



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**AÇÃO DO BIOFILME CARIOGÊNICO NA INTERFACE DE UNIÃO DE UM
COMPÓSITO-ESMALTE DENTÁRIO RESTAURADO PREVIAMENTE COM
CIMENTO TEMPORÁRIO**

Niterói
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**AÇÃO DO BIOFILME CARIOGÊNICO NA INTERFACE DE UNIÃO DE UM
COMPÓSITO-ESMALTE DENTÁRIO RESTAURADO PREVIAMENTE COM
CIMENTO TEMPORÁRIO**

LUIZ FERNANDO DA COSTA TAVARES

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de concentração: Dentística

Orientadores: Prof^a.Dr^a.Maristela Barbosa Portela.

Prof^o.Dr^o.Eduardo Moreira da Silva.

Niterói
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

T 231 Tavares, Luiz Fernando da Costa

Ação do biofilme cariogênico na interface de união de um compósito-esmalte dentário restaurado previamente com cimento temporário / Luiz Fernando da Costa; orientadora: Profª. Drª. Maristela Barbosa Portela, co-orientador: Profº. Drº. Eduardo Moreira da Silva. – Niterói : [s.n.], 2013.

43f.; il.

Inclui gráficos e tabelas.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal Fluminense, 2013.

Bibliografia: f. 37-43.

1. Placa dentária. 2. Restauração dentária temporária. I. Portela, Maristela Barbosa [orien.]. II. Silva, Eduardo Moreira Da [co-orient.] III. Título.

CDD 617.67

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Moreira da Silva

Instituição: Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Odontologia

Decisão: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Laiza Tatiana Poskus

Instituição: Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Odontologia

Decisão: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Cristiane Mariote Amaral

Instituição: Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Odontologia

Decisão: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus por permitir a minha convivência com pessoas de grande cabedal científico e Humano que contribuíram para a minha formação como pesquisador na Dentística da FO-UFF.

À minha dedicada e amorosa esposa, Rosimar, bem como aos meus queridos filhos Vinícius e Luíza que entenderam a minha ausência para os estudos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a dedicação, o profissionalismo e o comprometimento de toda a equipe da Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense que não pouparam esforços para dirimir quaisquer dúvidas no transcurso da minha formação.

Aos colegas e amigos do mestrado em Dentística da FO-UFF, agradeço o companheirismo dos momentos de dificuldades ajudando-me a executar as minhas pesquisas através da passagem de suas experiências, vivenciadas na manipulação das máquinas de ensaios laboratoriais.

RESUMO

Tavares LFC. Ação do biofilme cariogênico na interface de união de um compósito-esmalte dentário restaurado previamente com cimento temporário. Niterói: Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2013.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a interface de união de um compósito-esmalte, previamente restaurado com um cimento temporário sem eugenol, sob a ação do biofilme cariogênico *in vitro*. O grupo 1 (G1 e Grupo Controle 1) foram formados por espécimes que não receberam restauração provisória antes da restauração definitiva em resina composta. O grupo 2 (G2 e Grupo Controle 2) foram formados pelos espécimes que receberam uma restauração provisória por 7 dias, antes da restauração definitiva em resina composta. Os dois grupos (G1 e G2) foram submetidos à ação de um biofilme cariogênico por 14 dias formado por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, ambas as espécies ATCC. Antes da indução do biofilme, os dois grupos permaneceram em saliva artificial por 7 dias à 37°C. Os grupos GC 1 e GC 2 não foram submetidos a ação do biofilme cariogênico. Para tanto os seguintes objetivos específicos foram testados: profundidade de microinfiltração nos dois grupos estudados; valores da resistência adesiva, em Mpa, das amostras através do teste de microcisalhamento; se a utilização de um material provisório, sem eugenol, previamente, à restauração final em compósito iria interferir negativamente na adesão da interface dente-restauração; o tipo de falha do sistema adesivo nos grupos estudados, demonstrando qual foi a mais frequente. Os resultados obtidos nos testes ora executados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, eles referendam os estudos prévios de que o material restaurador provisório, sem eugenol, não interfere na resistência de união ao esmalte e na microinfiltração.

