compostas tiveram uma adesão bacteriana significativamente maior do que o esmalte humano, durante o período de teste. Uma diferença foi observada na morfologia da placa bacteriana entre os dois grupos, o que sugere uma diferença na composição de bactérias na placa bacteriana entre os dois espécimes.

O objetivo da investigação de Wan *et al.* (2003) foi determinar a colonização de *S. mutans* após a erupção dos dentes de um grupo de 111 crianças. Os resultados mostraram que a colonização de *S. mutans* aumentou com o aumento da idade e que, aos 24 meses, 84% já continham a bactéria. Fatores associados com a colonização de *S. mutans* foram a alimentação com fluidos ao se deitar, a freqüente exposição ao açúcar, o compartilhamento de

alimentos com os adultos e o nível de *S. mutans* materno. Em contraste, a não colonização de *S. mutans* foi associado à escovação e ao uso múltiplo de antibióticos. Os autores salientaram, também, que, uma vez que a cárie dental é uma doença infecciosa, um método efetivo de prevenção é a remoção das bactérias cariogênicas da cavidade bucal.

Arweiler *et al.* (2004) avaliaram a vitalidade da estrutura tri-dimensional do desenvolvimento de biofilmes dentais simultaneamente em localizações diferentes na cavidade bucal, por um período de 48h. Oito voluntários saudáveis utilizaram aparelhos acrílicos especiais. Em cada lado superior e inferior, três laminas de vidro foram inseridas, permitindo o crescimento do biofilme, simulando placa bacteriana proximal. Após 48h, as amostras foram removidas e o biofilme foi corado usando dois corantes fluorescentes, mostrando a cor verde para bactérias vivas e vermelha para bactérias mortas. Seções de 1µm de todo o biofilme foram feitas, em um microscópio óptico de varredura a laser. Os valores de vitalidade (proporção de bactérias vitais) do total do biofilme e a distribuição da vitalidade nas diferentes seções da placa bacteriana foram feitas com um programa para análise de imagem. A placa bacteriana de diferentes locais revelou valores médios de vitalidade entre 64,4 e 75,7% na maxila e entre 64,3 e 76,8% na mandíbula, mas sem diferença estatística entre elas. Entretanto, uma grande variação nos valores de vitalidade para as diferentes camadas e entre os oito voluntários foi encontrada. A análise dos dados de cada voluntário revelaram um padrão muito similar de vitalidade em todas as 12 localizações.



Eick *et al.* (2004) desenvolveram um sistema fluido contínuo para avaliar a adesão de *S. mutans* a materiais restauradores (Arsiton, Tetric, Dyract, Compoglass, Vitrmer, Aqua Ionofil, Ketac Fil, amálgama, Galloy e cerâmica como controle). A bactéria foi adicionada a espécimes cobertas com saliva e o meio de nutriente líquido foi permanentemente suprido por um período de 48h. O peso da placa bacteriana, número e viabilidade das bactérias aderidas aos materiais foram determinados. O peso da placa artificial formada em todos os materiais restauradores testados foi maior do que o da cerâmica, com valores maiores medidos em ionômeros de vidro. A quantidade de placa bacteriana correlacionou com a rugosidade superficial, enquanto que não houve correlação entre a rugosidade superficial e o número de unidades formadoras de colônias de *S. mutans*, já que este depende também da viabilidade da bactéria.

## **2.2. Rugosidade superficial e estudos in vitro**

A observação de que restaurações sem acabamento e polimento situadas sob a margem gengival causam irritações mais severas do que quando bem polidas foi confirmada em um estudo histológico realizado em cães e macacos por Waerhaug (1956). O trabalho demonstrou que o epitélio sob condições favoráveis pode unir-se à superfície de coroas em acrílico, da mesma maneira que uma bainha do epitélio normal. Um cimento de fosfato de zinco foi utilizado como irritante sobre a gengiva contra uma superfície acrílica sem

polimento. Sinais de irritação foram encontrados principalmente próximos à junção entre o dente e a coroa artificial, ou em lugares onde grandes excessos de cimento foram deixados em contato com os tecidos moles.

Uma vez que tem sido demonstrado que a rugosidade superficial das resinas compostas é altamente dependente do tamanho e do tipo de partículas de carga empregados, Van Noort & Davis (1984) investigaram o relacionamento entre o acabamento superficial e o tamanho das partículas das resinas compostas. O estudo foi realizado para comparar qualitativamente o acabamento superficial de uma variedade de resinas compostas, utilizando-se os discos Sof-Lex e pastas de óxido de alumínio para polimento, através de microscopia eletrônica de varredura. De acordo com os autores, as resinas compostas disponíveis comercialmente podem ser divididas em três grupos principais, de acordo com o tamanho das partículas de carga: grande (média de 10 $\mu$ m), pequena (média de 1-2 $\mu$ m) ou micropartícula (média de 0,02 $\mu$ m). Essencialmente, quanto maior a partícula de carga, maior será a rugosidade da superfície, de forma que, para se obter visualmente uma lisura no acabamento superficial, as partículas não devem exceder 6 $\mu$ m. Para as resinas compostas de partículas grandes, o melhor método de polimento melhor foram os discos Sof-Lex, já que o polimento com pastas não proporcionou uma melhor lisura superficial. Para as resinas de partículas pequenas, as pastas de óxido alumínio foram melhores que os discos Sof-Lex, e para as resinas de micropartículas, tanto os discos como as pastas de alumínio comportaram-se igualmente bem.

Um dos requisitos para que uma restauração tenha sucesso é sua capacidade de se manter com uma superfície exposta lisa. Assim, Wilson *et al.* (1990) desenvolveram um estudo *in vitro* para determinar o melhor método para acabamento e polimento da superfície de sete compósitos. As superfícies das amostras foram avaliadas qualitativa e quantitativamente por inspeção visual e pela medida da rugosidade (Ra), com um rugosímetro. Os discos Sof-Lex produziram a superfície mais lisa e uma pequena vantagem aparentemente foi obtida pelo prévio alisamento da superfície com pedras ou pontas. Uma pasta de polimento, quando usada como agente intermediário de acabamento, produziu uma superfície mais rugosa do que a obtida pelos discos.

Stoddard & Johnson (1991) avaliaram a efetividade de vários instrumentos para polimento, em oito resinas compostas diferentes. Após a remoção do excesso do material restaurador e do acabamento das restaurações com compósitos, a seleção de um sistema que possibilite uma superfície lisa e polida é difícil devido à magnitude do aumento necessário para comparar a rugosidade superficial. A superfície de quatro compósitos para dentes anteriores e posteriores foram comparados usando a tira matriz, uma resina sem carga como glaze, polimento com três borrachas e três diferentes discos de diferentes fabricantes, através da avaliação da rugosidade (Ra) por meio de rugosímetro. Devido às diferenças no tamanho, forma, número de partículas de carga e ao tipo de resina, nenhum sistema de acabamento e polimento foi capaz de proporcionar uma superfície lisa para todas as resinas compostas.

O advento das resinas fotoativadas e o uso de partículas de carga pequenas permitiu que as resinas compostas tenham um alto grau de polimento. Muitos pesquisadores concordam que a superfície mais lisa conseguida com os compósitos ocorre quando eles são fotopolimerizados contra uma tira matriz de celulose, mas que em alguns casos, o procedimento de acabamento e polimento subsequente na superfície da restauração necessita ser realizado. O estudo de Chung (1994) foi desenvolvido para investigar os efeitos dos procedimentos de acabamento e polimento na rugosidade e na cor das resinas compostas. Quatro compósitos e três diferentes sistemas de polimento foram avaliados. As resinas compostas de micropartículas demonstraram uma rugosidade menor que os compósitos híbridos testados, pela Análise da Variância e teste de Scheffé. A Tira Matriz criou a superfície mais lisa do que os outros sistemas de polimento testados. Foram verificadas diferenças de cor em função da rugosidade superficial. Assim, os matizes das resinas compostas testadas ficaram mais claros, mais brancos e menos brilhantes depois dos procedimentos de polimento.

A rugosidade das superfícies duras na cavidade bucal pode influenciar a retenção de placa bacteriana. Bollen *et al.* (1997) publicaram em uma revisão de literatura sobre a rugosidade superficial inicial de vários materiais, bem como as mudanças na rugosidade superficial como consequência de diferentes modalidades de tratamento. Pesquisas *in vivo* sugeriram um limiar de rugosidade superficial para a retenção de placa bacteriana ( $Ra=0,2\mu m$ ) abaixo do qual nenhuma redução no acúmulo de bactérias pode ser esperado. Um aumento na

rugosidade superficial acima deste limiar, entretanto, resultou em um simultâneo aumento no acúmulo de placa bacteriana, levando a um aumento no risco de cárie e inflamação periodontal. A rugosidade inicial de diferentes superfícies, entre as quais dente, “abutments”, ouro, amálgama, resina acrílica, compósitos, ionômero de vidro ou resina composta modificada por poliácidos e cerâmicas, e o efeito de diferentes modalidades de tratamentos, polimento, raspagem, escovação, condensação, glazeamento ou acabamento na rugosidade superficial inicial foram analisados. Foi encontrado um limite da rugosidade superficial muito amplo nas diferentes superfícies intra-bucais duras e o impacto do tratamento dental na rugosidade superficial dependeu do material em questão. Algumas técnicas clínicas resultaram em uma superfície muito lisa, como a compressão dos compósitos contra uma Tira Matriz. Entretanto, outras resultaram em superfícies rugosas, como a aplicação de instrumentos rígidos sobre o ouro. Essas observações sugerem que cada material necessita de sua própria modalidade de tratamento para obter e manter a superfície o mais lisa possível.

Paulillo *et al.* (1997) avaliaram a rugosidade superficial e a pigmentação do cimento de ionômero de vidro, quando sujeito a diferentes procedimentos de acabamento. Sessenta e quatro discos cilíndricos do ionômero de vidro Chem-Fil II foram submetidos ao teste de pigmentação com azul de metileno, avaliado em espectrofotometria, e, ao teste de rugosidade, aferido pelo perfilômetro. Quatro grupos foram utilizados: Tiras Matriz (controle), discos Sof-Lex, pontas Enhance e brocas diamantadas. Os testes de pigmentação e rugosidade demonstraram que a

melhor superfície foi obtida quando o material geleificou em contato com as Tiras Matrizes ou quando tratados com os discos Sof-Lex. A maior rugosidade foi promovida pelas pontas diamantadas, que diferiram do controle, mas não das pontas Enhance. A maior pigmentação foi observada para as superfícies tratadas pelas pontas diamantadas. Quando os dois testes foram comparados, foi verificada uma correlação estatística linear entre eles.

Hoelscher *et al.* (1998) investigaram três sistemas diferentes para acabamento (Sof-Lex, Enhance e brocas para acabamento) em dois compósitos (Silux e Prisma TPH), um ionômero de vidro tradicional (Ketac-Fil) e um ionômero de vidro modificado por resina (Fuji II LC). Sessenta amostras foram condensadas em tubos de acrílico seccionados, cobertas com Tira Matriz junto a uma placa de vidro em cada superfície e polimerizadas, de acordo com as instruções dos fabricantes. As amostras foram testadas com um rugosímetro antes do procedimento de acabamento, para se obter um registro padrão da rugosidade superficial (Ra). Em seguida, as amostras foram tratadas com discos de polimento, brocas de acabamento e, adicionalmente polidas utilizando-se pasta de polimento (Prisma Gloss) e novamente testados. Os testes iniciais após a aleatorização para os grupos não mostraram diferenças estatísticas significativas na rugosidade superficial. Após o tratamento, não houve diferenças estatísticas significativa entre os materiais, mas verificou-se diferença significativa entre os métodos de acabamento, sem interação significativa entre o tipo de material e o método de acabamento. Os discos de óxido de alumínio e os sistemas de discos

impregnados proporcionaram o melhor acabamento para os compósitos de micropartículas e para ambos materiais de ionômero de vidro. Não houve diferenças significativas entre os métodos de acabamento utilizados nos compósitos híbridos. Concluiu-se que os discos impregnados com abrasivos ou discos com óxido de alumínio foram os melhores materiais para acabamento em restaurações estéticas. As brocas para acabamento produziram uma superfície mais rugosa que os outros métodos.

O estudo realizado por Joniot *et al.* (2000) determinou o sistema mais favorável de acabamento para cada compósito: Charisma (Kulzer), Prisma TPH (De Trey) e Z100 (3M). Foi utilizado um perfilômetro óptico tridimensional para obter medidas qualitativas e quantitativas da superfície dos três compósitos híbridos. Brocas carbide de tungstênio formaram irregularidades mais difíceis de serem eliminadas do que as causadas pelas pontas diamantadas. Os discos Sof-Lex e o Sistema Enhance apresentaram bons resultados para os três materiais. Charisma apresentou uma boa superfície independente do método de acabamento utilizado. Os compósitos Z100 e do Prisma TPH necessitaram de um protocolo especial de acabamento, como especificado pelos fabricantes.

Auschill *et al.* (2002) destacaram que o acúmulo do biofilme nas superfícies dos dentes é um importante fator no desenvolvimento da cárie dental e outras doenças bucais e verificaram a influência de diferentes materiais restauradores dentais, como ouro, amálgama, cerâmica, compósitos, compômeros

e cimento de ionômero de vidro, sobre a formação do biofilme, já que estes materiais liberam diversas substâncias que exercem ação antibacteriana contra microrganismos bucais *in vitro* e *in vivo*. O acúmulo de biofilme ocorre em todas as superfícies da boca, sejam elas naturais, artificiais ou materiais dentários. Os autores salientaram que a rugosidade superficial dos materiais afetou a adesão das bactérias do biofilme, porque maior ou menor superfície estava disponível para ser aderida e maior ou menor proteção foi proporcionada para a colonização bacteriana. Consequentemente, os materiais dentais devem ser inseridos e polidos *in situ*, para minimizar a rugosidade superficial dos mesmos.

Reis *et al.* (2002) avaliaram a rugosidade superficial de duas resinas compostas após o acabamento e polimento com seis diferentes sistemas. Amostras com os compósitos Solitaire e Alert foram preparadas e polidas com as pastas Poli I e Poli II à base de óxido de alumínio, uma pasta diamantada Ultralap, pontas de acabamento Enhance, pontas de borracha Politip, brocas diamantadas finas e extrafinas e brocas carbide de 30 lâminas de acordo com as instruções dos fabricantes. As superfícies polidas foram avaliadas com um rugosímetro e microscopia eletrônica de varredura. O compósito Solitaire apresentou a superfície mais lisa quando polida com as pastas de óxido de alumínio Poli I e II, pasta diamantada Ultralap, pontas de borracha Politip e brocas carbide de 30 lâminas. A superfície mais lisa para o Alert foi obtidas com brocas carbide de 30 lâminas.



Sardin *et al.* (2004) avaliaram *in vitro* a aderência de estreptococos em oito materiais normalmente utilizados em próteses e implantes e as amostras de esmalte, após cobertura com saliva e, investigaram a influência da energia livre da superfície do substrato e seus componentes polares e não polares, bem como as características da superfície bacteriana na aderência da bactéria. As menores colonizações das amostras de esmalte e os menores valores de aderência bacteriana nos diferentes substratos foram observados com estirpes hidrófilas. Tanto a natureza do substrato quanto a natureza da estirpe bacteriana pode ter efeito na extensão da adesão bacteriana. Quando as relações entre o número de bactérias aderidas e as propriedades da superfície da bactéria e do substrato foram analisadas, a aderência bacteriana correlacionou com os componentes da energia livre da superfície do substrato ( $r=0,8$ ) e com a adesão a solventes ( $r=0,8$ ). Esses resultados foram consistentes com a teoria termodinâmica e delineiam a importância das características ácido-base da superfície da célula no estudo da aderência bacteriana em materiais odontológicos.

### ***2.3. Identificação de bactérias bucais pela técnica de reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”) - PCR***

De acordo com Atlas & Bej (1994), a reação em cadeia da polimerase - (“polymerase chain reaction” - PCR) baseia-se na replicação de uma sequência de DNA definida, de forma que sua quantidade é aumentada exponencialmente e

pode ser visualizada em géis de eletroforese. A técnica consiste em ciclos repetitivos de desnaturação do DNA, em elevadas temperaturas, para converter a fita dupla do ácido nucleico em fitas simples, anelamento de *primers* de oligonucleotídeos ao DNA alvo e extensão da fita de DNA pela adição de nucleotídeos, a partir dos *primers* pela ação de uma DNA polimerase termoestável.

Saarela *et al.* (1996) investigaram o poder discriminativo da reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários (AP-PCR) na diferenciação entre as espécies de *S. mutans* e *S. sobrinus*, serotipos e clones. Isolados de mutans streptococci (127) obtidos de 65 indivíduos (1-10 isolados por indivíduo) foram tipados separadamente com dois *primers* aleatórios, OPA-05 e OPA-13. Células lisadas de bactérias foram usadas como molde em reações de PCR, tornando a técnica de AP-PCR fácil e rápida de ser realizada. Oitenta e um isolados de 19 indivíduos foram também ribotipados para comparar a capacidade discriminativa para as técnicas de ribotipagem e AP-PCR. AP-PCR realizado com os dois *primers* diferenciou os isolados de *S. mutans* e *S. sobrinus*, mas nenhum *primer* detectou produtos de amplificação serotipo-específicos. OPA-05 distinguiu dois padrões principais de AP-PCR entre isolados de *S. mutans* e um padrão principal entre isolados de *S. sobrinus*, enquanto que OPA-13 encontrou um padrão principal entre isolados de *S. mutans* e dois padrões principais entre isolados de *S. sobrinus*. Ribotipagem e AP-PCR revelaram 40 e 33 tipos diferentes entre 81 isolados selecionados, respectivamente. Ambas as técnicas detectaram

heterogeneidade intra-indivíduo em 16 dos 19 participantes. Os resultados indicaram que a AP-PCR tem boa capacidade na diferenciação entre clones de mutans streptococci e que a técnica é adequada para estudos epidemiológicos nesse grupo de bactérias.