Palavras-chave: Biofilme, restauração provisória.

ABSTRACT

Tavares LFC. Action of cariogenic biofilm on bonding interface of a composite-enamel previously restored with temporary cement. Niteroi: Fluminense Federal University, Faculty of Dentistry, 2013.

The aim of this study was to evaluate the bonding interface of a composite - enamel , previously restored with a temporary cement without eugenol , under the action of cariogenic biofilms in vitro . Group 1 (G1 and Control Group 1) were formed by specimens that were not given provisional restoration before final restoration in composite. Group 2 (G2 and control group 2) were formed by specimens that received a provisional restoration for 7 days before the final restoration in composite. The two groups (G1 and G2) were subjected to the action of a cariogenic biofilm for 14 days formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* ATCC both species . Before induction of biofilm , both groups remained in artificial saliva for 7 days at 37 ° C. GC 1 and GC 2 were not subjected to the action of cariogenic biofilms . Therefore the following specific objectives were tested : depth of microleakage in both groups , the values of bond strength in MPa, the samples through the test microshear if the use of a temporary material without eugenol , previously , in the final restoration composite would adversely affect the adhesion of the tooth-restoration interface , type of adhesive system failure in both groups , showing what was the most frequent . The results obtained in the tests performed either showed no statistically significant difference , they concur with previous studies that the temporary restorative material without eugenol , does not interfere in the bond strength to enamel and microleakage.

Key-words:Biofilm, temporary restorative

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Adesão dentária	12
2.2 Influência de remanescente de restauração temporária na adesão dentária	14
2.3 Biofilme oral sobre compósitos.....	16
2.4 Cárie secundária	18
3 OBJETIVO GERAL	19
3.1 Objetivos específicos	19
4 HIPÓTESES	19
5 MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Materiais dentários	20
5.2 Preparação das amostras	21
5.2.1 Confeção dos espécimes para o ensaio de microinfiltração	22
5.2.2 Confeção dos espécimes para o ensaio de microcisalhamento	24
5.3 Biofilme misto de <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	25
5.4 Ensaio de microinfiltração	26
5.5 Ensaio de microcisalhamento.....	27
5.6 Análise do tipo de falha	28
5.7 Análise estatística.....	28
6 RESULTADOS	29
6.1 Resistência de união	29
6.2 Microinfiltração	30
6.3 Análise do tipo de falha	31
7 DISCUSSÃO	32
8 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O constante avanço científico observado nas diversas áreas do conhecimento humano, também está presente na Odontologia. Diversos pesquisadores aperfeiçoam, estudam e descobrem novos métodos de aplicação dos materiais para a sua utilização dentro da cavidade oral. Eles buscam adequar esses avanços científicos em sua rotina diária, a fim de aplicar os resultados dessas pesquisas em seus pacientes ofertando assim, tratamentos odontológicos baseados nas conclusões desses estudos.^{10,11,45}

As observações associadas aos diversos estudos trouxeram a Odontologia para a era adesiva e contribuíram para a prática de uma Odontologia mais conservadora que também objetiva recuperar a aparência natural e a estética do sorriso.

Atualmente, os sistemas adesivos são indicados em diversas situações, dentre elas: restaurações estéticas das lesões cáries; alteração de forma, cor e comprimento dos dentes; colagem de fragmentos; adesão de restaurações indiretas; selantes de fósulas e fissuras; fixação de braquetes ortodônticos; reparo de restaurações; reconstrução de núcleo para coroas; cimentação de retentores intraradiculares; reforço interno de raízes frágeis; e dessensibilização de raízes expostas. Assim, dentre as opções de materiais restauradores, os materiais poliméricos tais como os sistemas adesivos e os compósitos, têm recebido grande destaque no campo científico. Com isso, constantes melhorias têm sido observadas nas suas propriedades físicas, mecânicas, estéticas e de manipulação.^{10,11,45}