Para investigar o grau de associação entre critérios táteis e ópticos usados para avaliar a condição de cárie na junção esmalte dentina durante o preparo cavitário, Allaker *et al.* (1998) realizaram avaliações com corante detector de cárie e detecção de *S. mutans* por meio de cultura e reação em cadeia da polimerase. Vinte e nove dentes extraídos e 15 dentes preparados sobre isolamento absoluto *in vivo* foram clinicamente preparados na junção esmalte dentina, após a remoção do tecido cariado evidente. Foi, então, realizada a desmineralização usando um corante detector de cárie (1% vermelho ácido em propileno glicol; CAVEX). Uma broca com cabeça rosa foi usada para remover tecido no limite esmalte dentina para análise de cultura e PCR. A cultura foi realizada em um meio seletivo contendo triptona, extrato de levedura, cistina, sacarose e bacitracina, e o PCR foi usado para amplificar a sequência do gene *spaP*, de tamanho de 192bp, que codifica a proteína superficial do antígeno I/II do *S. mutans*. O tecido desmineralizado na junção esmalte dentina, observado com o corante, foi encontrado em 52% dos dentes. O tecido removido teve cultura e PCR positivo para *S. mutans* em 2 e 47% do dente, respectivamente. Uma elevada associação significativa (77% dos casos;  $P > 0.001$ ) foi encontrada entre os métodos de corante e o PCR. Não houve associação entre qualquer outra

combinação dos métodos utilizados. Os autores concluíram que os métodos de cultura podem subestimar a presença de *S. mutans* e que a remoção de tecido corado é recomendada para prevenir recidivas de cárie causadas pelo *S. mutans* residual.

Igarashi *et al.* (1998) desenvolveram *primers* de genes da dextranase (dex) para a reação de PCR, visando uma rápida identificação dos estreptococos bucais. Os *primers* específicos amplificam um fragmento de DNA de 1,2-kb para as espécies de estreptococos bucais: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. downei* e *S. salivarius*, que são diferenciadas após digestão do fragmento com enzima de restrição. Na digestão com *EcoRI*, foi possível diferenciar *S. mutans* e *S. salivarius* das outras espécies. *S. mutans* foi separado do *S. salivarius* por digestão com *SacI*, *PstI* ou *HindIII*, enquanto que *S. sobrinus* foi diferenciado de *S. downei* por digestão com *AcyI*, *AflII*, *BalI* ou *FokI*. Além disso, digestões simultâneas com *HindIII* e *AflII* também possibilitaram uma rápida diferenciação entre as quatro espécies de bactérias.

Objetivando obter um método rápido e confiável para quantificação de bactérias bucais, Rupf *et al.* (1999) desenvolveram um método competitivo de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* que se unem a seqüências altamente conservadas dos genes de RNA ribossômico 16S. Testes de especificidade foram feitos com 30 diferentes espécies de bactérias, 5 archaea, 3 fungos, células astrocitomáticas humanas e células hepatoblastomáticas de rato.

Os resultados foram positivos para todas eubactérias e negativos para as demais células. O método provou ser confiável e rápido para detecção de DNA bacteriano e eubactérias cultivadas, bem como de bactérias em amostras biológicas e pode ter aplicações não apenas em estudos de periodontia e cariologia, mas, também, em outros campos da microbiologia médica.

Oho *et al.* (2000) desenvolveram um método rápido e simples para detectar *S. mutans* e *S. sobrinus* em saliva humana utilizando a técnica de PCR. O DNA cromossômico bacteriano foi extraído pela fervura das células bacteriana numa solução de lise contendo 1% Triton X-100. *Primers* específicos foram preparados para porções dos genes de glucosiltransferase (*gtfB* de *S. mutans* e *gtfI* de *S. sobrinus*). Após a reação utilizando os dois *primers*, foram identificadas as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*. O método desenvolvido foi capaz de amplificar fragmentos de DNA dessas espécies extraídos de  $10^3$  células/ml ou de saliva contendo  $10^5$  unidades formadoras de colônias/ml. Uma nova reação de PCR, utilizando o produto de PCR como molde e *primers* internos dessa região cromossômica, possibilitou aumentar a sensibilidade da técnica. Os resultados indicaram que o método de PCR desenvolvido no estudo foi útil para detectar *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e que pode ser utilizado em estudos epidemiológicos para averiguar o nível de prevalência desses organismos na população.

Marchant *et al.* (2001) avaliaram a microflora predominante que recobre a dentina infectada de 52 dentes cariados de 14 crianças com cárie inicial, utilizando meios seletivos e não seletivos para o isolamento de gêneros específicos, e meios ácidos (pH 5,2) para isolar os microrganismos acidúricos predominantes, que foi comparada com a microflora das superfícies ao redor do esmalte em crianças livres de cárie. *S. mutans* formou uma grande proporção de lesão enquanto *S. oralis*, *S. sanguis* e *S. gordonii* formou grande proporção de placa bacteriana ao redor das superfícies dos dentes. Estirpes das bactérias isoladas de dentes individuais cariados foram genotipadas utilizando a técnica de PCR. Cada espécie foi genotipicamente heterogênea e diferentes genótipos foram recuperados de dentes cariados diferentes de uma mesma criança. Os dados indicaram que a microflora das lesões de uma mesma criança é microbiologicamente diversa e indicam uma etiologia não específica da cárie inicial, de modo que as características fisiológicas da microflora infectante, e não a composição, são fatores determinantes no processo da doença.

Na tentativa de desenvolver um método rápido e fiel para a identificação das bactérias cariogênicas, Sato *et al.* (2001) avaliaram a técnica que associa a reação em cadeia da polimerase (PCR) com a análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (“restriction fragment length polymorphism” - RFLP), com *primers* universais 8UA e 1492R, que amplificam genes de RNA ribossômico 16S. Foram avaliadas espécies bucais de mutans streptococci e *Actinomyces*, incluindo *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Actinomyces*

*naeslundii* genoespécies 1, *A. naeslundii* genospecies 2 e *A. odontolyticus*. A sequência de gene de rRNA 16S dos isolados genômicos de amostras de DNA foram amplificadas por PCR. Os produtos da PCR foram purificados e caracterizados por digestão simples com as endonucleases de restrição *HaeIII* e *MnII*. *HaeIII* diferenciou claramente *S. mutans* de *S. sobrinus*, enquanto que *MnII* discriminou as espécies de *Actinomyces*.

Hirasawa & Takada (2003) desenvolveram um meio de cultura seletivo (MS-MUT) para isolamento de *S. mutans* de espécimes clínicas. A taxa de recuperação de *S. mutans* no meio MS-MUT foi de 72,4% da taxa obtida no meio mitis-salivarius (MS). O crescimento de *S. sobrinus* foi inibido nesse meio, com uma taxa de recuperação de 0,034%. Os autores salientaram a importância do uso desse meio de cultura seletivo, nos trabalhos, visando identificar *S. mutans* em comparação com a técnica de PCR. O PCR é, normalmente, aceito como o método mais sensível de detecção de bactérias, mas essa técnica detecta fragmentos de DNA não só de bactérias vivas, mas também de organismos mortos, além de ser difícil quantificar a bactéria nas amostras.

Pratten *et al.* (2003) compararam métodos de isolamento de cultura bacteriana com a amplificação direta e clonagem dos genes 16S rRNA de biofilmes bucais desenvolvidos em um modelo *in vitro*. O modelo usado foi um fermentador de filme de profundidade constante, que foi inoculado com uma mistura de saliva humana. O uso de técnicas de cultura e clonagem resulta na

identificação de 36 diferentes espécies bacterianas da saliva inoculada e dos biofilmes. Desses, cinco foram detectados somente por metodologia molecular. Usando a metodologia molecular de detecção, com diferentes *primers* dos genes rRNA 16S e diferentes números de ciclos de PCR, várias espécies foram observadas. Os autores observaram que o biofilme da placa bacteriana supragengival crescida no fermentador consiste em uma comunidade, cuja maioria de membros pode ser cultivada em meios laboratoriais.

Robinson *et al.* (2003) destacaram que a habilidade de *S. mutans* de fermentar uma variedade de carboidratos é uma das características que contribuem para a cariogenicidade e que a variação na habilidade de utilizar diferentes substratos pode afetar a competitividade das diferentes estirpes. Como alguns isolados de *S. mutans* não têm a capacidade de fermentar a melobiose e outros açúcares, os autores estudaram inserções e deleções cromossômicas nessa espécie. Utilizando a informação da sequência do projeto genoma de *S. mutans*, foram desenhados *primers* de PCR para explorar a natureza e extensão das deleções.

Rupf *et al.* (2003) compararam amostras de saliva de 16 crianças com atividade de cárie para a presença de *S. mutans* usando três diferentes técnicas de PCR e os resultados foram comparados com o cultivos das amostras em meio de cultura mitis salivarius-ágar-bacitracin. As amostras de saliva foram analisadas diretamente ou submetidas a um preparado de DNA antes do PCR para excluir a



influência de inibidores da reação. A técnica de PCR que utiliza um instrumento que fornece resultados em tempo real foi considerada mais rápida e tão sensível quanto que a técnica de PCR em ciclador de bloco, mas menos reproduzível que esta última.

Sato *et al.* (2003a) aperfeiçoaram a técnica de PCR-RFLP, visando a identificação de sete diferentes espécies incluídas no grupo mutans streptococci. Os autores amplificaram a seqüência de genes de RNA ribossômico 16S das amostras de DNA genômico através de PCR, utilizando *primers* universais e digerindo os produtos da PCR com endonucleases de restrição *HpaII* e *HaeIII*. *HpaII* produziu seis padrões RFLP para oito estirpes de referência, com padrões similares para *S. sobrinus*, *S. downei* e *S. ferus*. Os padrões produzidos com *HaeIII* puderam separar essas três espécies. Os autores consideraram que o uso de PCR-RFLP que amplificam genes rRNA 16S, seguido da digestão com *HpaII* e *HaeIII*, pode ser um método alternativo para a identificação do grupo mutans streptococci, e pode ser aplicável em estudos de cariogenicidade em larga escala.

Adicionalmente, Sato *et al.* (2003b) desenvolveram a técnica de "nested-PCR" baseada no gene de RNA ribossômico 16S, visando identificar *S. mutans* e *S. sobrinus* diretamente da placa bacteriana dental, sem haver necessidade de cultivo das bactérias alvo, em meio de cultura. O método consistiu de uma primeira etapa de amplificação com *primers* universais e uma segunda etapa com *primers* específicos, que permite a amplificação de regiões específicas

do DNA da bactéria alvo, com alta sensibilidade. Os autores concluíram que o método de "nested-PCR" baseado no gene de RNA ribossômico 16S é rápido e mais sensível que o PCR direto para a detecção de bactérias do grupo mutans streptococci e pode ser adequado para estudos de cariogenicidade desse grupo em larga escala.

Kato *et al.* (2004) desenvolveram um método para mapear a distribuição das bactérias bucais cariogênicas, *S. mutans* e *S. sobrinus*, na placa bacteriana. Dez voluntários foram orientados para que não escovassem os dentes por três dias, objetivando formação de placa bacteriana *in situ*, em aparelhos que foram colocados sobre os molares superiores. A placa bacteriana formada nos aparelhos foi separada em 8 a 10 camadas com 100µm de espessura. O DNA foi extraído de cada fração da placa bacteriana através de um kit para purificação de DNA, que foi usado para a amplificação da sequência genética do rRNA 16S através do PCR com *primers* universais. Os produtos foram amplificados por PCR com *primers* específicos para *S. mutans* e *S. sobrinus*. O produto final foi separado em gel de agarose, corado e fotografado para confirmar a existência de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Os resultados mostraram que *S. mutans* foi detectado na placa bacteriana obtida de todos os 10 voluntários e *S. sobrinus* foi constatado em 7 voluntários. Entretanto, os padrões de distribuição das frações positivas para *S. mutans* e *S. sobrinus* variaram entre os voluntários da pesquisa, com uma tendência para a detecção de ambas as espécies mais frequentes nas camadas externas do que nas camadas do meio da placa dental. Em nenhuma fração de placa bacteriana foi encontrado somente *S. sobrinus*.



### 3. PROPOSIÇÃO

---

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a influência da rugosidade superficial de resinas compostas, com diferentes partículas de carga, no acúmulo de placa bacteriana *in situ*, através da quantificação por meio de espectrofotometria e da comparação qualitativa da placa bacteriana acumulada pela técnica de PCR-RFLP, para o grupo mutans streptococci.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram selecionadas as resinas compostas descritas na Tabela 1, onde estão indicados o nome comercial, a composição, o volume de carga, a classificação, o tamanho das partículas e fabricantes, e apresentadas na Figura 1. Para o acabamento dos corpos de prova, os materiais utilizados estão apresentados na Figura 2 e descritos na Tabela 2.

Tabela 1

Resinas compostas utilizadas nos ensaios *in situ* e *in vitro*

| Material     | Composição*                                                                                                                                     | Volume de carga (%) | Classificação       | Tamanho das partículas (µm) | Fabricante                      |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Durafill VS  | UDMA, partículas de dióxido de silício e fragmentos de polímero                                                                                 | 50,5                | Micropartícula      | 0,02 - 0,07                 | Heraeus Kulzer, Alemanha        |
| Tetric Ceram | Bis-GMA, UDMA, TEG-DMA, carga composta de trifluoreto de itérbio, óxidos mistos, dióxido de silício, vidro de bário e de fluorsilicato de bário | 60                  | Microhíbrida        | 0,04 - 3                    | Ivoclar Vivadent, Liechtenstein |
| Filtek P60   | Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, partículas de zirconia-silica                                                                                           | 61                  | Híbrida (monomodal) | 0,19 - 3,3                  | 3M, USA                         |

\* Composição aproximada fornecida pelo fabricante



Figura 1 - Resinas compostas: Durafill VS, TetricCeram e Filtek P60.

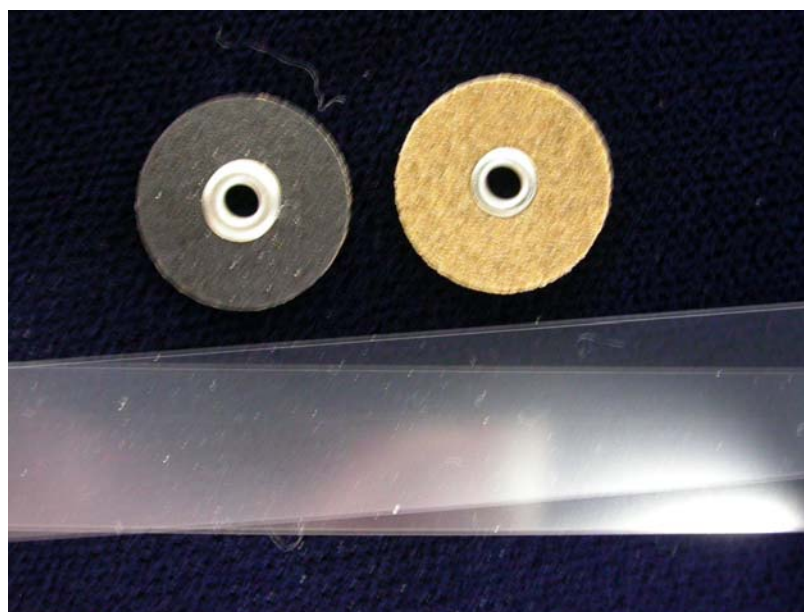


Figura 2 - Materiais de acabamento dos corpos de prova: Tira Matriz e discos Sof-Lex de granulação grossa.

Tabela 2

Sistemas de acabamento utilizados nos ensaios *in situ* e *in vitro*

| Material              | Composição*                                                    | Fabricante             |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------|
| Tira Matriz           | Tira de poliéster                                              | Dentort, São Paulo, SP |
| Discos Sof-Lex Pop-On | Discos com abrasivos de óxido de alumínio de granulação grossa | 3M, Saint Paul, USA    |

\* Composição fornecida pelo fabricante

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Confecção dos corpos de prova

Para a confecção dos corpos de prova, foi utilizada uma matriz de teflon com 11,5cm de comprimento, 5,5cm de largura e 0,3cm de espessura, possuindo 4 perfurações, com 0,5cm de diâmetro interno (Figura 3). Os materiais Tetric Ceram, Filtek P60 e Durafill VS, cor A<sub>3</sub>, foram inseridos nas cavidades da matriz de teflon em dois incrementos de aproximadamente 1,5mm (Figura 4), com o auxílio de espátula para resina composta nº5 (American Igle, USA). Cada incremento foi fotoativado durante 40 segundos por meio de luz visível (Curing Light XL 3000, 3M), com intensidade acima de 450mw/cm<sup>2</sup>. Antes da fotoativação da segunda camada, foi posicionada uma tira matriz de poliéster (Dentort), e sobre a mesma foi posicionado um peso de 500g, durante 30 segundos. Após a remoção do peso, foi iniciada a fotoativação do material. Em seguida, os corpos de prova foram removidos da matriz de teflon (Figura 5). Para cada material



restaurador, Tetric Ceram, Filtek P60 e Durafill VS, foram confeccionados 10 cilindros para o ensaio *in vitro* e 130 cilindros para o ensaio *in situ*, sendo 120 cilindros para a quantificação do acúmulo de placa bacteriana e 10 cilindros para o ensaio de avaliação qualitativa da placa bacteriana.

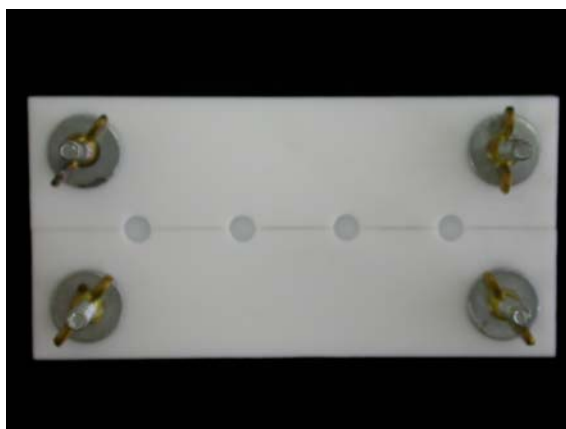


Figura 3 - Matriz de teflon utilizada para confecção dos corpos de prova.

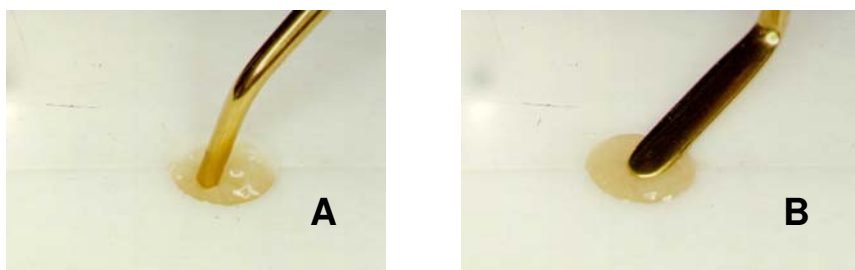


Figura 4 - Preparo dos corpos de prova em matriz de teflon. A) acomodação da primeira camada do material, com uma espátula para resina composta nº5; B) acomodação da segunda camada.



Figura 5 - Corpos de prova das resinas compostas

#### ***4.2.2. Tratamento superficial***

Após a remoção da matriz de Teflon, os cilindros foram divididos aleatoriamente em dois grupos.

No primeiro grupo, os cilindros não sofreram nenhum tratamento superficial posterior, e a superfície fotoativada em contato com a tira matriz foi considerada como a superfície lisa.