A biocompatibilidade dos materiais está relacionada, principalmente, com os efeitos que esses possuem sobre a polpa dentária em dois aspectos: a toxicidade química e a capacidade de permitir infiltração marginal. Além da falha no sistema adesivo, a infiltração marginal pode ser desencadeada pela contração dos compósitos durante o processo de polimerização. Conseqüentemente, isto pode favorecer a colonização de micro-organismos podendo causar cáries secundárias, reações pulpares ou ambas.²

Muitos tratamentos odontológicos não podem ser concluídos em uma mesma consulta clínica, necessitando assim de uma restauração temporária a fim de proteger o remanescente dental. No entanto, estas restaurações temporárias que

protegem a estrutura dental remanescente podem interferir, negativamente, na adesão dente-compósito, comprometendo assim, ao longo do tempo, o sucesso clínico final.^{17,54}

Com isso, o objetivo do presente estudo é avaliar a interface de união de um compósito-esmalte, previamente restaurado com um cimento temporário sem eugenol, sob a ação do biofilme cariogênico *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Várias razões podem contribuir para a falha de uma restauração tais como, fratura do remanescente dentário, fratura da margem restaurada, abrasão, erosão, atrição, bem como, hábitos alimentares e de higiene oral de cada indivíduo. O insucesso clínico mais sério, e mais frequente, advém da infiltração microbiana na interface compósito-dente, que pode causar descoloração na margem compósito-dente, cárie secundária, doença periodontal, inflamação e/ou necrose pulpar.⁴⁴ Portanto, é necessária a investigação dos vários motivos que contribuem para o insucesso clínico da restauração dentária, como por exemplo, a possível existência de remanescente de restauração provisória aderida a estrutura dental.

2.1 Adesão dentária

Buonocore¹⁰, em 1955, já relatava que um dos principais problemas das resinas acrílicas e outros materiais restauradores era a falta de adesão à estrutura dental. Eles buscavam um material restaurador capaz de formar uma forte adesão com as estruturas dentais, que oferecesse muitas vantagens em relação aos materiais daquela época, como por exemplo, não seriam necessários preparos cavitários com forma de retenção e resistência.¹⁰

O principal objetivo de um sistema adesivo é prover retenção aos compósitos restauradores ou cimentos resinosos. Além de resistir às forças mecânicas, e em particular a contração de polimerização do incremento de compósito. Um bom adesivo também deve ser capaz de prevenir a formação de fendas ao longo das margens da restauração. Clinicamente, a falha das restaurações ocorre com maior frequência, devido, a um selamento inadequado, com subsequente descoloração das margens da cavidade do que da perda de retenção.^{10,11,45,53,71}

O mecanismo de união dos adesivos dentais é baseado em uma dupla adesão. Primeiro, o adesivo une-se ao esmalte e a dentina e, após esse processo, o adesivo se vincula ao compósito resinoso através da copolimerização das ligações duplas residuais (-C=C-) da camada inibida pelo oxigênio.⁷¹ Quanto à união ao esmalte e

dentina, a adesão micromecânica é considerada o principal mecanismo de união. Isto é conseguido através de um processo de substituição pelo qual o material inorgânico do dente é substituído pelos monômeros do compósito que se tornam interligado nas retenções pela polimerização. Considerando que esse processo implica no simples imbricamento do compósito nas retenções criadas no esmalte, e na difusão do compósito na malha de colágeno exposta na dentina, o microimbricamento mecânico ocorrerá após a desmineralização e consecutiva infiltração dos monômeros.⁷¹

A contração de polimerização representa um fator de extrema preocupação e cuidado, pois é uma característica inerente do sistema adesivo, que no momento da polimerização, os monômeros passem de um agregado de moléculas flutuantes livres para um corpo rígido de cadeias poliméricas cruzadas, conferindo, assim, resistência ao material.⁵⁰