No segundo grupo, foram utilizados os Discos Sof-Lex de granulação grossa do Sistema Pop-on, montados em mandril em contra-ângulo e em baixa rotação. Cada disco foi aplicado sobre a superfície do corpo de prova, durante 15 segundos, sob refrigeração com água. No intervalo de cada aplicação, foi realizada irrigação com jatos de ar / água, por 5 segundos. Um disco foi usado para cada dois corpos de prova. A superfície tratada foi considerada como rugosa.

A interação resina composta x acabamento superficial deu origem a seis condições experimentais:

Grupo 1 - Resina composta Durafill VS com superfície lisa

Grupo 2 - Resina composta Durafill VS com superfície rugosa

Grupo 3 - Resina composta Tetric Ceram com superfície lisa

Grupo 4 - Resina composta Tetric Ceram com superfície rugosa

Grupo 5 - Resina composta Filtek P60 com superfície lisa

Grupo 6 - Resina composta Filtek P60 com superfície rugosa

#### **4.2.3. Avaliação da rugosidade superficial in vitro**

##### *4.2.3.1. Leitura em rugosímetro*

Após os procedimentos de acabamento superficial descritos no item 4.2.2, os corpos de prova foram lavados durante 15 segundos com jatos de ar/água da seringa tríplice e secos com papel absorvente. Em seguida, foram submetidos à leitura pelo rugosímetro (Mitutoyo - SURFTEST 211) (Figura 6). A leitura considerada foi a média aritmética entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do aparelho ( $R_a$ ), em que foi medido um total de 0,25mm. Foram realizadas dez leituras, na superfície tratada de cada corpo de prova. Os valores obtidos foram anotados e as médias foram tabuladas e submetidas à análise estatística, utilizando o programa SAS (SAS Institute). Cinco corpos de prova foram avaliados para cada condição experimental resina composta x acabamento.



Figura 6 - Rugosímetro utilizado na leitura da rugosidade superficial *in vitro*

#### 4.2.3.2. Delineamento experimental para a rugosidade superficial.

A avaliação da rugosidade superficial *in vitro* seguiu o delineamento inteiramente ao acaso, em um esquema fatorial 3 x 2 (Tabela 3). A variável resposta foi rugosidade superficial, em Ra.

Tabela 3

Delineamento estatístico, em esquema fatorial (3 x 2) para a avaliação da rugosidade superficial *in vitro*

| C.V.                  | G.L. |
|-----------------------|------|
| Material              | 2    |
| Acabamento            | 1    |
| Material x Acabamento | 2    |
| Resíduo               | 24   |
| Total                 | 29   |

#### **4.2.4. Avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ***

Para a avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Cury *et al.* (1994) e utilizada por Mendonça (1999) e Leite Jr. (2001).

##### **4.2.4.1. Seleção e informação dos voluntários**

Foram selecionados para o estudo *in situ* 10 voluntários, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 30 anos, alunos de graduação do Curso de Odontologia da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, em Londrina - PR, saudáveis, apresentando padrão de controle de higiene bucal adequado, baixo índice de cárie e fluxo salivar normal. Serviram como critérios para exclusão da amostra, voluntárias em período de gestação, voluntários com atividade de cárie, gengivite ou doença periodontal, apresentando patologias locais ou sistêmicas ou que não concordassem com os termos da pesquisa.

Os voluntários assinaram um termo de consentimento e, de acordo com este, possuíam liberdade para desistir da pesquisa a qualquer momento (Anexo 1). Um cirurgião-dentista não ligado ao projeto forneceu um documento assinado pelos pesquisadores, contendo todas as informações a respeito da metodologia envolvida no trabalho, seus objetivos, critérios de seleção e exclusão dos voluntários, análise crítica dos riscos e formas de ressarcimento (Anexo 2). Além de fornecer o documento, o cirurgião-dentista também deu todas as informações pertinentes.

O projeto desta pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - da UNOPAR e foi aprovado (Anexo 3), cumprindo integralmente o disposto na Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os voluntários seguiram as instruções fornecidas, comparecendo ao laboratório de Dentística nos horários e datas preestabelecidas.

Durante o experimento, os participantes não utilizaram qualquer substância antimicrobiana (enxaguatórios, antibióticos, etc.) e foram instruídos a escovar seus dentes com um dentifrício padronizado, da marca Sorriso (Kolynos do Brasil), bem como utilizar escovas dentais do tipo Reach macia (Johnson & Johnson), ambos fornecidos pelo responsável da pesquisa. Os dispositivos intra-buciais não foram escovados com o dentifrício na superfície que contém os corpos de prova, mas apenas naquela em contato com o palato. Os cuidados com a higiene bucal com o dentifrício e escova padrão foram iniciados com uma semana de antecedência ao experimento.

#### *4.2.4.2. Confeção do dispositivo intra-bucal e fixação dos corpos de prova*

Para cada voluntário, foi obtido o modelo em gesso pedra dos arcos superior e inferior, através da moldagem anatômica com alginato (Jeltrat Plus, Dentsply). Por meio desse modelo, foi confeccionado um dispositivo intra-bucal palatino em acrílico (Figura 7), que foi adequadamente polido, especialmente em suas margens e arestas, a fim de se evitar irritações e acúmulo de placa bacteriana e, conseqüentemente, alterações nos tecidos gengivais.

Nesse aparelho, foram fixados com cera pegajosa (Horus, Herpo Produtos Dentários), seis corpos de prova, uma amostra de cada grupo experimental, de maneira que ficassem posicionados à um milímetro da superfície da resina, para facilitar a retenção da placa bacteriana (Figura 7). Na região do aparelho, destinada ao posicionamento das amostras, foi confeccionado um orifício que facilitou a remoção dos corpos de prova, com o auxílio de uma sonda exploradora nº 5 (Tenax Tecnodent Ind. e Com.Ltda.).



Figura 7 - Dispositivo palatino com os corpos de prova, posicionado na cavidade bucal

Durante a fase de instalação dos aparelhos intra-bucais e no decorrer do experimento, qualquer desconforto relatado pelo voluntário foi diagnosticado e solucionado, para que a causa da irritação fosse prontamente eliminada.

A primeira disposição dos corpos de prova no dispositivo intra-bucal foi aleatorizada por sorteio e as seguintes obedeceram a ordem de seqüência da Figura 8. Com a realização do rodízio, os grupos experimentais passaram por todas as seis posições possíveis do dispositivo palatino, para se evitar interferência da localização nos resultados finais.

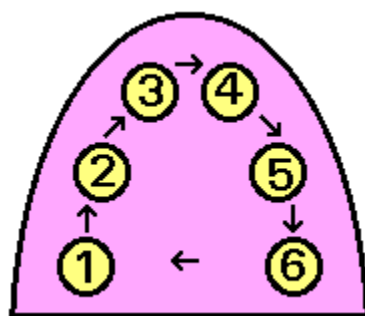


Figura 8 - Exemplo do esquema de rodízio do posicionamento dos corpos de prova nos dispositivos palatinos, para um voluntário

Um total de seis ciclos de formação de placa bacteriana foi realizado para o ensaio de quantificação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, e um ciclo adicional foi feito para o ensaio de avaliação qualitativa da placa bacteriana. A cada ciclo, os corpos de prova foram substituídos e modificados de posição.

#### *4.2.4.3. Ciclo de formação de placa bacteriana*

Cada voluntário utilizou o dispositivo intra-bucal durante três dias. Os voluntários foram instruídos a remover o dispositivo intra-bucal apenas durante as



refeições e mantê-lo em local úmido e fechado, durante este período, em recipiente fornecido pelo responsável da pesquisa.

#### *4.2.4.4. Quantificação da placa bacteriana*

No quarto dia, os corpos de prova foram cuidadosamente retirados dos dispositivos intra-bucais, removendo-se totalmente a cera pegajosa. Em seguida, a placa bacteriana formada sobre cada corpo de prova foi quantificada em espectrofotômetro.

Para isso, os espécimes foram colocados, individualmente, em microtubos identificados (Axigen Scientific), contendo 1,5ml de solução de hidróxido de sódio (NaOH) - 1,0M e agitados mecanicamente em agitador de tubos de alta frequência (Daigger Vortex, A. Daigger & Co, Inc.) por 10 segundos. Em seguida, os microtubos permaneceram em agitação durante três horas (agitador de tubos TE 422, Tecnal). Após uma hora e meia, os microtubos foram novamente agitados em alta velocidade.

Encerrada a agitação, os tubos foram centrifugados (microcentrífuga Eppendorf) por 10 minutos, na velocidade de 16000rpm. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante submetido à leitura no espectrofotômetro (Genesys 8) (Figura 9), no comprimento de onda de 280nm. Para se calibrar o aparelho, foi utilizada a solução de hidróxido de sódio (NaOH) - 1,0M com o corpo de prova sem placa bacteriana. Ao término de cada ciclo de formação de placa bacteriana,

os resultados foram anotados e tabulados, para análise estatística, utilizando o programa SAS (SAS Institute).



Figura 9 - Espectrofotômetro utilizado para leitura da quantificação da placa bacteriana

#### *4.2.4.5. Neutralização dos resíduos do dispositivo intra-bucal*

Após cada ciclo de formação de placa bacteriana e leitura, houve um intervalo de quatro dias, em que o dispositivo intra-bucal foi mantido em solução desinfetante de glutaraldeído a 2% ativado (Anti-G Plus, Dentsply) nas primeiras 8 horas e, em seguida, em água corrente por mais três dias.

#### 4.2.4.6. Delineamento estatístico para a quantificação de placa bacteriana

Para a avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, o delineamento estatístico empregado foi o inteiramente ao acaso, em um esquema fatorial 3 x 2, sendo material e acabamento considerados os fatores em estudo (Tabela 4). A variável resposta foi acúmulo de placa bacteriana, em absorbância.

Tabela 4

Delineamento estatístico para a avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*

| C.V.                  | G.L. |
|-----------------------|------|
| Material              | 2    |
| Acabamento            | 1    |
| Material x Acabamento | 2    |
| Resíduo               | 54   |
| Total                 | 59   |

#### 4.2.5. Avaliação qualitativa da placa bacteriana *in situ*

##### 4.2.5.1. Obtenção das amostras de DNA

Após um ciclo de formação de placa bacteriana na cavidade bucal de cinco voluntários, os corpos de prova foram cuidadosamente retirados dos dispositivos intra-bucais, removendo-se totalmente a cera pegajosa. Foram coletadas ainda, amostras de saliva de cada voluntário, com o auxílio de um

cotonete (Johnson & Johnson), para posterior comparação com a placa bacteriana contida nos corpos de prova. A placa bacteriana formada sobre cada corpo de prova e as amostras de saliva foram avaliadas comparativamente, utilizando a técnica de PCR-RFLP.

Para isso, os espécimes foram colocados, individualmente, em microtubos identificados, contendo 500µl de tampão de extração TE (10mM Tris-base, 1mM EDTA, pH 8,0). Os tubos foram agitados mecanicamente a 120rpm por 3 horas em um agitador de tubos (TE 422, Tecnal) e em seguida mantidos em geladeira, a 4°C, por uma noite.

A extração do DNA das células bacterianas foi realizada submetendo-se uma alíquota de 300µl das amostras a um banho de fervura por 10 minutos e resfriamento imediato em gelo (adaptado de Saarela *et al.*, 1996). Essas amostras de DNA foram conservadas em freezer, a -20°C, para posterior utilização nos experimentos de PCR. Além das amostras dos voluntários, foi utilizado como controle positivo um isolado tipo de *S. mutans* (CCT3340), conservado em BHI-glicerol em ultrafreezer a -70°C cujo DNA também foi extraído por fervura.

#### *4.2.5.2. Reação em cadeia da polimerase - PCR*

Amostras de DNA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase para a verificação da presença de bactérias do grupo mutans streptococci, utilizando os *primers* universais 8UA e 1492R (Sato *et al.*, 2001, 2003a, 2003b), que amplificam genes de RNA ribossômico 16S, listados na Tabela 5.

Tabela 5

*Primers* utilizados nas análises de PCR (Sato *et al.*, 2001, 2003a, 2003b).

| <i>Primer</i> | Sequência                               | Posição |
|---------------|-----------------------------------------|---------|
| 8UA           | 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'    | 1505pb  |
| 1492R         | 5' - TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T - 3' |         |

A reação de PCR foi processada em 25µl de uma mistura de reagentes contendo 1x solução tampão (10x reaction buffer Taq polymerase), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM de dNTP (DNA polymerization mix), 0,25mM de cada *primer*, 1,5U de Taq DNA polymerase e uma alíquota de 2,5µl de cada amostra de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador (PTC-100, M J Research, Inc.) (Figura 10) programado de acordo com as seguintes condições térmicas: 15 minutos a 95°C para ativação inicial de calor, seguida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 60°C para anelamento dos *primers* e 1,5 minuto a 72°C para extensão, com mais 10 minutos a 72°C para extensão final (Sato *et al.*, 2003b). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE pH 8,5, a 60V por uma hora (Figura 11). Em cada gel, foram incluídos dois padrões de peso molecular de 100bp DNA Ladder (Gibco) e 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5µg /ml e as bandas observadas com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta (Figura 12). As imagens do gel foram digitalizadas com o Sistema Kodak EDAS 120 (Figura 12).

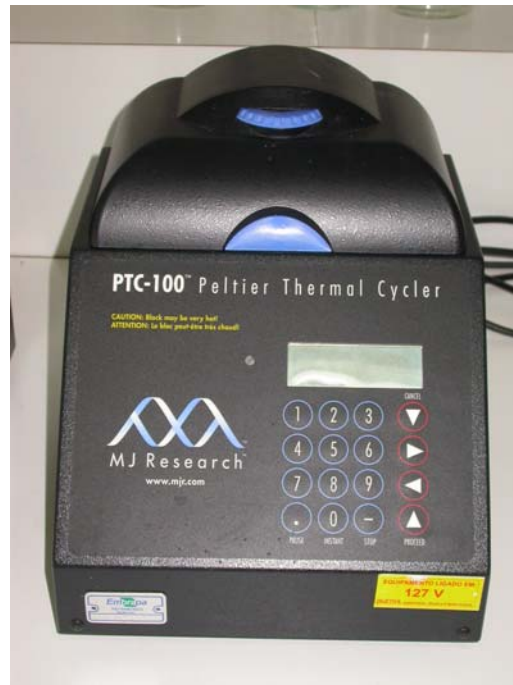


Figura 10 - Termociclador utilizado para processar a reação de PCR.

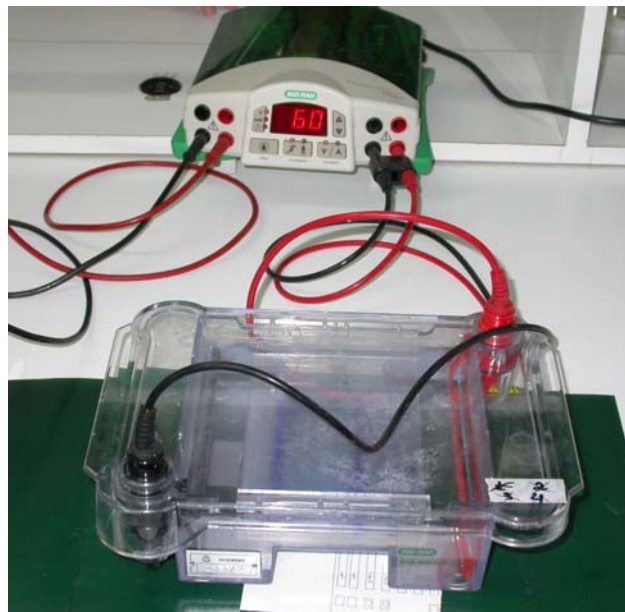


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose.

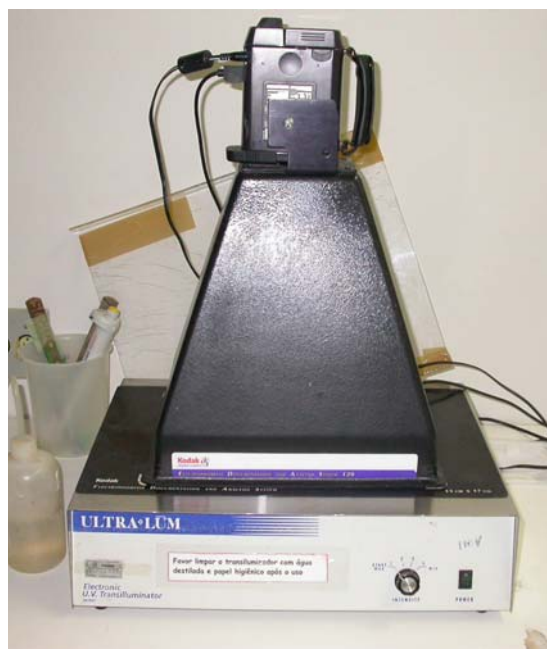


Figura 12 - Transiluminador de luz ultra-violeta utilizado para visualizar as bandas nos géis e sistema de digitalização de imagens.

#### *4.2.5.3. Digestão e análise de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição - RFLP*

Os produtos da amplificação foram individualmente digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII*, *CfoI* e *RsaI* (Promega Corporation), de acordo com Sato *et al.* (2003b). Para tanto, a reação de digestão foi processada em uma mistura de reagentes contendo 0,15µl de albumina de soro bovino (10µg/ml BSA), 1,5µl da solução tampão da enzima (RE 10x buffer), 0,5µl da enzima de restrição, uma alíquota de 7µl do produto de PCR, completando o volume final de 14,5µl

com água Milli-Q. A reação foi mantida a 37°C por 15 horas e paralisada com 0,5µl de 250mM EDTA. Em seguida, foi colocada por 10 minutos em banho-maria a 65°C e imediatamente resfriada em gelo. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%, em tampão TAE pH 8,5, a 60V por uma hora. Em cada gel, foram incluídos dois padrões de peso molecular de 100bp DNA Ladder (Gibco) e 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

A análise qualitativa da placa bacteriana desenvolvida nos corpos de prova, mantidos por três dias na cavidade bucal de cinco voluntários, foi feita baseada no tamanho e na posição no gel dos fragmentos gerados pela digestão dos produtos de PCR com cada uma das três enzimas de restrição, utilizando como base os fragmentos dos padrões de peso molecular.





## 5. RESULTADOS

---

### **5.1. Análise estatística da avaliação da rugosidade superficial *in vitro***

Para a análise da avaliação da rugosidade superficial *in vitro*, foram utilizadas as médias dos dados de leitura Ra ( $\mu\text{m}$ ) obtidos em cada corpo de prova. Com essas médias, foi realizado o teste de Análise de Variância, que encontrou um Coeficiente de Variação (C.V.) de 15,5%, considerado adequado para um ensaio laboratorial. Entretanto, as pressuposições do modelo foram testadas e foram apontados problemas de outliers, heterogeneidade de variância e não aditividade do modelo. Assim, foi sugerida uma transformação matemática, elevando os dados à potência 0,20, que corrigiu os problemas supracitados. Feito o ajuste dos dados, foi aplicada uma segunda Análise de Variância e o seu resultado é exibido na Tabela 6.

Em seguida, foi realizada a decomposição da Análise de Variância, para facilitar a análise dos fatores em estudo e o seu resultado é mostrado na Tabela 7.

A decomposição da Análise da Variância encontrou efeito significativo para os fatores Acabamento e Material, e ainda para a interação Acabamento x Material. Para elucidar o resultado, foi aplicado o teste de Variação Múltipla de Duncan e o resultado é apresentado na Tabela 8 e na Figura 13.

Tabela 6

Resultado da Análise de Variância com dados transformados para o estudo da rugosidade superficial *in vitro*, para a variável resposta Ra ( $\mu\text{m}$ ).

| C.V.    | G.L. | S.Q.       | Q.M.       | F      | Pr > F  |
|---------|------|------------|------------|--------|---------|
| Modelo  | 5    | 0,95522264 | 0,19104453 | 156,74 | <0,0001 |
| Resíduo | 24   | 0,02925237 | 0,00121885 |        |         |
| Total   | 29   |            |            |        |         |

C.V. = 3,83149%

Tabela 7

Resultado da decomposição da Análise da Variância com dados transformados para o estudo de rugosidade superficial *in vitro*, para a variável resposta Ra ( $\mu\text{m}$ ).

| C.V.                  | G.L. | S.Q.       | Q.M.       | F      | Pr > F  |
|-----------------------|------|------------|------------|--------|---------|
| Acabamento            | 1    | 0,89506424 | 0,89506424 | 734,35 | <0,0001 |
| Material              | 2    | 0,02704878 | 0,01352439 | 11,10  | 0,0004  |
| Acabamento x Material | 2    | 0,03310963 | 0,01655481 | 13,58  | 0,0001  |

Pelo teste de Variação Múltipla de Duncan, verificou-se que a rugosidade superficial para o fator acabamento, avaliada pela variável resposta Ra, foi maior nos corpos de prova desgastados com os Discos Sof-Lex de granulação grossa, dos que nos que não foram submetidos ao acabamento (Tira matriz), com diferença estatística significativa, para as três resinas compostas

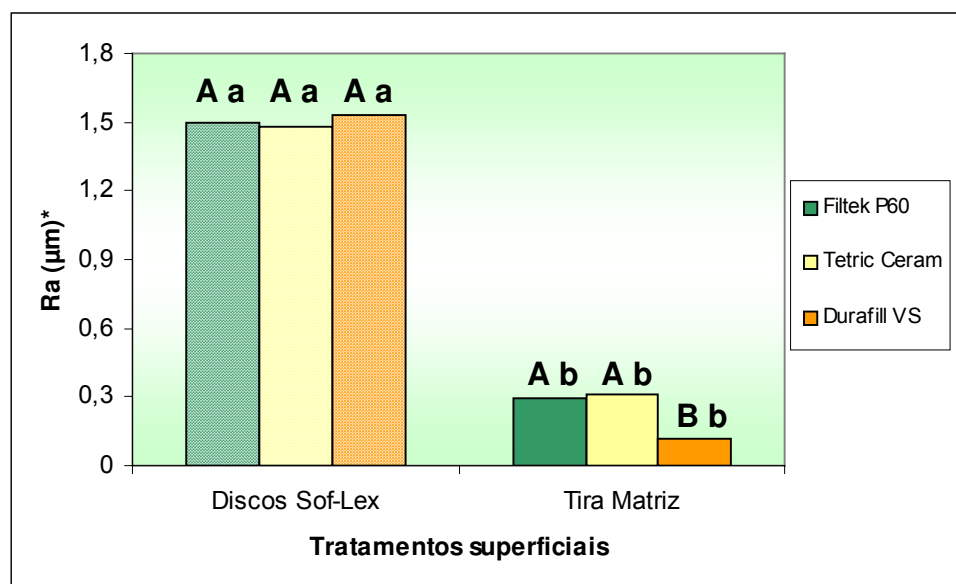
estudadas. Já, para o fator material, a resina composta de micropartículas Durafill VS apresentou a maior lisura superficial quando se utilizou a Tira Matriz, com diferença estatística significativa das outras duas resinas compostas (Filtek P60 e Tetric Ceram), que não diferiram entre si. Quando se empregou os Discos Sof-Lex de granulação grossa no acabamento, as resinas compostas não apresentaram diferença estatística na rugosidade superficial entre si (Tabela 8 e Figura 13).

Tabela 8

Resultado do teste de Variação Múltipla de Duncan com dados transformados para a interação Acabamento x Material no ensaio de rugosidade superficial *in vitro*, para a variável resposta Ra ( $\mu\text{m}$ ).

| Material     | Acabamento     |         |             |         |
|--------------|----------------|---------|-------------|---------|
|              | Discos Sof-Lex |         | Tira Matriz |         |
|              | Média          | Duncan* | Média       | Duncan* |
| Filtek P60   | 1,4976         | A a     | 0,2960      | A b     |
| Tetric Ceram | 1,4784         | A a     | 0,3118      | A b     |
| Durafill VS  | 1,5332         | A a     | 0,1162      | B b     |

\* médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Variação Múltipla de Duncan, a 5% de probabilidade



\* médias seguidas de mesma letra maiúscula dentro de cada acabamento e minúscula dentro de cada material não diferem entre si pelo teste de Variação Múltipla de Duncan, a 5% de probabilidade

Figura 13 - Rugosidade superficial *in vitro* de corpos de prova confeccionados com resinas compostas, com superfície lisa - Tira Matriz ou rugosa - Discos Sof-Lex.

## 5.2. Análise estatística da avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*

Para a análise da avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, foram utilizados os dados de absorbância obtidos em espectrofotômetro. Com a média dos dados da leitura das seis semanas, foi realizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), sem necessidade de transformação dos dados, de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9

Resultado da Análise de Variância para o estudo de acúmulo de placa bacteriana *in situ*, para a variável resposta absorvância.

| C.V.    | G.L. | S.Q.       | Q.M.       | F    | Pr > F |
|---------|------|------------|------------|------|--------|
| Modelo  | 5    | 0,27474989 | 0,05494998 | 1,84 | 0,1201 |
| Resíduo | 54   | 1,61067527 | 0,02982732 |      |        |
| Total   | 59   | 1,88542516 |            |      |        |

C.V. = 24,42022%

Pelo fato de haver mais de um fator em estudo e também para melhor entendimento da Análise de Variância, foi realizada uma decomposição da mesma e o seu resultado pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10

Resultado da decomposição da Análise da Variância para o estudo de acúmulo de placa bacteriana *in situ*, para a variável resposta absorvância.

| C.V.                  | G.L. | S.Q. tipo III | Q.M.       | F    | Pr > F |
|-----------------------|------|---------------|------------|------|--------|
| Acabamento            | 1    | 0,14898502    | 0,14898502 | 4,99 | 0,0296 |
| Material              | 2    | 0,10357675    | 0,05178838 | 1,74 | 0,1859 |
| Acabamento x Material | 2    | 0,02218812    | 0,01109406 | 0,37 | 0,6911 |

A decomposição da ANOVA apontou diferença estatística significativa para o fator em estudo Acabamento. Para comparação entre os Acabamentos, foi realizado o teste de Tukey e o resultado é apresentado na Tabela 11 e ilustrado na Figura 14.

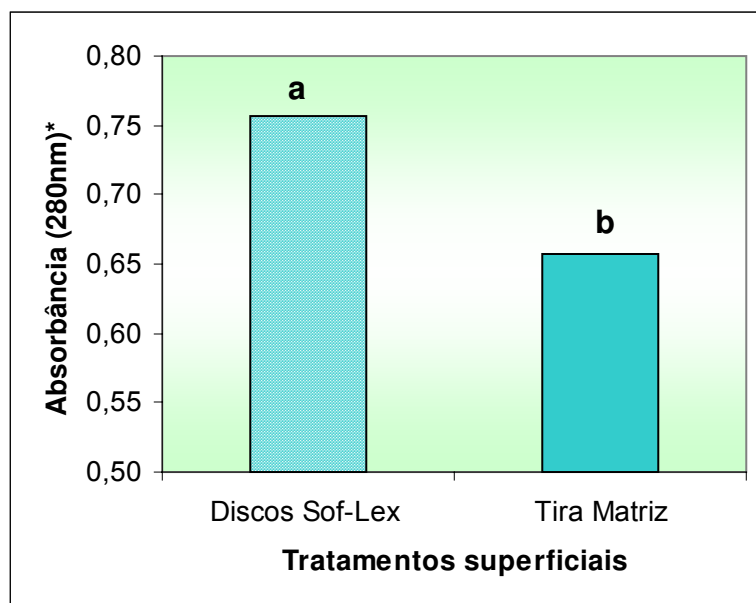
Tabela 11

Resultado do teste de Tukey para o fator Acabamento no ensaio de acúmulo de placa bacteriana *in situ*, para a variável resposta absorvância.

| Acabamento     | N  | Média   | Tukey* |
|----------------|----|---------|--------|
| Discos Sof-Lex | 30 | 0,75706 | a      |
| Tira Matriz    | 30 | 0,65739 | b      |

\* médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Pelo teste de Tukey, verificou-se que o acúmulo de placa bacteriana, avaliado pela variável resposta absorvância, foi maior nos corpos de prova desgastados com os Discos Sof-Lex, do que nos que não foram submetidos a acabamento, com diferença estatística significativa, independente da resina composta utilizada (Tabela 11 e Figura 14).



\* médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Figura 14 - Avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ* de corpos de prova confeccionados com resinas compostas, com superfície lisa -Tira Matriz ou rugosa - Discos Sof-Lex.

### 5.3. Avaliação qualitativa da placa bacteriana *in situ*

Utilizando os *primers* universais 8UA e 1492R para bactérias do grupo mutans streptococci (Sato *et al.*, 2001), que amplificam genes de RNA ribossômico 16S, verificou-se a amplificação das amostras de DNA extraídas em tampão de extração e posterior fervura, obtidas a partir da placa bacteriana acumulada nos corpos de prova, bem como das amostras coletadas da saliva dos voluntários, resultando numa banda de 1505pb observada nos géis (Figura 15), tamanho



esperado para bactérias desse grupo (Sato *et al.*, 2003b). Isto indica a presença de bactérias do grupo mutans streptococci nos corpos de prova confeccionados com as três resinas compostas testadas, mantidas na cavidade bucal dos voluntários pelo período de três dias.

Apenas não foi obtida amplificação de uma das amostras de saliva dos voluntários 3 e 4 (Figura 15, colunas 26 e 34), possivelmente por problemas na coleta das amostras.

Também, foi verificada a amplificação do DNA extraído do isolado tipo de *S. mutans* (CCT3340), utilizado como controle positivo, na concentração de  $10^8$  células/ml, indicando que a metodologia do teste de PCR empregada estava correta.

Os produtos da amplificação foram individualmente digeridos com as enzimas de restrição *HaeIII*, *CfoI* e *RsaI* e as fotografias dos géis podem ser verificadas nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente. Verificou-se semelhança nos perfis gerados pela digestão entre as amostras coletadas dos diferentes corpos de prova do mesmo voluntário, para as três enzimas de restrição, indicando que as resinas compostas Tetric Ceram, Durafill VS ou Filtek P60 e o tipo de superfície, lisa ou rugosa, não afetaram significativamente a composição da placa bacteriana acumulada nos corpos de prova.

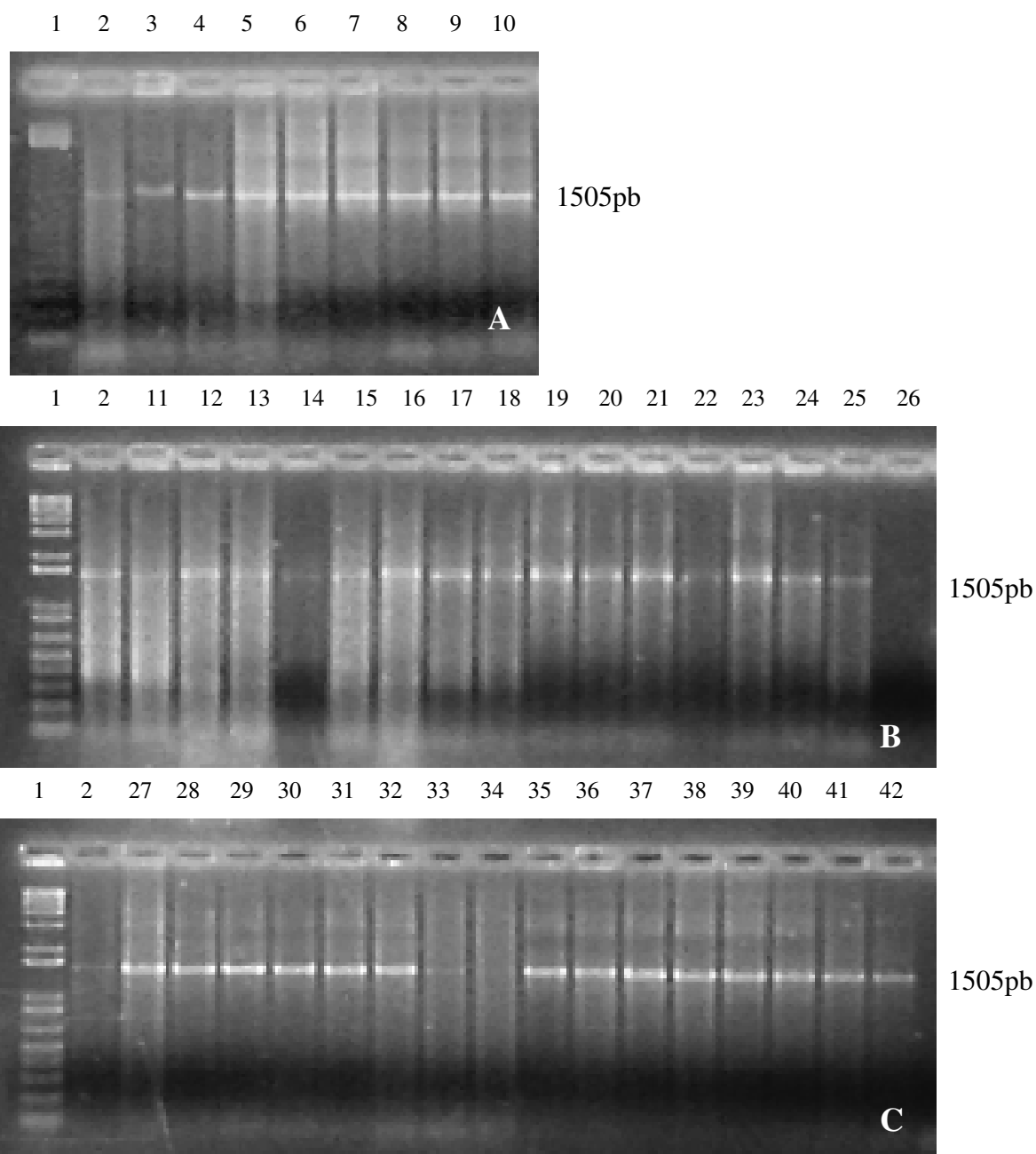


Figura 15 - Amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os *primers* universais 8UA e 1492R. Colunas: 1. 1 kb plus DNA Ladder; 2. DNA do isolado tipo de *S. mutans* (CCT3340) a  $10^8$  células/ml; Amostras dos voluntários - seis corpos de prova, duas amostras de saliva: A - voluntário 1 (colunas 3 a 10); B - voluntários 2 (colunas 11 a 18) e 3 (colunas 19 a 26); C - voluntários 4 (colunas 27 a 34) e 5 (colunas 35 a 42).

Não houve diferenças significativas entre os perfis das amostras bacterianas dos corpos de prova e daquelas coletadas da saliva de cada voluntário (Figuras 16, 17 e 18), o que sugere que a placa bacteriana acumulada nos materiais restauradores é semelhante àquela encontrada na cavidade bucal.

As enzimas *HaeIII* e *RsaI* proporcionaram a geração de perfis com 5 bandas de mesmo tamanho, para todos os voluntários (Tabela 12, Figuras 16 e 18), indicando haver semelhança nas espécies de bactérias do grupo mutans streptococci presentes na microflora bucal entre os voluntários estudados. A enzima *CfoI* gerou perfis com 2 bandas para os voluntários 1 a 4, enquanto que uma banda adicional foi verificada para as amostras de corpos de prova do voluntário 5 (Tabela 12, Figura 17), o que sugere a presença de uma estirpe diferente de bactéria do grupo mutans streptococci para esse voluntário.