Nesse momento, a dupla ligação existente entre os átomos de carbono é quebrada e a distância entre eles é encurtada. Além disso, o encurtamento da molécula, pode se dar também, pelo próprio movimento entre as cadeias de moléculas. Antes da polimerização, os monômeros são mantidos unidos de forma fraca por forças de *van der Waals*, com um espaço que produz uma energia potencial mínima. E, num polímero as unidades de monômeros são conectadas por ligações covalentes, com um espaço de energia potencial mínima que é aproximadamente 20% menor que aquela existente entre os monômeros não reagidos.^{50,71}

Clinicamente, esses encurtamentos, tendem a gerar tensões na interface dente-compósito, enfraquecendo a sua união, criando fendas (*gaps*) nas margens da restauração. Como consequência, isso pode levar à microinfiltração, pois os *gaps* serão preenchidos pelos fluidos orais e, dar início à cárie secundária, sensibilidade pós-operatória e patologias pulpares.^{2,23,50,71}

Durante o processo restaurador das cavidades superiores à 2 mm com compósitos, a inserção de pequenos incrementos, também, é um procedimento padrão. Tem como objetivo, garantir a máxima polimerização em virtude da completa exposição de todo o incremento à luz do fotoativador, inicialmente, em baixos níveis de irradiância, para mitigar a extensão da contração de polimerização. Por outro lado, a polimerização com alto nível de irradiância forma cadeias poliméricas com um maior número de ligações cruzadas e melhores propriedades físico-químicas.⁹

Os sistemas adesivos estão muito expostos a fluídos dentinários e, a fluídos salivares no ambiente oral. A absorção de água e as características de solubilidade dos materiais adesivos são importantes na determinação da longevidade e da qualidade marginal das restaurações. O valor da alta absorção de água pode contribuir para a coloração marginal em torno da restauração de compósitos. A água desempenha um papel importante no processo de degradação química de materiais poliméricos. Dessa forma, os materiais mais hidrofóbos tendem a consumir menores quantidades de água e, conseqüentemente, apresentam uma menor velocidade de degradação hidrolítica.^{23,53}

Por conseguinte, além dos cuidados relatados acima a respeito da técnica de inserção e polimerização dos compósitos, uma adequada remoção dos remanescentes de cimento ou restauração provisória, bem como da lama dentinária, devem ser realizados a fim de não prejudicar a adesão do compósito à estrutura dental.⁵

2.2 Influência de remanescente de restauração temporária na adesão dentária

Ao longo dos anos, estudos tem demonstrado a influência de vários fatores no processo de adesão do compósito à estrutura dental, tais como tempo de condicionamento das estruturas dentárias, método de remoção do solvente contido no adesivo, espessura da camada do adesivo, tipo de estrutura dentária e presença de material restaurador provisório sob o sistema adesivo ao esmalte e a dentina.^{21,52,59} A presença de remanescentes de materiais provisórios pode alterar a umidade e a permeabilidade da dentina e do esmalte, com conseqüente mudança do ângulo de contato com os líquidos, dentre esses, o líquido do sistema de adesão dentária. Essa mudança irá dificultar a penetração do adesivo nos túbulos dentinários, prejudicando a formação da camada híbrida na dentina e na área desmineralizada do esmalte o seu microimbricamento mecânico.^{52,66}

Além da sua presença física, a composição química dos materiais restauradores ou cimentos temporários, também pode ter papel importante no processo de adesão dos compósitos ao dente. Takimoto et al.⁶⁶, demonstraram que

a utilização de cimentos temporários, com ou sem o eugenol, reduzem os valores da energia livre de superfície (Y_s), modificando assim a permeabilidade da dentina, principalmente devido a dificuldade de remoção do interior dos túbulos dentinários dos remanescentes desses componentes. No entanto, há estudos demonstrando que procedimentos padronizados utilizados antes da cimentação adesiva, tais como, a limpeza mecânica com pedra-pomes, jato de água e o condicionamento ácido da dentina podem neutralizar o efeito negativo sobre a resistência adesiva, através da redução da quantidade de partículas residuais de cimento temporário sobre o esmalte e a dentina.^{25,55,75}

Os sistemas autocondicionantes têm sido cada vez mais utilizados na prática clínica. Eles são mais simples de usar, pois não há a necessidade de lavar a superfície dentinária após o condicionamento ácido. O primer contendo monômero ácido polimerizável, dissolve ou incorpora a lama dentinária dentro da interface adesiva. Logo, esses sistemas adesivos autocondicionantes, tecnicamente, são menos sensíveis do que os sistemas de condicionamento ácido total, porque não é necessário controlar a hidratação da matriz colágena, fator crítico para os sistemas adesivos de condicionamento ácido total que utilizam condicionamento ácido separado da lavagem e secagem do preparo cavitário.^{30,46,67,74}

Na presença de remanescente de cimento temporário é possível que as suas partículas sejam incorporadas pelo primer do sistema autocondicionante, juntamente com a lama dentinária, desde que a cavidade não tenha sido lavada, como acontece nos sistemas de condicionamento total. Portanto, a efetividade da adesão do sistema autocondicionante pode ser mais prejudicada do que no sistema de condicionamento ácido total quando esses remanescentes provisórios estiverem presentes.^{5,74}

No entanto, mesmo devido à simplificação da técnica de aplicação do sistema adesivo proporcionada pelo sistema autocondicionante, como já descrito acima, quando o objetivo da adesão for unir o compósito ao esmalte, o mais indicado são sistemas de condicionamento ácido total. Pois nesse caso, o microimbricamento mecânico é suficiente para garantir uma união mais duradoura.⁷²

Apesar dos estudos prévios relatarem que a composição química dos cimentos ou restauradores provisórios, a base de eugenol terem maior influência negativa na força de união entre o dente e o compósito,^{67,74} há autores que não observaram

redução da resistência de união do sistema adesivo a estrutura dental, tanto nos cimentos temporários contendo eugenol quanto naqueles que não o contém.^{60,55}

Assim, a realização de mais estudos faz-se necessário a fim de tentar elucidar esta problemática, principalmente, quando este elemento dental é novamente submetido a um desafio cariogênico.

2.3 Biofilme oral sobre compósitos

Muitos biomateriais utilizados para recompor a função mastigatória favorecem a formação do biofilme e, quando não são adequadamente removidos podem prejudicar a saúde oral do indivíduo. Os colonizadores primários deste biofilme são espécies de *Streptococos* e *Actinomyces*. Uma vez aderidos sobre essas superfícies inertes, proporcionam condições locais ideais para a colonização de outras espécies. Como o biofilme cresce em complexidade, no seu interior são formados diferentes micro-ambientes, favorecendo a adesão de novos gêneros microbianos, tais como *P. gingivalis*, *T.forsythia* e *T.denticola*. Algumas dessas interações entre os micro-organismos são específicas, pois ocorrem, somente, entre determinadas espécies que desenvolveram sítios especializados para receberem e emitirem sinais, que serão percebidos e entendidos por elas, dando origem ao fenômeno chamado de *quorum-sensing* ou sinalização celular.³¹

A formação do biofilme sobre materiais dentários restauradores, como por exemplo o compósito e o ionômero de vidro, pode causar deterioração da sua superfície favorecendo a perpetuação e, conseqüentemente, o crescimento do biofilme sobre essas superfícies. Isso ocorre mesmo havendo a liberação de monômeros residuais oriundos do compósito que influencia o crescimento do biofilme, *in vitro*. No entanto, *in vivo*, os efeitos inibitórios não são observados, provavelmente devido à presença da saliva que dilui estes componentes.⁵⁶