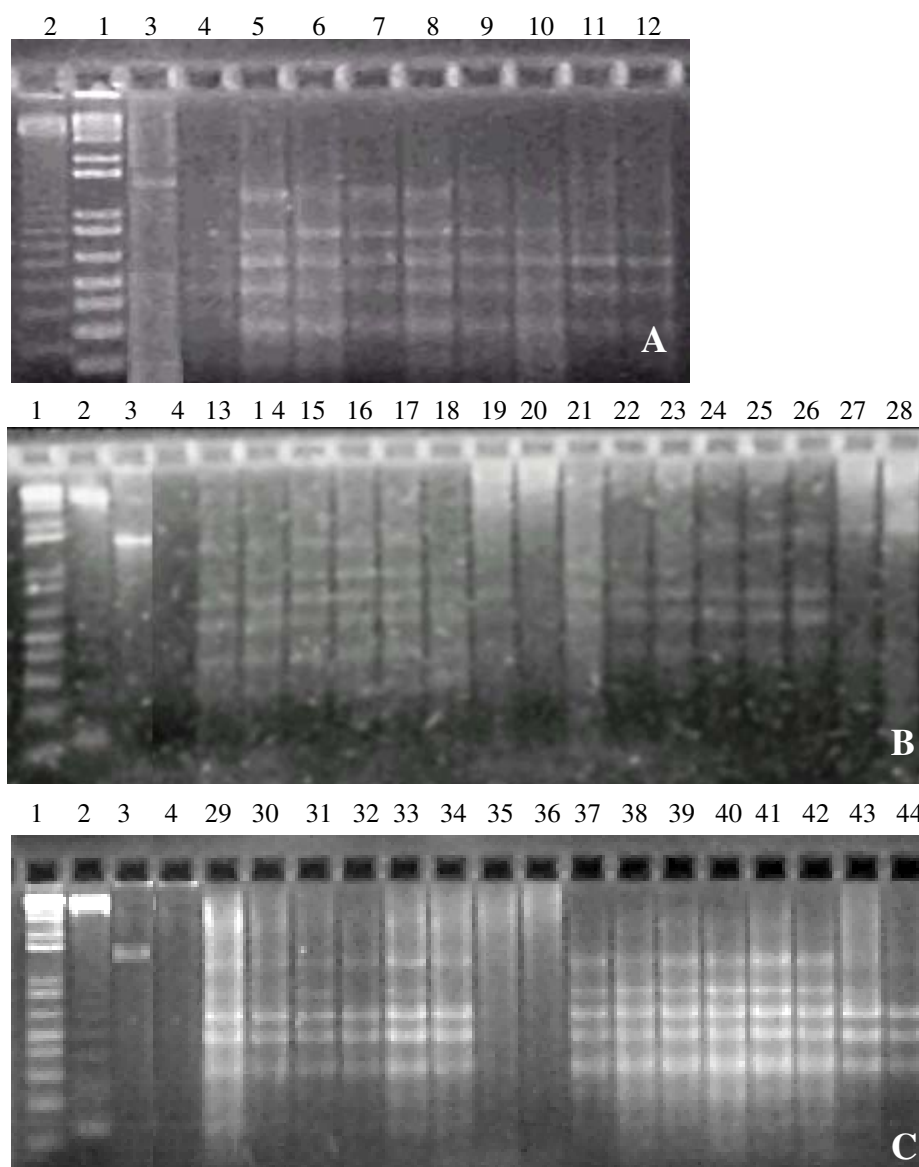


Figura 16 - Perfis gerados pela digestão com a enzima de restrição *HaeIII* do produto da amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os *primers* universais 8UA e 1492R. Colunas: 1. 1 kb plus DNA Ladder; 2. 100pb DNA Ladder; 3. produto da amplicação sem digerir; 4. DNA do isolado tipo de *S. mutans* (CCT3340) a  $10^8$  células/ml; Amostras dos voluntários - seis corpos de prova, duas amostras de saliva: A - voluntário 1 (colunas 5 a 12); B - voluntários 2 (colunas 13 a 20) e 3 (colunas 21 a 28); C - voluntários 4 (colunas 29 a 36) e 5 (colunas 37 a 44).

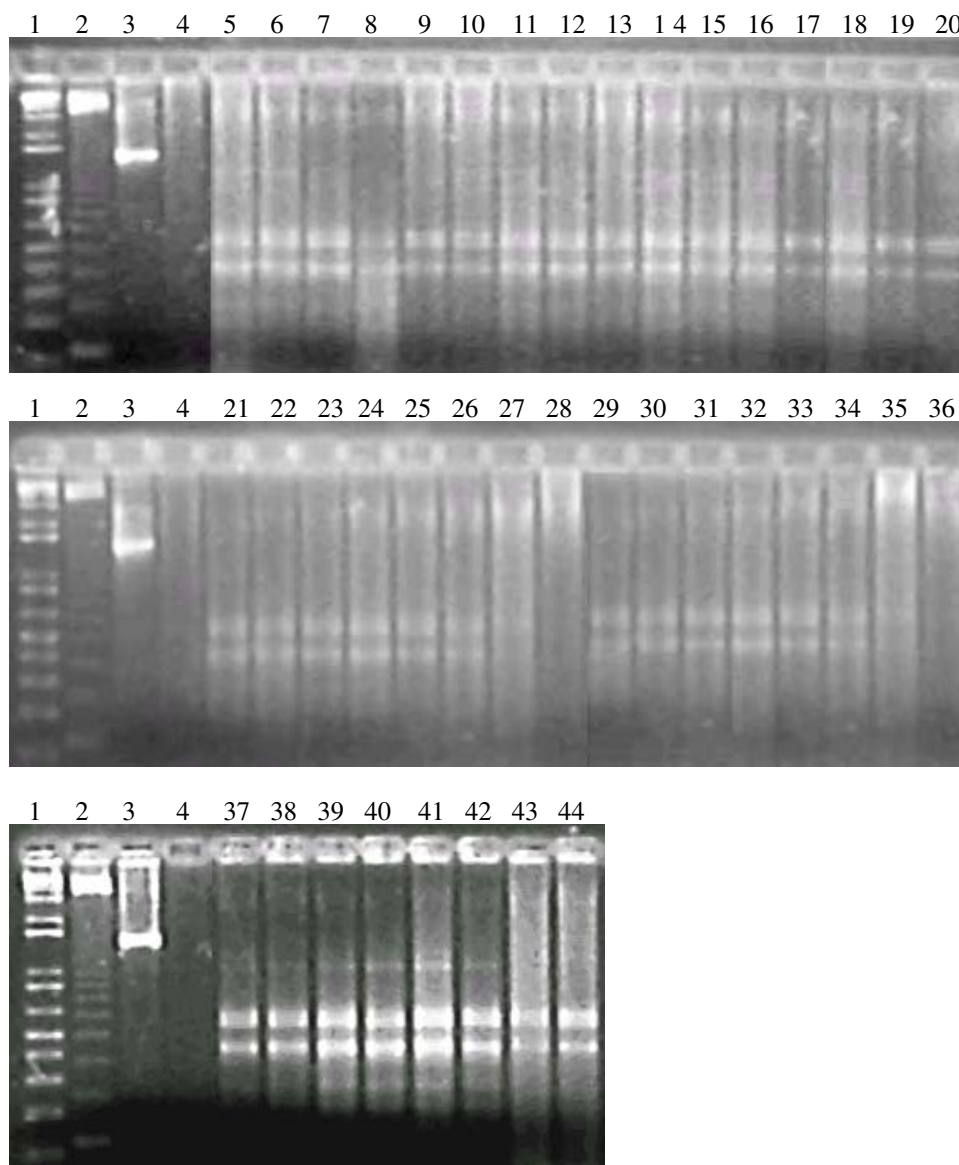


Figura 17 - Perfis gerados pela digestão com a enzima de restrição *Cfol* do produto da amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os *primers* universais 8UA e 1492R. Colunas: 1. 1 kb plus DNA Ladder; 2. 100pb DNA Ladder; 3. produto da amplificação sem digerir; 4. DNA do isolado tipo de *S. mutans* (CCT3340) a  $10^8$  células/ml; Amostras dos voluntários - seis corpos de prova, duas amostras de saliva: A - voluntários 1 (colunas 5 a 12) e 2 (colunas 13 a 20); B - voluntários 3 (colunas 21 a 28) e 4 (colunas 29 a 36) ; C - voluntário 5 (colunas 37 a 44).

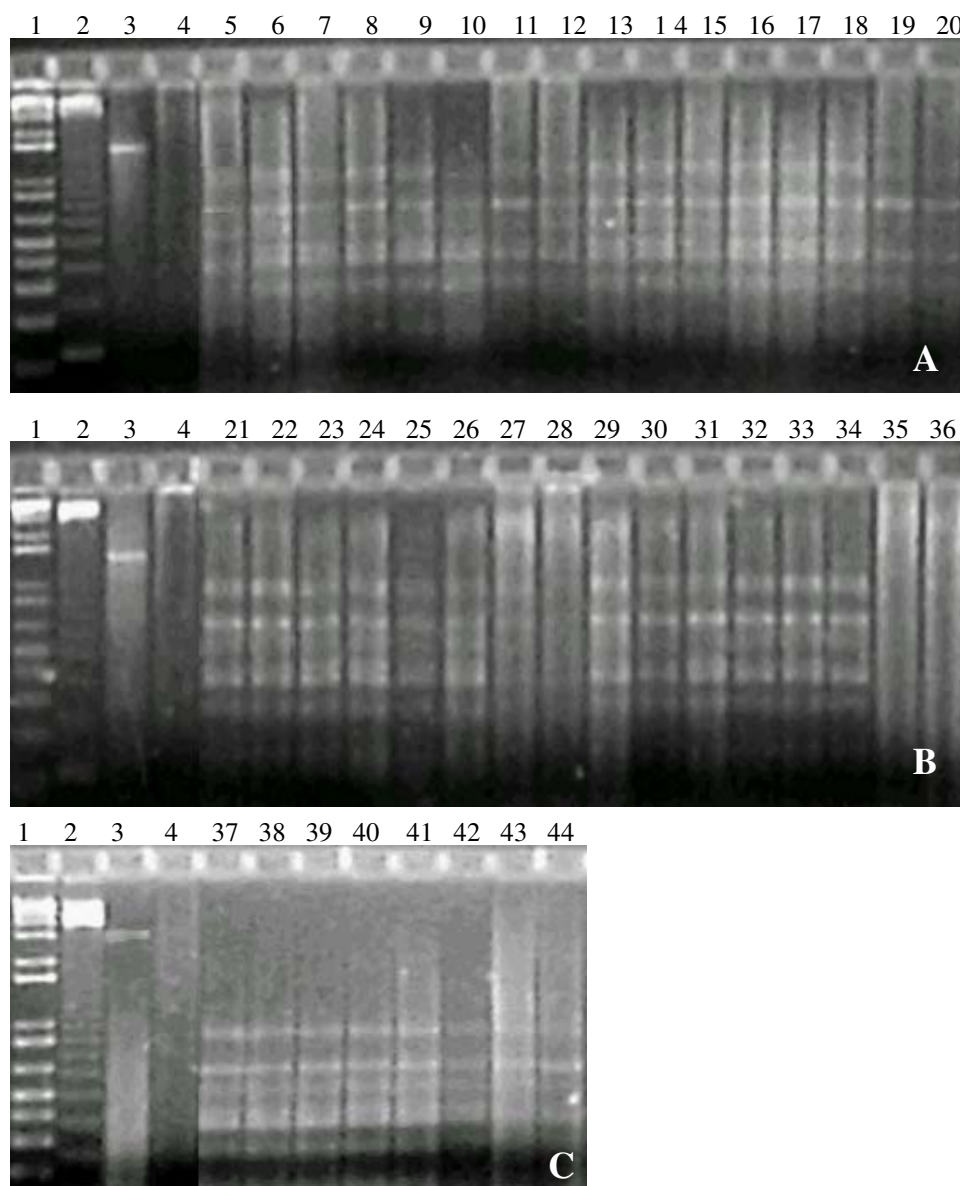


Figura 18 - Perfis gerados pela digestão com a enzima de restrição *RsaI* do produto da amplificação de amostras de DNA de placa bacteriana coletadas em corpos de prova e saliva de cinco voluntários, extraídas em TE, utilizando os *primers* universais 8UA e 1492R. Colunas: 1. 1 kb plus DNA Ladder; 2. 100pb DNA Ladder; 3. produto da amplicação sem digerir; 4. DNA do isolado tipo de *S. mutans* (CCT3340) a  $10^8$  células/ml; Amostras dos voluntários - seis corpos de prova, duas amostras de saliva: A - voluntários 1 (colunas 5 a 12) e 2 (colunas 13 a 20); B - voluntários 3 (colunas 21 a 28) e 4 (colunas 29 a 36) ; C - voluntário 5 (colunas 37 a 44).

Tabela 12

Perfis de PCR-RFLP dos genes de RNA ribossômico 16S de bactérias do grupo mutans streptococci, para as enzimas de restrição *HaeIII*, *CfoI* e *RsaI*.

| Enzima        | Voluntários | Tamanho estimado dos fragmentos de DNA (pb)* |
|---------------|-------------|----------------------------------------------|
| <i>HaeIII</i> | 1 a 5       | 1250, 630, 460, 350, 200                     |
| <i>CfoI</i>   | 1 a 4       | 350, 220                                     |
|               | 5           | 850, 350, 220                                |
| <i>RsaI</i>   | 1 a 5       | 900, 680, 400, 350, 270                      |

\* foram considerados fragmentos isolados com tamanho de pelo menos 100pb; tamanho estimado com base nos fragmentos do padrão de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.

## 6. DISCUSSÃO

---

Na clínica odontológica, as resinas compostas são, normalmente, selecionadas como primeira escolha para restaurações estéticas, devido às vantagens como alta qualidade estética, fácil manipulação clínica e a capacidade de adesão ao dente através dos sistemas adesivos. Entretanto, tem sido relatado um elevado acúmulo de bactérias nesses materiais, que pode acarretar algumas consequências desagradáveis. Uma das mais sérias é a formação de lesões de cárie secundárias, requerendo a substituição da restauração (Konishi *et al.*, 2003).

As resinas compostas deste trabalho de pesquisa foram selecionadas por representarem diferentes formulações, com base na média do tamanho das partículas de cargas (Oshima & Conceição, 2000), com diferentes indicações clínicas. Assim, a resina composta Durafill VS, de micropartículas, é indicada para dentes anteriores, Filtek P60 é um compósito híbrido (monomodal) para dentes posteriores e Tetric Ceram, microhíbrida, é indicada tanto para dentes anteriores como posteriores - universal.

Visando caracterizar as superfícies lisas e rugosas, os corpos de prova foram avaliados através de rugosímetro. A rugosidade superficial pode ser expressa numericamente por diversos parâmetros. O parâmetro mais comumente empregado é o Ra, obtido pela média aritmética dos valores de leitura do perfil



superficial, a partir da linha central do traçado avaliado (Joniot *et al.*, 2000), ou seja, a média aritmética entre os picos e vales percorridos pela ponta ativa do aparelho. Esse parâmetro foi utilizado neste trabalho, devido à facilidade de se comparar com resultados obtidos na literatura.

Verificou-se que a rugosidade superficial *in vitro*, avaliada pela variável resposta Ra, foi maior nos corpos de prova desgastados com os Discos Sof-Lex de granulação grossa, do que nos que não sofreram tratamento após a polimerização sob a Tira Matriz, com diferença estatística significativa, para as três resinas compostas. De fato, estudos com compósitos têm demonstrado que a superfície mais lisa é obtida através da Tira Matriz (Wilson *et al.*, 1990; Stoddard & Johnson, 1991; Chung, 1994; Hoelscher *et al.*, 1998). Assim, os resultados alcançados pelo experimento *in vitro* demonstram que as superfícies preparadas com os discos Sof-Lex de granulação grossa produziram as superfícies mais rugosas, independente do material restaurador avaliado, o que é um fator importante para o acúmulo de placa bacteriana (Quirynen *et al.*, 1990). A comparação entre uma superfície lisa - tira matriz e uma superfície rugosa - Discos Sof-Lex foi empregada neste estudo para verificar o efeito da textura superficial da resina composta na formação de placa dental.

Os corpos de prova confeccionados com a resina composta Durafill VS e polimerizados juntos à Tira Matriz apresentaram a menor rugosidade superficial, com diferença estatística significativa das resinas compostas Filtek P60 e Tetric Ceram, que não diferiram entre si. Uma vez que o tamanho das partículas de

carga tem relação direta com a rugosidade superficial das resinas compostas (Van Noort & Davis, 1984; Reis *et al.*, 2002), os resultados obtidos podem ser atribuídos à essa característica, porque a resina composta de micropartículas - Durafill VS - possui carga com tamanho variando entre 0,02 a 0,07 $\mu$ m, enquanto que as outras resinas avaliadas apresentam uma combinação de partículas com um tamanho médio maior, isto é, Tetric Ceram - 0,04 a 3 $\mu$ m e Filtek P60 - 0,19 a 3,3 $\mu$ m.

Segundo Konishi *et al.* (2003), existem poucos estudos analisando a flora bacteriana nas resinas compostas quantitativa e/ou qualitativamente, em comparação com aqueles realizados em superfícies dentais. Uma razão para a falta de informações sobre esse assunto é a dificuldade que envolve os procedimentos bacteriológicos para a identificação dos microorganismos acumulados nas superfícies. Também, Zalkind *et al.* (1998) destacaram a importância dos estudos *in situ*, já que as diferenças de resultados na adesão da placa bacteriana aos materiais restauradores em trabalhos *in vitro* e *in situ* podem refletir vários fatores que não são simulados *in vitro* como: a saliva e suas proteínas, pH, hábitos de higiene bucal e autolimpeza.

Para o estudo *in situ*, o método utilizado para a quantificação da placa bacteriana formada sobre os corpos de prova (Cury *et al.*, 1994; Mendonça, 1999, Leite Jr., 2001) foi eficiente, por ser simples e prático na sua execução. A placa bacteriana é composta por uma fração insolúvel em água, formada por células bacterianas, que têm cerca de 11% de carboidratos e 40% de proteínas, a maioria destas de alto peso molecular (Jenkins, 1978), sendo solúveis em hidróxido de

sódio (Cury *et al.*, 1994). Os aminoácidos aromáticos constituintes dessas proteínas, como o triptofano e a tirosina, absorvem luz no comprimento de onda de 280nm (Nelson & Cox, 2000), podendo ser quantificados por espectrofotometria. Essa metodologia foi utilizada por Zalkind *et al.* (1998), que confirmaram a presença de bactérias nas amostras extraídas com hidróxido de sódio.

O tempo de utilização do aparelho intra-bucal com os corpos de prova pelos voluntários foi de três dias, já que a rugosidade influencia a formação da placa bacteriana durante esse período. De fato, o estudo de Eick *et al.* (2004) sobre o grau de formação de placa bacteriana demonstrou claramente a influência da rugosidade superficial no acúmulo de placa por um período de até 48h, quando as superfícies irregulares protegem a bactéria das forças de cisalhamento durante a união inicial reversível, permitindo uma adesão posterior mais forte.

A cavidade bucal é constantemente contaminada pelas mais diversas espécies de microorganismos. Muitos destes microorganismos, especialmente aqueles responsáveis pela cárie, como bactérias do grupo mutans streptococci, podem sobreviver somente quando estão aderidos às superfícies dentais. Fisicamente, a adesão e a retenção bacteriana ocorrem em quatro fases: transporte da bactéria para a superfície, adesão bacteriana inicial, fixação por interações específicas e, finalmente, colonização das superfícies (Quirynen & Bollen, 1995; Bollen *et al.*, 1997). A rugosidade superficial dos materiais restauradores tem grande importância clínica nesse processo, já que está ligada à

adesão e à retenção bacteriana, as duas primeiras fases da colonização bacteriana. Auschill *et al.* (2002) salientaram que a rugosidade superficial influencia a adesão das bactérias na superfície dos dentes, em função da quantidade de área disponível para a retenção bacteriana.

A adesão de microrganismos às superfícies bucais rígidas como o dente, materiais restauradores diretos, restaurações protéticas e componentes de implantes é um pré-requisito para a formação da placa bacteriana, que pode levar ao desenvolvimento da cárie dental, doença periodontal e peri-implantite. A colonização microbiana nas superfícies é sempre precedida pela adsorção de uma película adquirida em que seus componentes são oriundos da saliva e do exsudato gengival. A composição da placa dental madura é dependente da união primária entre as bactérias pioneiras e a película adquirida (Sardin *et al.*, 2004).

Na revisão de literatura de Quirynen *et al.* (1990), estão relacionados vários estudos *in vivo* comparando diferentes materiais restauradores, que relacionaram o aumento da rugosidade superficial com a colonização bacteriana da superfície. Baseado nesses resultados, Bollen *et al.* (1997) sugeriram um limiar de rugosidade superficial, com um valor de Ra igual a 0,2µm. Quando os materiais tinham seus valores de Ra comparados, observou-se que, se a diferença estivesse dentro desse limiar, não acarretava aumento no acúmulo de placa bacteriana. Somente um aumento na rugosidade acima desse limiar resultaria numa elevação simultânea do acúmulo de placa bacteriana, e assim, aumentariam os riscos de desenvolvimento de cárie ou inflamação gengival.

Analisando os resultados obtidos no estudo *in situ*, verificou-se que o acúmulo de placa bacteriana, avaliado pela variável resposta absorvância, foi maior nos corpos de prova dos materiais rugosos do que nos lisos, com diferença estatística significativa, independente da resina composta utilizada. O menor valor de rugosidade superficial foi apresentado pelas amostras do grupo liso, média de  $Ra=0,24\mu m$ , e a maior rugosidade foi verificada naquelas do grupo rugoso, média de  $Ra=1,50\mu m$ , com diferença estatística significativa. Assim, a diferença de rugosidade entre as superfícies, lisa e rugosa, foi superior ao limiar de  $0,2\mu m$ , confirmando a observação de Bollen *et al.* (1997). Desta maneira, clinicamente é necessário que se realize o acabamento e polimento das restaurações em resina composta para se diminuir a retenção bacteriana e as conseqüências do acúmulo de placa, como a cárie e a doença periodontal.

Neste trabalho, nos corpos de prova com superfície lisa, apesar da diferença estatística significativa entre os valores de rugosidade encontrados para o material Durafill VS, média de  $Ra=0,11\mu m$ , e os outros dois materiais Filtek P60 e Tetric Ceram, médias de  $Ra = 0,29\mu m$  e  $0,31\mu m$ , respectivamente, isso não foi suficiente para proporcionar maiores valores de acúmulo de placa bacteriana nos últimos materiais, corroborando as informações estabelecidas por Bollen *et al.* (1997).

Por outro lado, não é apenas a rugosidade superficial que está relacionada com o acúmulo de placa bacteriana nas superfícies dentais e dos materiais restauradores. Através de microscopia eletrônica de varredura, Koidis *et*

*al.* (1991) demonstraram que superfícies em porcelana, que continham margens irregulares acumularam menos placa bacteriana do que superfícies metálicas lisas. Para esses autores, a rugosidade superficial não é um fator predominante no processo inicial de acúmulo de placa bacteriana, mas outros fatores, como a ativação de mecanismos biológicos específicos, a inibição do crescimento da placa por elementos liberados pelo material e a interação da energia superficial livre, podem, também, influenciar esse acúmulo de placa bacteriana. Em contrapartida, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram o papel da rugosidade e da energia livre da superfície na formação de placa bacteriana supragengival. Quirynen & Bollen (1995) destacam que superfícies rugosas promovem a formação e a maturação de placa bacteriana e a alta energia superficial serve para facilitar a adesão e o acúmulo de placa bacteriana, selecionando bactérias específicas. Apesar de ambas variáveis terem interação com a outra, a influência da rugosidade superficial supera a da energia livre da superfície na formação de placa supragengival (Quirynen & Bollen, 1995). Sardin *et al.* (2004) concordam que a rugosidade superficial e a energia livre da superfície do substrato, bem como as características da superfícies da bactéria aderida, podem contribuir para o nível de correlação positiva da colonização microbiana e da maturação da placa bacteriana nas superfícies bucais.

De acordo com Sato (2003a), os métodos de identificação de bactérias da cavidade bucal são baseados em testes convencionais que incluem atividade metabólica e enzimática, que requerem tempo e trabalho e às vezes produzem

resultados inconsistentes. Allaker *et al.* (1998) enfatizam o uso de métodos de análise genética, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), para identificação de *S. mutans*, já que, comparando essa reação com a detecção em meio de cultura, verificaram que os métodos de cultura podem subestimar a presença de *S. mutans*, após a remoção do tecido cariado evidente. Pratten *et al.* (2003) destacam a aplicação das técnicas de PCR para identificar algumas bactérias associadas à cárie dental que não podem ser cultivadas usando técnicas tradicionais de plaqueamento em meio de cultura, o que englobaria aproximadamente 50% das bactérias existentes na cavidade bucal humana. Apesar da presença do DNA de bactérias do grupo mutans streptococci ser demonstrada pelo PCR, cabe salientar que essa técnica detecta fragmentos de DNA não só de bactérias viáveis, mas também de organismos mortos, além de ser difícil quantificar as bactérias nas amostras (Allaker *et al.*, 1998; Hirasawa & Takada, 2003).

Várias aplicações do método de PCR tem sido utilizadas para a identificação dessas espécies bacterianas. A técnica de PCR específica para algumas dessas espécies, baseada nas seqüências de genes da dextranase (Igarashi *et al.*, 1998) e glucosiltransferase (Oho *et al.*, 2000) tem sido desenvolvida e aplicada com sucesso para a identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Outras incluem o uso de *primers* aleatórios (AP-PCR) desenvolvidos por Saarela *et al.* (1996), ou ainda PCR em tempo real (Rupf *et al.*, 2003). Entretanto, quando se objetiva identificar várias espécies do grupo mutans streptococci, o

emprego de *primers* específicos torna-se difícil, devido ao desenvolvimento e preparo de diferentes *primers* e à necessidade de um grande número de reações de PCR com cada um deles (Sato *et al.*, 2003a).

Assim, o uso de *primers* universais para bactérias do grupo mutans streptococci, que se unem a seqüências do gene de RNA ribossômico 16S (Rupf *et al.*, 1999, Sato *et al.*, 2001), seguido da digestão dos produtos de amplificação com enzimas de restrição, é considerado por Sato *et al.* (2003a, 2003b) uma alternativa interessante, pois permite visualizar a presença dessas bactérias associadas à cárie dental. Os genes de rRNA 16S são altamente conservados dentro das espécies bacterianas e são amplamente utilizados como ferramenta na taxonomia de bactérias (Sato *et al.*, 2003b). Por isso, a análise baseada na seqüência dos genes rRNA 16S é considerada um padrão na identificação e detecção de bactérias bucais (Sato *et al.*, 2003b). *Primers* universais que amplificam genes de RNA ribossômico 16S foram utilizados por Robinson *et al.* (2003) para estudos de inserções e deleções cromossômicas em *S. mutans*. Também, esses *primers* universais foram utilizados por Kato *et al.* (2004) para mapear a distribuição de *S. mutans* e *S. sobrinus* na placa bacteriana desenvolvida *in situ*, em aparelhos utilizados por dez voluntários, durante três dias.

Na análise qualitativa através do PCR realizada neste estudo, utilizando os *primers* universais 8UA e 1492R para bactérias do grupo mutans streptococci (Sato *et al.*, 2001), que amplificam genes de RNA ribossômico 16S, constatou-se a presença de bactérias do grupo mutans streptococci nos corpos de prova



confeccionados com as três resinas compostas testadas, mantidos na cavidade bucal de voluntários pelo período de três dias, bem como nas amostras de saliva. Kato *et al.* (2004), em estudo sobre o mapeamento do padrão de distribuição de bactérias cariogênicas do grupo mutans streptococci na placa dental *in situ*, utilizando a técnica de PCR com os mesmos *primers* universais utilizados nesta pesquisa, também verificaram a presença de uma banda positiva em todas as camadas da placa dental, indicando a existência de bactérias desse grupo na placa.

Quando se analisou os perfis das amostras do mesmo voluntário, gerados pela digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP), verificou-se semelhança entre todos os corpos de prova, indicando que as resinas compostas Tetric Ceram, Durafill VS ou Filtek P60 e o tipo de superfície, lisa ou rugosa, não afetaram, significativamente, a composição da placa bacteriana acumulada nos corpos de prova. Este fato é concordante com o artigo de Konishi *et al.* (2003), que afirmou que, apesar de haver poucos estudos *in vivo* investigando a adesão bacteriana em materiais restauradores, esses trabalhos relatam que não houve diferença significativa na quantidade e/ou composição da flora bacteriana formada na superfície de diferentes materiais.

Na análise qualitativa através de PCR-RFLP, não houve diferença significativa entre os perfis das amostras bacterianas dos corpos de prova e daquelas coletadas da saliva de cada voluntário, o que sugere que a placa bacteriana acumulada nos materiais restauradores é semelhante àquela

encontrada na cavidade bucal, para os materiais testados e para o período de tempo de três dias. A saliva contém aproximadamente  $10^7$  a  $10^8$  células bacterianas / ml, a maioria derivada das superfícies intra-orais colonizadas (Arweiler *et al.*, 2004), o que leva a crer que a bactéria presente na saliva seja semelhante àquela acumulada nas superfícies dentais e dos materiais restauradores.

Outra observação feita no teste de PCR-RFLP foi a semelhança nas espécies de bactérias do grupo mutans streptococci presentes na microflora bucal entre os voluntários estudados, observada pelos perfis semelhantes gerados pela digestão com as enzimas de restrição. Para o voluntário 5, a presença de uma banda adicional no perfil sugere a presença de uma cepa adicional diferente de bactéria do grupo mutans streptococci. Essa variação nas espécies de bactérias do grupo entre voluntários de estudos *in situ* foi bem documentada por Kato *et al.* (2004). *S. mutans* foi detectado na placa bacteriana coletada de todos os 10 indivíduos estudados pelos autores, enquanto que *S. sobrinus* estava presente na placa de sete desses voluntários. Além disso, para os voluntários em que ambas as espécies foram encontradas, o padrão de distribuição de *S. mutans* nas camadas da placa foi semelhante ao de *S. sobrinus*. Em todas as camadas detectadas como positivas para bactérias do grupo mutans streptococci, foram encontradas apenas *S. mutans* ou as duas espécies. Em nenhuma camada, *S. sobrinus* foi detectado isoladamente. Cabe salientar que estudo de Kato *et al.*

(2004) também foi feito com a placa bacteriana coletada em aparelhos utilizados pelos voluntários durante três dias, como neste trabalho.

Os resultados deste estudo são de relevância clínica, já que Auschill *et al.* (2002) destacam que para obter sucesso com os materiais restauradores, deve-se considerar o profissional que está realizando a restauração, mas as diferenças nas propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais são também fatores relevantes que afetam a adesão dos microrganismos na superfície da restauração.

Para minimizar a rugosidade e, assim, evitar o acúmulo de placa bacteriana, procedimentos de acabamento e polimento são necessários, porque melhoram a estética, a forma e a função das restaurações (Paulillo *et al.*, 1997). Sua indicação deve ser a mais precisa possível, pois Reis *et al.* (2002) sugerem que cada compósito requer um sistema de acabamento e polimento específico, dependendo do tamanho, da dureza e quantidade de partículas de carga do compósito utilizado.

Para prevenir o acúmulo de placa bacteriana, especialmente a colonização de *S. mutans* em um material restaurador, é desejável a presença de uma superfície lisa e um efeito inibitório na adesão da bactéria por parte do material restaurador (Eick *et al.*, 2004). Devido à sua composição, as resinas compostas não afetam o desenvolvimento bacteriano, o que foi demonstrado por Karanika-Kouma *et al.* (2003), que não observaram atividade antibacteriana das

resinas compostas Tetric, Z100 e Sculp-it contra *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus salivarius* e *Actinomyces viscosus*. Boeckh *et al.* (2002) encontraram efeito inibitório contra *S. mutans* com o material à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE). Assim, resinas compostas que tenham a incorporação de materiais antibacterianos podem proporcionar efeito inibitório contra *S. mutans* (Tanagawa *et al.*, 1999) e podem ser usadas para prevenir cárie secundária freqüentemente observada ao redor das restaurações.

Finalmente, como foi sugerido por Wan *et al.* (2003), uma vez que a cárie dental é uma doença infecciosa, um método de prevenção dessa doença é a remoção das bactérias cariogênicas da cavidade bucal. A incorporação de metodologias da Biologia Molecular, particularmente a técnica de PCR-RFLP, permite que se conheça a qualidade da placa bacteriana formada nas superfícies dos materiais restauradores, através da identificação das bactérias presentes, bem como a relação das mesmas com os processos iniciais da cárie dental e, principalmente, das recidivas de cárie. O conceito de que as superfícies rugosas dos materiais restauradores acarretam um maior acúmulo da placa bacteriana permanece muito importante. Aliado a isso, a possibilidade de se identificar o grupo de bactérias que ali se encontra e sua relação com as doenças da cavidade bucal viabilizará a utilização de procedimentos preventivos de acordo com as necessidades individuais de cada paciente e a indicação do material restaurador, de acordo com o perfil de formação da placa bacteriana de cada paciente.



## 7. CONCLUSÃO

---

De acordo com os fatores avaliados nesta pesquisa e a metodologia empregada, os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Os corpos de prova com superfícies rugosas apresentaram maior acúmulo de placa bacteriana do que aqueles com superfícies lisas, independente da resina composta utilizada;
2. Entre os corpos de prova lisos, apesar de haver diferença estatística significativa na rugosidade superficial entre os compósitos, este fato não representou maior acúmulo de placa bacteriana no estudo *in situ*;
3. Na análise qualitativa através do PCR, utilizando os *primers* universais que amplificam genes de RNA ribossômico 16S, constatou-se a presença de bactérias do grupo mutans streptococci nos corpos de prova confeccionados com as três resinas compostas testadas, mantidos na cavidade bucal dos voluntários pelo período de três dias;
4. Verificou-se semelhança nos perfis gerados pela análise de PCR-RFLP das amostras dos voluntários, indicando que as resinas compostas Tetric Ceram, Durafill VS ou Filtek P60 e o tipo de superfície, lisa ou rugosa, não afetaram significativamente a composição da placa bacteriana acumulada nos corpos de prova, para o grupo mutans streptococci.



## REFERÊNCIAS \*

---

- Allaker RP, Seddon SV, Tredwin C, Lynch E. Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of the *spaP* gene in teeth rendered caries free. **J Dent.** 1998; 26: 443-5.
- Anusavice KJ. **Phillips materiais dentários**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 412p.
- Arends J, Christoffersen J, Christoffersen MR, Ogaard B, Dijkman AG, Jongebloed WL. Rate and mechanism of enamel demineralization *in situ*. **Caries Res.** 1992; 26: 18-21.
- Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM. Individual vitality pattern of *in situ* dental biofilms at different locations in the oral cavity. **Caries Res.** 2004; 38: 442-7.
- Atlas RM, Bej AK. Polymerase chain reaction. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR. (ed.) **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology; 1994. cap. 19, p. 418-35.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.



- Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. **Eur J Oral Sci.** 2002; 110: 48-53.
- Benelli EM, Serra MC, Rodrigues JR, Cury JA. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res.** 1993; 27: 280-4.
- Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials *in vitro*. **Caries Res.** 2002; 36: 101-7.
- Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard material to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. **Dent Mater.** 1997; 13: 258-69.
- Brown TA. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução.** Porto Alegre: Artmed; 2003. 376p.
- Chung KH. Effects of finishing and polishing procedures on the surface texture of resin composites. **Dent Mater.** 1994; 10: 325-30.
- Cury JA, Mambrin SCT, Gazal W. *In situ* models to study dental and/or calculus inhibition. **J Dent Res.** 1994; 73: 424. [Abstract, 2579].
- 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.
- Featherstone JDB & Zero DT. An *in situ* model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. **J Dent Res.** 1992; 71: 804-10. [Spec. Issue].

- Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol.** 1973; 18: 1357-64.
- Hirasawa M & Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. **Caries Res.** 2003; 37: 212-7.
- Hoelscher DC, Neme AML, Pink FE, Hughes PJ. The effect of three finishing systems on four esthetic restorative materials. **Oper Dent.** 1998; 23: 36-42.
- Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. Polymerase chain reaction for identification of oral streptococci: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei* and *Streptococcus salivarius*. **J Microbiol Methods.** 1998; 34: 81-88.
- Jenkins GN. **The physiology and biochemistry of the mouth.** 4.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1978. 599p.
- Joniot SB, Grégoire GL, Authier AM, Roques YM. Three-dimensional optical profilometry analysis of surface states obtained after finishing sequences for three composite resins. **Oper Dent.** 2000; 25: 311-5.
- Karanika-Kouma A, Dionysopoulos P, Koliniotou-Koubia E, Kolokotronis A. Antibacterial properties of dentin bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resins. **J Oral Rehabil.** 2001; 28: 157-60.
- Kato K, Sato T, Takahashi N, Yamamoto K, Nakagaki H. A method for mapping the distribution pattern of cariogenic streptococci within dental plaque *in vivo*. **Caries Res.** 2004; 38: 448-53.

- Koidis PT, Schroeder K, Johnston W, Campagni W. Color consistency, plaque accumulation, and external marginal surface characteristics of the collarless metal-ceramic restoration. **J Prosth Dent.** 1991; 65(3): 391-400.
- Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M. Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. **J Oral Rehabil.** 2003; 30: 790-5.
- Koulourides T & Chien MC. The ICT *in situ* experimental model in dental research. **J Dent Res.** 1992; 71: 822-7. [Spec. Issue].
- Leite Jr. FHC. **Avaliação do acúmulo de placa bacteriana in situ e da rugosidade superficial in vitro em resinas compostas modificadas por poliácidos submetidas a acabamento e polimento.** Piracicaba; 2001. 113p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- Lutz F & Phillips RW. A classification and evaluation of composite resin system. **J Prosth Dent.** 1983; 50: 480-8.
- Magalhães CS. **Estudo in situ da rugosidade superficial de materiais híbridos de ionômero de vidro e resina composta submetidos a procedimentos de acabamento e polimento em função do tempo de permanência na cavidade bucal.** Piracicaba; 2000. 110p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res.** 2001; 35: 397-406.

- Mendonça CCL. ***Avaliação da rugosidade in vitro, e da formação de placa in situ, em superfícies cerâmicas submetidas a acabamento e polimento.*** Piracicaba; 1999. 119p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
- Nelson DL & Cox MM. ***Lehninger principles of biochemistry.*** 3.ed. New York: Worth Publishers; 2000. 1152p.
- Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T. 2000. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. ***Oral Microbiol Immunol.*** 2000; 15: 258-62.
- Oshima HMS & Conceição EN. Materiais restauradores diretos. In: Conceição, EN. (ed.) ***Dentística: saúde e estética.*** Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000. cap. 9, p. 115-25.
- Paulillo LAMS, Coradazzi JL, Lovadino JR, Serra MC. Surface finishing of glass ionomer. ***Amer J Dent.*** 1997; 10: 137-40.
- Pratten J, Wilson M, Spratt DA. Characterization of *in vitro* oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods. ***Oral Microbiol Immunol.*** 2003;18: 45-9.
- Proskin HM. Statistical considerations related to intra-oral studies. ***J Dent Res.*** 1992; 71: 901-4. [Spec. Issue].
- Quirynen M & Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man: a review of the literature. ***J Clin Periodontol.*** 1995; 22: 1-14.

- Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, Van Steenberghe D. The influence of surface-free energy and surface roughness on early plaque formation: an *in vivo* study in man. **J Clin Periodontol.** 1990;17:138-44.
- Reis AF, Giannini M, Lovadino, JR. The effect of six polishing systems on the surface roughness of two packable resin-based composites. **Amer J Dent.** 2002; 15: 193-7.
- Robinson WG, Old LA, Shah DSH, Russell RRB. Chromosomal insertions and deletions in *Streptococcus mutans*. **Caries Res.** 2003; 37:148-56.
- Rupf S, Merte K, Eschrich K. Quantification of bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. **J Dent Res.** 1999; 78(4): 850-6.
- Rupf S, Merte K, Kneist S, Al-Roaiy S, Eschrich K. Comparison of different techniques of quantitative PCR for determination of *Streptococcus mutans* counts in saliva samples. **Oral Microbiol Immunol.** 2003; 18: 50-3.
- Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S. Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol.** 1996; 41 (8/9): 821-6.
- Sardin S, Morrier J-J, Benay G, Barsotti O. *In vitro* streptococcal adherence on prosthetic and implant materials. Interactions with physicochemical surface properties. **J Oral Rehabil.** 2004; 31: 140-8.
- Sato T, Hu JP, Matsuyama J, Takahashi N. Rapid identification of cariogenic bacteria by 16S rRNA genes PCR-RFLP analysis. **Cariology Today.** 2001; 2: 8-12.

- Sato T, Hu JP, Ohki K, Yamaura M, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. ***Oral Microbiol Immunol.*** 2003a; 18: 323-6.
- Sato T, Matsuyama J, Kumagai T, Mayanagi G, Yamaura M, Washio J, Takahashi N. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. ***Lett Appl Microbiol.*** 2003b; 37: 66-9.
- Stoddard JW & Johnson GH. An evaluation of polishing agents for composite resins. ***J Prosth Dent.*** 1991; 65: 491-5.
- Tanagawa M, Yoshida K, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M. Inhibitory effect of antibacterial resin composite against *Streptococcus mutans*. ***Caries Res.*** 1999; 33: 366-71.
- Ten Cate JM. Patient selection and appliance design in intra-oral models. ***J Dent Res.*** 1992; 71: 908-10. [Spec. Issue].
- Van Noort R & Davis LG. The surface finish of composite resin restorative materials. ***Br Dent J.*** 1984; 157: 360-4.
- Waerhaug J. Effect of rough surfaces upon gingival tissue. ***J Dent Res.*** 1956; 35(2): 323-5.
- Wan AKL, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. ***J Dent Res.*** 2003; 82(7):504-8.
- Wilson F, Heath JR, Watts DC. Finishing composite restorative materials. ***J Oral Rehabil.*** 1990; 17: 79-87.

Zalkind MM, Keisar O, Ever-Hadani P, Grinberg R, Sela MN. Accumulation of *Streptococcus mutans* on light-cured composites and amalgam: an *in vitro* study. **J Esthet Dent.** 1998; 19(4): 187-90.

Zee KY, Samaranayake LP, Attström R. Scanning electron microscopy of microbial colonization of 'rapid' and 'slow' dental plaque formers *in vivo*. **Arch Oral Biol.** 1997; 42: 735-42.

# ANEXOS

---

## ANEXO 1

### TERMO DE CONSENTIMENTO PARA TRATAMENTO E PESQUISA

Por este instrumento particular declaro, para efeitos éticos e legais, que eu (nome)

\_\_\_\_\_,  
(nacionalidade)\_\_\_\_\_, (profissão)\_\_\_\_\_, portador(a) do  
R.G.\_\_\_\_\_, C.I.C.\_\_\_\_\_, residente e domiciliado(a) à  
\_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_,  
Estado \_\_\_\_\_, concordo com absoluta consciência dos procedimentos a que vou  
me submeter para a realização da fase experimental da tese de Doutorado do curso de Clínica  
Odontológica - área de concentração Dentística, sob responsabilidade do aluno Fernão Helio de  
Campos Leite Junior, R.G. 7.569.489-X, nos termos abaixo relacionados:

1. Esclareço que recebi todas as informações sobre minha participação nesse experimento, possuindo plena liberdade para me abster em participar da referida pesquisa em qualquer momento, sem prejuízo financeiro, hierárquico ou de qualquer natureza;
2. Esclareço também, que fui amplamente informado por um profissional que não está envolvido na pesquisa, sobre os possíveis benefícios e riscos aos quais estou me submetendo durante este experimento, tomando conhecimento de que o meu consentimento não exime a responsabilidade do profissional que está executando a pesquisa;
3. Todas essas normas estão de acordo com a Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

Por estar de pleno acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2003.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do profissional que efetuou o esclarecimento ao voluntário





## **ANEXO 2**

### **INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS VOLUNTÁRIOS DA PESQUISA**

#### **Análise quantitativa e qualitativa do acúmulo de placa bacteriana *in situ* em resinas compostas**

##### **OBJETIVO DA PESQUISA**

O objetivo desta pesquisa é avaliar a influência da rugosidade superficial no acúmulo de placa bacteriana *in situ* em resinas compostas com diferentes partículas de carga, através da quantificação por meio de espectrofotometria e da comparação pela técnica da reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”- PCR).

##### **RESUMO DA PESQUISA**

O tamanho das partículas de carga das resinas compostas tem relação direta com a rugosidade superficial. Um dos parâmetros na avaliação de uma restauração com compósitos é a superfície que pode influenciar o acúmulo de placa bacteriana. Entre os microorganismos que colonizam a placa, bactérias do grupo mutans streptococci estão associadas à cárie dental, atuando na desmineralização dos tecidos. O objetivo desta pesquisa é avaliar a influência da rugosidade superficial no acúmulo de placa bacteriana *in situ* em resinas compostas com diferentes partículas de carga, através da quantificação por meio de espectrofotometria e da comparação pela técnica da reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”- PCR). Serão confeccionados corpos de prova cilíndricos com os compósitos: Durafill VS, Tetric Ceram e Filtek P60, apresentando duas superfícies: rugosas e não rugosas, produzidas, respectivamente, pela fotopolimerização do compósito em contato com a tira matriz de poliéster e pelos Discos Sof-Lex de granulação grossa. Para a avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, serão selecionados dez voluntários, para

os quais será obtido o modelo em gesso pedra dos arcos superior e inferior, através da moldagem anatômica com alginato. Por meio desse modelo, será confeccionado um dispositivo intra-bucal palatino em acrílico, onde serão fixados seis corpos de prova correspondentes aos grupos experimentais, de maneira que fiquem posicionados a um milímetro da superfície da resina, para promover a retenção da placa bacteriana. Um total de sete ciclos de formação de placa bacteriana será realizado, sendo seis para a quantificação da placa bacteriana e um para a análise qualitativa. Em cada ciclo, os voluntários utilizarão o dispositivo com os corpos de prova por três dias na semana e, no quarto dia, a placa formada sobre cada corpo de prova será extraída em NaOH 1,0M e quantificada em espectrofotômetro. Na análise qualitativa, a placa bacteriana acumulada sobre os corpos de prova terá o DNA extraído e comparado através da amplificação utilizando primers universais.

#### INFORMAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Os voluntários assinarão um termo de consentimento, e, nos termos deste documento, terão liberdade para desistir da pesquisa a qualquer momento.

Servirão como critério para recrutamento de voluntários:

- Indivíduos saudáveis;
- Com idade entre 18 e 30 anos
- Apresentando adequado controle de placa bacteriana
- Baixa atividade de cárie
- Fluxo salivar normal

Servirão como critério para exclusão da amostra:

- Voluntárias em período de gestação;
- Voluntários com atividade de cárie, gengivite ou doença periodontal;
- Voluntários que apresentem patologias locais ou sistêmicas;
- Voluntários que não colaborarem com os termos da pesquisa.

Os voluntários deverão seguir as instruções fornecidas, comparecendo ao laboratório de Dentística nos horários e datas pré-estabelecidas. Os voluntários deverão manter as informações da corrente pesquisa em segredo até a mesma ser finalizada e publicada em periódico especializado.

O experimento será realizado durante 7 semanas, dentre as quais cada voluntário utilizará a placa palatina por três dias, seguindo o cronograma estabelecido no início do experimento.

Para que se possa obter resultados confiáveis e que não ofereça qualquer tipo de risco, cada voluntário deve seguir minuciosamente todas as recomendações a seguir:

1. Iniciar a realização de higiene bucal habitual reforçada com dentifrício padronizado que será fornecido, com uma semana de antecedência ao início do experimento.
2. Durante o experimento, a placa palatina só poderá ser escovada em sua parte interna, ou seja aquela que se encontra em contato com o palato.
3. O dispositivo intra-bucal deverá ser removido somente durante as refeições, e nestas ocasiões, deverá ser mantido em local úmido e fechado. Para isto, será fornecido um porta aparelho e a placa palatina deverá ser então envolvida com gaze molhado, tornando o ambiente úmido.
4. Sempre no quarto dia após a utilização da placa palatina, o voluntário deverá comparecer ao laboratório de Dentística, pela manhã, para que seja entregue ao responsável pela pesquisa, para realização da quantificação de placa bacteriana.
5. Caso haja dúvidas, estas serão esclarecidas no telefone (43) 9995-6248, pelo responsável da pesquisa, Fernão Helio de Campos Leite Jr.

## CRONOGRAMA

| Etapa                                | Semana | Data |
|--------------------------------------|--------|------|
| Moldagem                             |        |      |
| Instalação do experimento - 1ª etapa |        |      |
| Quantificação de placa               | 1      |      |
| Quantificação de placa               | 2      |      |
| Quantificação de placa               | 3      |      |
| Quantificação de placa               | 4      |      |
| Quantificação de placa               | 5      |      |
| Quantificação de placa               | 6      |      |
| Instalação do experimento - 2ª etapa |        |      |
| Análise qualitativa de placa         | 7      |      |

## RISCOS E BENEFÍCIOS DECORRENTES DA INSTALAÇÃO DA PESQUISA

Pesquisas *in situ* têm sido amplamente utilizadas por possibilitarem a reprodução das condições da cavidade bucal. Quando bem delineadas, não apresentam risco algum aos voluntários que se dispõem a participar, a não ser uma discreta halitose durante o período experimental, que pode ser atenuado com adequada higiene bucal, bem como limpeza da parte interna do dispositivo. Estudos utilizando dispositivos intra-bucais são reconhecidos internacionalmente e têm sido utilizados desde 1964. Os aparelhos serão adequadamente polidos, especialmente em suas margens e arestas, a fim de se evitar o acúmulo de placa bacteriana e conseqüentemente, alterações nos tecidos gengivais. Durante a fase de instalação dos aparelhos intra-bucais, qualquer desconforto relatado pelo

voluntário será diagnosticado e removido, para que a causa da irritação ser prontamente eliminada.

Outro fator que reforça a preocupação ética dos pesquisadores com os voluntários da pesquisa é a manutenção e orientação dos hábitos de higiene bucal, fornecendo dentifrício fluoretado para todo o período de duração da pesquisa, além de continuarem ingerindo água de abastecimento, que é fluoretada.

Sabe-se que a cárie dental é uma doença multifatorial que está ligada diretamente com o risco individual de cada paciente. Assim, o presente estudo preocupou-se em excluir da amostra voluntários com média e alta atividade de cárie. Outro fator a se destacar é que os voluntários são estudantes da área de odontologia, portanto possuem maiores cuidados com a higiene bucal.

Nenhum benefício direto será oferecido aos voluntários desta pesquisa. Porém, os benefícios poderão ser evidenciados diretamente, pela determinação de sistemas de acabamento e polimento que possam tornar a superfície lisa e, conseqüentemente, diminuir o acúmulo de placa bacteriana.

## FORMAS DE RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

Não está prevista nenhuma forma de ressarcimento ou indenização aos participantes da pesquisa, já que os voluntários serão alunos de graduação do Curso de Odontologia da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, em Londrina - PR, não necessitando de deslocamento até o local da pesquisa. Além disso, não será efetuado nenhum procedimento que cause dano ou alteração permanente aos indivíduos.



## ANEXO 3

### Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Norte do Paraná

PARECER CEP/UNOPAR

PROTOCOLO: 1373/03

AUTOR: *Fernão Hélio de Campos Leite Júnior*

O Comitê de Ética em Pesquisa da Unopar analisou e APROVOU o projeto: ***"Análise quantitativa e qualitativa do acúmulo de placa bacteriana in situ em resinas compostas"***.

Informamos que deverá ser comunicado, por escrito, qualquer modificação que ocorrer no desenvolvimento da pesquisa e que deverá ser encaminhado a este Comitê, relatório final da pesquisa.

Londrina, 03 de dezembro de 2004

A handwritten signature in blue ink, enclosed within a circular stamp.

Prof. Dr. Aloísio José Antunes  
Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR





## ANEXO 4

Dados originais obtidos no experimento de avaliação da rugosidade superficial *in vitro*, obtidos pela leitura em rugosímetro.

| superfície | material     | corpo de prova | Ra ( $\mu\text{m}$ ) |
|------------|--------------|----------------|----------------------|
| lisa       | Filtek P60   | 1              | 0,466                |
| lisa       | Filtek P60   | 2              | 0,349                |
| lisa       | Filtek P60   | 3              | 0,260                |
| lisa       | Filtek P60   | 4              | 0,160                |
| lisa       | Filtek P60   | 5              | 0,245                |
| lisa       | Tetric Ceram | 1              | 0,354                |
| lisa       | Tetric Ceram | 2              | 0,214                |
| lisa       | Tetric Ceram | 3              | 0,368                |
| lisa       | Tetric Ceram | 4              | 0,319                |
| lisa       | Tetric Ceram | 5              | 0,304                |
| lisa       | Durafill VS  | 1              | 0,119                |
| lisa       | Durafill VS  | 2              | 0,091                |
| lisa       | Durafill VS  | 3              | 0,113                |
| lisa       | Durafill VS  | 4              | 0,127                |
| lisa       | Durafill VS  | 5              | 0,131                |
| rugosa     | Filtek P60   | 1              | 1,185                |
| rugosa     | Filtek P60   | 2              | 1,478                |
| rugosa     | Filtek P60   | 3              | 1,380                |
| rugosa     | Filtek P60   | 4              | 1,764                |
| rugosa     | Filtek P60   | 5              | 1,681                |
| rugosa     | Tetric Ceram | 1              | 1,477                |
| rugosa     | Tetric Ceram | 2              | 1,344                |
| rugosa     | Tetric Ceram | 3              | 1,485                |
| rugosa     | Tetric Ceram | 4              | 1,643                |
| rugosa     | Tetric Ceram | 5              | 1,443                |
| rugosa     | Durafill VS  | 1              | 1,278                |
| rugosa     | Durafill VS  | 2              | 1,497                |
| rugosa     | Durafill VS  | 3              | 1,594                |
| rugosa     | Durafill VS  | 4              | 1,732                |
| rugosa     | Durafill VS  | 5              | 1,565                |



## ANEXO 5

Dados originais obtidos no experimento de avaliação do acúmulo de placa bacteriana *in situ*, pela quantificação da placa em espectrofotômetro.

| semana | voluntário | superfície | material | absorbância |
|--------|------------|------------|----------|-------------|
| 1      | 1          | 2          | 1        | 0,861       |
| 1      | 1          | 1          | 2        | 0,378       |
| 1      | 1          | 1          | 3        | 1,075       |
| 1      | 1          | 2          | 2        | 0,369       |
| 1      | 1          | 2          | 3        | 0,86        |
| 1      | 1          | 1          | 1        | 0,797       |
| 1      | 2          | 2          | 1        | 0,586       |
| 1      | 2          | 1          | 2        | 0,488       |
| 1      | 2          | 1          | 3        | 0,694       |
| 1      | 2          | 2          | 2        | 0,541       |
| 1      | 2          | 2          | 3        | 2,333       |
| 1      | 2          | 1          | 1        | 0,96        |
| 1      | 3          | 2          | 1        | 0,893       |
| 1      | 3          | 1          | 2        | 0,899       |
| 1      | 3          | 1          | 3        | 0,563       |
| 1      | 3          | 2          | 2        | 0,961       |
| 1      | 3          | 2          | 3        | 0,928       |
| 1      | 3          | 1          | 1        | 0,459       |
| 1      | 4          | 2          | 1        | 0,755       |
| 1      | 4          | 1          | 2        | 0,683       |
| 1      | 4          | 1          | 3        | 0,549       |
| 1      | 4          | 2          | 2        | 0,324       |
| 1      | 4          | 2          | 3        | 1,283       |
| 1      | 4          | 1          | 1        | 0,533       |
| 1      | 5          | 2          | 1        | 1,783       |
| 1      | 5          | 1          | 2        | 0,822       |
| 1      | 5          | 1          | 3        | 0,849       |
| 1      | 5          | 2          | 2        | 0,477       |
| 1      | 5          | 2          | 3        | 1,281       |
| 1      | 5          | 1          | 1        | 0,548       |
| 1      | 6          | 2          | 1        | 0,503       |
| 1      | 6          | 1          | 2        | 0,127       |
| 1      | 6          | 1          | 3        | 0,477       |
| 1      | 6          | 2          | 2        | 0,831       |
| 1      | 6          | 2          | 3        | 0,468       |
| 1      | 6          | 1          | 1        | 0,524       |
| 1      | 7          | 2          | 1        | 1,082       |
| 1      | 7          | 1          | 2        | 1,039       |
| 1      | 7          | 1          | 3        | 1,148       |
| 1      | 7          | 2          | 2        | 1,085       |
| 1      | 7          | 2          | 3        | 0,749       |
| 1      | 7          | 1          | 1        | 0,584       |
| 1      | 8          | 2          | 1        | 0,934       |