O biofilme sobre o compósito não causa, somente, a degradação e o aumento da rugosidade na superfície⁷, mas também, propicia a colonização de micro-organismos aptos a invadir a interface entre a restauração e o dente, causando a cárie secundária²⁰ e a doença pulpar.^{47,63} Com a deterioração da superfície de compósitos, em função da presença do biofilme oral, há um aumento da rugosidade

superficial, exposição de suas partículas de carga e diminuição da microdureza superficial nos testes mecânicos realizados *in vitro*.⁷ Neste estudo, realizado por Beyth⁷ e colaboradores, após um mês de exposição ao biofilme, formado por *Streptococcus mutans* (ATCC27351), um compósito contendo Bis-GMA, uretano e partículas de carga com tamanho entre 0.04 e 0.2 μm , teve sua rugosidade superficial, que era menor do que 10, aumentada para 40nm sem, no entanto, afetar a microdureza superficial. Isso sugere que o aumento da rugosidade pode ter sido causado pela remoção de partículas de carga.⁷

Após a polimerização o grau de conversão de um compósito nunca é completo e, aproximadamente, de 5 a 10% de monômero não polimerizado é lixiviado pela água. Tem sido relatado que a liberação de dimetacrilato de etilenoglicol das resinas compostas pode favorecer o crescimento de bactérias cariogênicas, tais como o *S. mutans* e *Lactobacillus*, e que sempre estão presentes nas margens de restaurações de compósito.²⁶ Foi demonstrado por outros autores que o dimetacrilato de etilenoglicol liberado, também favorece a atividade da glicosiltransferase dos *S. sobrinus*.³² Takahashi et al.⁶⁵, demonstraram ainda que além do *S. sobrinus*, há a estimulação do crescimento de outras espécies de *Streptococcus*, como o *S. sanguis* na presença de dimetacrilato de etilenoglicol.^{8,33}

Outros componentes oriundos dos agentes de união à dentina, tais como o metacrilato hidroxietil ou o dimetacrilato de treflenoglicol estão envolvidos no estímulo do crescimento de micro-organismos cariogênicos, tais como, *S. sobrinus* e *Lactobacillus acidophilus*.⁵⁷

No entanto, os resultados dos estudos *in vitro* devem ser interpretados com cautela, pois não reproduzem situações clínicas reais, já que, *in vitro*, o polimento realizado sobre as restaurações, muitas das vezes, não é aquele obtido na prática clínica.¹³ Adicionalmente, *in vivo*, o monômero liberado pelos compósitos é diluído continuamente pela saliva e outros fluídos orais, o que minimiza os resultados encontrados no laboratório, no que diz respeito ao crescimento microbiano.¹² No entanto, apesar destas limitações dos estudos *in vitro*, quando se compara com o que ocorre, *in vivo*, a presença do biofilme oral sobre restaurações dentárias pode propiciar a degradação da superfície e da interface de união da restauração com a estrutura dental. Daí ocorre o surgimento de infiltrações marginais, fraturas, manchamento e até cárie secundária.⁶⁰

2.4 Cárie secundária ou cárie recorrente

O desenvolvimento da doença cárie é um processo dinâmico entre a desmineralização e remineralização envolvendo os tecidos duros do dente que pode resultar em cavitação desse tecido. A evolução da doença cárie depende da presença de ácidos e enzimas produzidos pelos micro-organismos presentes no biofilme. Dentre estes produtos microbianos pode-se citar os ácidos acético, láctico e cítrico responsáveis pela redução do potencial de hidrogênio (pH) da superfície dentária o que facilita a perda de minerais e por conseguinte, a sua desmineralização.⁴⁹ Os mesmos micro-organismos presentes no biofilme dental, e que estão envolvidos na etiologia da cárie primária, também, estão envolvidos na cárie secundária. E, dependendo do tipo de material restaurador, o acúmulo de micro-organismos e o desenvolvimento e a evolução da cárie secundária serão facilitados ou prejudicados. Assim, a contração de polimerização, que é inerente aos compósitos, pode produzir a formação de fendas entre o dente e a restauração que servirão de nichos adicionais para a colonização, crescimento e desenvolvimento de biofilme cariogênico. Logo, conclui-se que a microinfiltração e a cárie secundária estão intimamente ligadas.⁴²

A cárie secundária é relatada como a principal causa de substituição de restaurações dentárias, em locais nos quais existem uma maior facilidade de acúmulo e dificuldade de remoção do biofilme oral, principalmente, nas margens das restaurações cervicais, classificadas por *Black*, como classe II e V, bem como nos terminos cervicais de coroas totais.³⁶ Mo Si-su et al.⁴², descreveram ainda que a microbiota envolvida na cárie secundária também está associada a infecções dos condutos radiculares e no biofilme subgengival, como por exemplo: *Prevotella*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *S. mutans*, *Neisseriae* e *Actinomyces*.