| semana | voluntário | superfície | material | absorvância |
|--------|------------|------------|----------|-------------|
| 1      | 8          | 1          | 2        | 0,573       |
| 1      | 8          | 1          | 3        | 0,741       |
| 1      | 8          | 2          | 2        | 1,08        |
| 1      | 8          | 2          | 3        | 1,301       |
| 1      | 8          | 1          | 1        | 2,043       |
| 1      | 9          | 2          | 1        | 0,361       |
| 1      | 9          | 1          | 2        | 0,272       |
| 1      | 9          | 1          | 3        | 0,306       |
| 1      | 9          | 2          | 2        | 0,207       |
| 1      | 9          | 2          | 3        | 0,385       |
| 1      | 9          | 1          | 1        | 0,489       |
| 1      | 10         | 2          | 1        | 1,009       |
| 1      | 10         | 1          | 2        | 0,53        |
| 1      | 10         | 1          | 3        | 0,422       |
| 1      | 10         | 2          | 2        | 0,481       |
| 1      | 10         | 2          | 3        | 0,487       |
| 1      | 10         | 1          | 1        | 0,57        |
| 2      | 1          | 1          | 1        | 0,52        |
| 2      | 1          | 2          | 1        | 0,342       |
| 2      | 1          | 1          | 2        | 0,352       |
| 2      | 1          | 1          | 3        | 0,407       |
| 2      | 1          | 2          | 2        | 0,369       |
| 2      | 1          | 2          | 3        | 0,315       |
| 2      | 2          | 1          | 1        | 0,493       |
| 2      | 2          | 2          | 1        | 0,526       |
| 2      | 2          | 1          | 2        | 0,354       |
| 2      | 2          | 1          | 3        | 0,417       |
| 2      | 2          | 2          | 2        | 0,513       |
| 2      | 2          | 2          | 3        | 0,27        |
| 2      | 3          | 1          | 1        | 0,678       |
| 2      | 3          | 2          | 1        | 0,834       |
| 2      | 3          | 1          | 2        | 0,405       |
| 2      | 3          | 1          | 3        | 0,379       |
| 2      | 3          | 2          | 2        | 0,381       |
| 2      | 3          | 2          | 3        | 0,263       |
| 2      | 4          | 1          | 1        | 0,839       |
| 2      | 4          | 2          | 1        | 0,361       |
| 2      | 4          | 1          | 2        | 0,403       |
| 2      | 4          | 1          | 3        | 0,463       |
| 2      | 4          | 2          | 2        | 0,351       |
| 2      | 4          | 2          | 3        | 0,334       |
| 2      | 5          | 1          | 1        | 0,704       |
| 2      | 5          | 2          | 1        | 0,444       |
| 2      | 5          | 1          | 2        | 0,419       |
| 2      | 5          | 1          | 3        | 0,595       |
| 2      | 5          | 2          | 2        | 1,946       |
| 2      | 5          | 2          | 3        | 0,825       |
| 2      | 6          | 1          | 1        | 0,285       |
| 2      | 6          | 2          | 1        | 0,226       |
| 2      | 6          | 1          | 2        | 0,138       |

| semana | voluntário | superfície | material | absorvância |
|--------|------------|------------|----------|-------------|
| 2      | 6          | 1          | 3        | 0,535       |
| 2      | 6          | 2          | 2        | 0,208       |
| 2      | 6          | 2          | 3        | 0,52        |
| 2      | 7          | 1          | 1        | 0,606       |
| 2      | 7          | 2          | 1        | 0,598       |
| 2      | 7          | 1          | 2        | 0,437       |
| 2      | 7          | 1          | 3        | 0,66        |
| 2      | 7          | 2          | 2        | 0,328       |
| 2      | 7          | 2          | 3        | 0,366       |
| 2      | 8          | 1          | 1        | 0,582       |
| 2      | 8          | 2          | 1        | 0,689       |
| 2      | 8          | 1          | 2        | 0,673       |
| 2      | 8          | 1          | 3        | 2,015       |
| 2      | 8          | 2          | 2        | 0,51        |
| 2      | 8          | 2          | 3        | 0,668       |
| 2      | 9          | 1          | 1        | 0,264       |
| 2      | 9          | 2          | 1        | 0,267       |
| 2      | 9          | 1          | 2        | 0,291       |
| 2      | 9          | 1          | 3        | 0,264       |
| 2      | 9          | 2          | 2        | 0,258       |
| 2      | 9          | 2          | 3        | 0,358       |
| 2      | 10         | 1          | 1        | 0,451       |
| 2      | 10         | 2          | 1        | 0,598       |
| 2      | 10         | 1          | 2        | 0,488       |
| 2      | 10         | 1          | 3        | 0,637       |
| 2      | 10         | 2          | 2        | 0,707       |
| 2      | 10         | 2          | 3        | 0,545       |
| 3      | 1          | 2          | 3        | 1,067       |
| 3      | 1          | 1          | 1        | 1,048       |
| 3      | 1          | 2          | 1        | 1,156       |
| 3      | 1          | 1          | 2        | 0,902       |
| 3      | 1          | 1          | 3        | 1,028       |
| 3      | 1          | 2          | 2        | 0,99        |
| 3      | 2          | 2          | 3        | 1,154       |
| 3      | 2          | 1          | 1        | 1,052       |
| 3      | 2          | 2          | 1        | 0,9         |
| 3      | 2          | 1          | 2        | 0,792       |
| 3      | 2          | 1          | 3        | 1,298       |
| 3      | 2          | 2          | 2        | 1,246       |
| 3      | 3          | 2          | 3        | 1,654       |
| 3      | 3          | 1          | 1        | 2,374       |
| 3      | 3          | 2          | 1        | 0,938       |
| 3      | 3          | 1          | 2        | 1,234       |
| 3      | 3          | 1          | 3        | 0,639       |
| 3      | 3          | 2          | 2        | 0,483       |
| 3      | 4          | 2          | 3        | 1,622       |
| 3      | 4          | 1          | 1        | 0,826       |
| 3      | 4          | 2          | 1        | 0,758       |
| 3      | 4          | 1          | 2        | 0,61        |
| 3      | 4          | 1          | 3        | 0,41        |

| semana | voluntário | superfície | material | absorvância |
|--------|------------|------------|----------|-------------|
| 3      | 4          | 2          | 2        | 0,63        |
| 3      | 5          | 2          | 3        | 1,124       |
| 3      | 5          | 1          | 1        | 0,786       |
| 3      | 5          | 2          | 1        | 0,604       |
| 3      | 5          | 1          | 2        | 0,635       |
| 3      | 5          | 1          | 3        | 0,874       |
| 3      | 5          | 2          | 2        | 1,035       |
| 3      | 6          | 2          | 3        | 0,708       |
| 3      | 6          | 1          | 1        | 0,519       |
| 3      | 6          | 2          | 1        | 0,55        |
| 3      | 6          | 1          | 2        | 0,603       |
| 3      | 6          | 1          | 3        | 0,464       |
| 3      | 6          | 2          | 2        | 0,621       |
| 3      | 7          | 2          | 3        | 1,842       |
| 3      | 7          | 1          | 1        | 0,539       |
| 3      | 7          | 2          | 1        | 0,568       |
| 3      | 7          | 1          | 2        | 1,005       |
| 3      | 7          | 1          | 3        | 0,591       |
| 3      | 7          | 2          | 2        | 0,963       |
| 3      | 8          | 2          | 3        | 0,853       |
| 3      | 8          | 1          | 1        | 0,503       |
| 3      | 8          | 2          | 1        | 0,866       |
| 3      | 8          | 1          | 2        | 1,19        |
| 3      | 8          | 1          | 3        | 0,854       |
| 3      | 8          | 2          | 2        | 0,753       |
| 3      | 9          | 2          | 3        | 0,42        |
| 3      | 9          | 1          | 1        | 0,554       |
| 3      | 9          | 2          | 1        | 0,413       |
| 3      | 9          | 1          | 2        | 0,4         |
| 3      | 9          | 1          | 3        | 0,449       |
| 3      | 9          | 2          | 2        | 0,362       |
| 3      | 10         | 2          | 3        | 0,857       |
| 3      | 10         | 1          | 1        | 0,743       |
| 3      | 10         | 2          | 1        | 0,594       |
| 3      | 10         | 1          | 2        | 0,527       |
| 3      | 10         | 1          | 3        | 0,773       |
| 3      | 10         | 2          | 2        | 0,99        |
| 4      | 1          | 2          | 2        | 0,45        |
| 4      | 1          | 2          | 3        | 0,933       |
| 4      | 1          | 1          | 1        | 0,185       |
| 4      | 1          | 2          | 1        | 0,321       |
| 4      | 1          | 1          | 2        | 0,322       |
| 4      | 1          | 1          | 3        | 0,272       |
| 4      | 2          | 2          | 2        | 0,59        |
| 4      | 2          | 2          | 3        | 0,397       |
| 4      | 2          | 1          | 1        | 0,334       |
| 4      | 2          | 2          | 1        | 0,482       |
| 4      | 2          | 1          | 2        | 0,379       |
| 4      | 2          | 1          | 3        | 0,38        |
| 4      | 3          | 2          | 2        | 2,29        |

| semana | voluntário | superfície | material | absorvância |
|--------|------------|------------|----------|-------------|
| 4      | 3          | 2          | 3        | 1,473       |
| 4      | 3          | 1          | 1        | 0,466       |
| 4      | 3          | 2          | 1        | 0,49        |
| 4      | 3          | 1          | 2        | 0,298       |
| 4      | 3          | 1          | 3        | 0,458       |
| 4      | 4          | 2          | 2        | 1,751       |
| 4      | 4          | 2          | 3        | 0,196       |
| 4      | 4          | 1          | 1        | 0,26        |
| 4      | 4          | 2          | 1        | 0,237       |
| 4      | 4          | 1          | 2        | 0,272       |
| 4      | 4          | 1          | 3        | 0,244       |
| 4      | 5          | 2          | 2        | 0,954       |
| 4      | 5          | 2          | 3        | 0,307       |
| 4      | 5          | 1          | 1        | 0,372       |
| 4      | 5          | 2          | 1        | 0,278       |
| 4      | 5          | 1          | 2        | 0,844       |
| 4      | 5          | 1          | 3        | 0,347       |
| 4      | 6          | 2          | 2        | 0,528       |
| 4      | 6          | 2          | 3        | 0,599       |
| 4      | 6          | 1          | 1        | 1,108       |
| 4      | 6          | 2          | 1        | 1,191       |
| 4      | 6          | 1          | 2        | 1,208       |
| 4      | 6          | 1          | 3        | 0,625       |
| 4      | 7          | 2          | 2        | 1,961       |
| 4      | 7          | 2          | 3        | 0,343       |
| 4      | 7          | 1          | 1        | 0,637       |
| 4      | 7          | 2          | 1        | 0,353       |
| 4      | 7          | 1          | 2        | 0,296       |
| 4      | 7          | 1          | 3        | 0,429       |
| 4      | 8          | 2          | 2        | 0,31        |
| 4      | 8          | 2          | 3        | 0,478       |
| 4      | 8          | 1          | 1        | 0,199       |
| 4      | 8          | 2          | 1        | 0,217       |
| 4      | 8          | 1          | 2        | 0,949       |
| 4      | 8          | 1          | 3        | 0,316       |
| 4      | 9          | 2          | 2        | 1,886       |
| 4      | 9          | 2          | 3        | 0,243       |
| 4      | 9          | 1          | 1        | 0,364       |
| 4      | 9          | 2          | 1        | 1,921       |
| 4      | 9          | 1          | 2        | 1,082       |
| 4      | 9          | 1          | 3        | 0,264       |
| 4      | 10         | 2          | 2        | 1,831       |
| 4      | 10         | 2          | 3        | 1,245       |
| 4      | 10         | 1          | 1        | 0,416       |
| 4      | 10         | 2          | 1        | 0,704       |
| 4      | 10         | 1          | 2        | 0,519       |
| 4      | 10         | 1          | 3        | 0,324       |
| 5      | 1          | 1          | 3        | 0,297       |
| 5      | 1          | 2          | 2        | 0,458       |
| 5      | 1          | 2          | 3        | 0,218       |



| semana | voluntário | superfície | material | absorância |
|--------|------------|------------|----------|------------|
| 5      | 1          | 1          | 1        | 0,324      |
| 5      | 1          | 2          | 1        | 0,126      |
| 5      | 1          | 1          | 2        | 0,319      |
| 5      | 2          | 1          | 3        | 0,293      |
| 5      | 2          | 2          | 2        | 0,416      |
| 5      | 2          | 2          | 3        | 0,435      |
| 5      | 2          | 1          | 1        | 0,265      |
| 5      | 2          | 2          | 1        | 0,55       |
| 5      | 2          | 1          | 2        | 0,171      |
| 5      | 3          | 1          | 3        | 0,14       |
| 5      | 3          | 2          | 2        | 0,146      |
| 5      | 3          | 2          | 3        | 1,595      |
| 5      | 3          | 1          | 1        | 0,577      |
| 5      | 3          | 2          | 1        | 0,164      |
| 5      | 3          | 1          | 2        | 0,327      |
| 5      | 4          | 1          | 3        | 0,715      |
| 5      | 4          | 2          | 2        | 0,235      |
| 5      | 4          | 2          | 3        | 0,398      |
| 5      | 4          | 1          | 1        | 0,217      |
| 5      | 4          | 2          | 1        | 0,197      |
| 5      | 4          | 1          | 2        | 0,205      |
| 5      | 5          | 1          | 3        | 0,419      |
| 5      | 5          | 2          | 2        | 0,63       |
| 5      | 5          | 2          | 3        | 1,249      |
| 5      | 5          | 1          | 1        | 0,677      |
| 5      | 5          | 2          | 1        | 1,817      |
| 5      | 5          | 1          | 2        | 0,999      |
| 5      | 6          | 1          | 3        | 0,951      |
| 5      | 6          | 2          | 2        | 1,414      |
| 5      | 6          | 2          | 3        | 0,92       |
| 5      | 6          | 1          | 1        | 0,141      |
| 5      | 6          | 2          | 1        | 0,632      |
| 5      | 6          | 1          | 2        | 1,171      |
| 5      | 7          | 1          | 3        | 1,217      |
| 5      | 7          | 2          | 2        | 1,758      |
| 5      | 7          | 2          | 3        | 0,555      |
| 5      | 7          | 1          | 1        | 0,59       |
| 5      | 7          | 2          | 1        | 0,84       |
| 5      | 7          | 1          | 2        | 0,335      |
| 5      | 8          | 1          | 3        | 0,297      |
| 5      | 8          | 2          | 2        | 0,347      |
| 5      | 8          | 2          | 3        | 0,305      |
| 5      | 8          | 1          | 1        | 0,501      |
| 5      | 8          | 2          | 1        | 0,361      |
| 5      | 8          | 1          | 2        | 1,112      |
| 5      | 9          | 1          | 3        | 0,376      |
| 5      | 9          | 2          | 2        | 0,773      |
| 5      | 9          | 2          | 3        | 0,752      |
| 5      | 9          | 1          | 1        | 1,217      |
| 5      | 9          | 2          | 1        | 0,92       |

| semana | voluntário | superfície | material | absorvância |
|--------|------------|------------|----------|-------------|
| 5      | 9          | 1          | 2        | 0,651       |
| 5      | 10         | 1          | 3        | 1,505       |
| 5      | 10         | 2          | 2        | 1,221       |
| 5      | 10         | 2          | 3        | 0,214       |
| 5      | 10         | 1          | 1        | 0,708       |
| 5      | 10         | 2          | 1        | 0,789       |
| 5      | 10         | 1          | 2        | 0,407       |
| 6      | 1          | 1          | 2        | 0,672       |
| 6      | 1          | 1          | 3        | 0,26        |
| 6      | 1          | 2          | 2        | 0,419       |
| 6      | 1          | 2          | 3        | 0,263       |
| 6      | 1          | 1          | 1        | 0,416       |
| 6      | 1          | 2          | 1        | 0,49        |
| 6      | 2          | 1          | 2        | 0,531       |
| 6      | 2          | 1          | 3        | 0,336       |
| 6      | 2          | 2          | 2        | 0,355       |
| 6      | 2          | 2          | 3        | 0,35        |
| 6      | 2          | 1          | 1        | 0,393       |
| 6      | 2          | 2          | 1        | 0,472       |
| 6      | 3          | 1          | 2        | 2,539       |
| 6      | 3          | 1          | 3        | 1,385       |
| 6      | 3          | 2          | 2        | 1,284       |
| 6      | 3          | 2          | 3        | 0,374       |
| 6      | 3          | 1          | 1        | 0,409       |
| 6      | 3          | 2          | 1        | 0,485       |
| 6      | 4          | 1          | 2        | 0,315       |
| 6      | 4          | 1          | 3        | 0,591       |
| 6      | 4          | 2          | 2        | 0,222       |
| 6      | 4          | 2          | 3        | 0,675       |
| 6      | 4          | 1          | 1        | 1,053       |
| 6      | 4          | 2          | 1        | 0,44        |
| 6      | 5          | 1          | 2        | 0,307       |
| 6      | 5          | 1          | 3        | 1,679       |
| 6      | 5          | 2          | 2        | 0,646       |
| 6      | 5          | 2          | 3        | 0,997       |
| 6      | 5          | 1          | 1        | 1,339       |
| 6      | 5          | 2          | 1        | 1,27        |
| 6      | 6          | 1          | 2        | 2,485       |
| 6      | 6          | 1          | 3        | 1,379       |
| 6      | 6          | 2          | 2        | 1,695       |
| 6      | 6          | 2          | 3        | 1,819       |
| 6      | 6          | 1          | 1        | 1,129       |
| 6      | 6          | 2          | 1        | 0,533       |
| 6      | 7          | 1          | 2        | 1,971       |
| 6      | 7          | 1          | 3        | 1,531       |
| 6      | 7          | 2          | 2        | 0,891       |
| 6      | 7          | 2          | 3        | 1,118       |
| 6      | 7          | 1          | 1        | 0,274       |
| 6      | 7          | 2          | 1        | 0,251       |
| 6      | 8          | 1          | 2        | 0,567       |

| semana | voluntário | superfície | material | absorbância |
|--------|------------|------------|----------|-------------|
| 6      | 8          | 1          | 3        | 0,389       |
| 6      | 8          | 2          | 2        | 0,583       |
| 6      | 8          | 2          | 3        | 0,315       |
| 6      | 8          | 1          | 1        | 0,337       |
| 6      | 8          | 2          | 1        | 1,759       |
| 6      | 9          | 1          | 2        | 1,942       |
| 6      | 9          | 1          | 3        | 0,594       |
| 6      | 9          | 2          | 2        | 1,874       |
| 6      | 9          | 2          | 3        | 1,785       |
| 6      | 9          | 1          | 1        | 0,441       |
| 6      | 9          | 2          | 1        | 0,57        |
| 6      | 10         | 1          | 2        | 0,337       |
| 6      | 10         | 1          | 3        | 0,826       |
| 6      | 10         | 2          | 2        | 0,957       |
| 6      | 10         | 2          | 3        | 0,572       |
| 6      | 10         | 1          | 1        | 0,493       |
| 6      | 10         | 2          | 1        | 0,573       |