3 OBJETIVO GERAL

A proposta deste estudo foi verificar, *in vitro*, a ação de um biofilme cariogênico, formado por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na interface de união compósito-esmalte após terem sido, restaurados com um material provisório sem eugenol.

3.1 Objetivos específicos

Para tanto os seguintes objetivos específicos foram testados:

- Quantificar a profundidade de microinfiltração nos dois grupos estudados;
- Quantificar os valores da resistência adesiva, em Mpa, das amostras através do teste de microcisalhamento;
- Verificar se a utilização de um material provisório, sem eugenol, previamente, à restauração final em compósito irá interferir negativamente na adesão da interface dente-restauração;
- Relacionar o tipo de falha do sistema adesivo nos grupos estudados, demonstrando qual é a mais frequente.

4 HIPÓTESES

Para tanto as seguintes hipóteses foram testadas:

- Se há uma correlação entre o uso do cimento provisório, sem eugenol, e a cárie secundária;
- Se há influência do uso do cimento provisório na resistência adesiva da interface dente-restauração;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais dentários

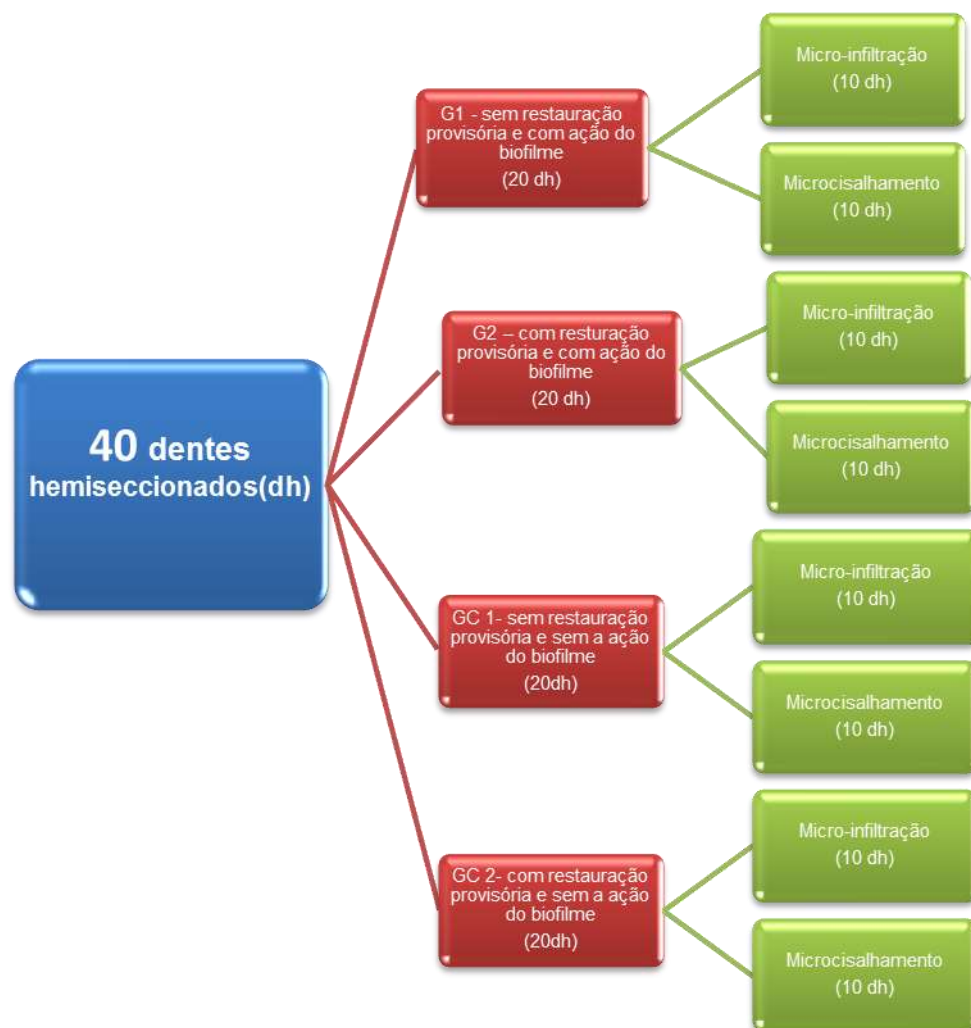
Os materiais que foram utilizados neste estudo e a sua composição estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1 - Composição do material utilizado

Material	Nome	Composição (% em peso)*	Fabricante	Lote
Compósito	Filtek Z 350XT, cor A3	Cerâmica silanizada (60-80%), sílica silanizada (1-10%), UDMA (1-10%), Bis-GMA (1-10%), zircônia silanizada (1-10%), polietileno glicol dimetacrilato (<5), TEGDMA (<5)	3M ESPE, St Paul, MN, USA	N31208 7BR
Sistema adesivo	Single Bond 2	Álcool etílico (25-35%), sílica tratada por silano (nanoparticulada) (10-20%), Bis-GMA (10-20%), 2-metacrilato de hidroxietila (5-15%), glicerol 1,3-dimetacrilato (5-10%), copolímero do ácido acrílico e itacônico (5-10%), água (<5%), dimetacrilato diuretano (1-5%)	3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brasil	N34086 7BR
Condicionador dentário	CONDAC 37	Ácido fosfórico a 37%	FGM, Joinville, SC, Brasil	121110
Restaurador provisório	X-TEMP®	Ionômero de vidro, sulfato de cálcio, óxido de zinco, petrolato, ácido poliacrílico e sílica	DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	111015 62
Saliva artificial	Manipulado	Cloretos de sódio(0,67g), de cálcio(0,12g), de magnésio(0,04), de potássio(0,96), carbometil celulose(8g), metilparabeno(1g), sorbitol liq(24g), fósforo potássio monob(0,27g) e água destilada(964,94ml)	Fármacia Universitária da UERJ, RJ, Brasil	RVD 024043
Ponta diamantada	Nº 3053	Diamantes e aço inoxidável	KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil	030613

5.2 Preparação das amostras

Quarenta terceiros molares humanos, sem cáries e/ou restaurações, extraídos por indicação ortodôntica foram utilizados na presente pesquisa após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IESC/UFRJ, número do parecer 14/09. Eles foram divididos aleatoriamente conforme o esquema 1.



Esquema 1 - Divisão dos dentes.

Os dentes foram cortados, dividindo-os ao meio no sentido méso-distal. Este corte foi realizado com um disco diamantado em baixa rotação, em cortadeira metalográfica(Isomet 1000, Buehler, EUA, nº de série 654 IPS 03317) (figura 1).



Figura 1 - Cortadeira metalográfica com disco diamantado.

As raízes dentárias foram desprezadas e, a sua segmentação da coroa foi realizada com um disco de carborundum montado num micromotor na junção amelocementária. Os fragmentos obtidos foram armazenados em solução de cloramina 0,5% a 37°C até o momento do preparo e, posteriormente, foram separados aleatoriamente em dois grupos.

O grupo 1 (G1 e Grupo Controle 1) foram formados por espécimes que não receberam restauração provisória antes da restauração definitiva em resina composta. O grupo 2(G2 e Grupo Controle 2) foram formados pelos espécimes que receberam uma restauração provisória por 7 dias, antes da restauração definitiva em resina composta. Os dois grupos(G1 e G2) foram submetidos à ação de um biofilme cariogênico por 14 dias formado por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, ambas as espécies ATCC. Antes da indução do biofilme, os dois grupos permaneceram em saliva artificial por 7 dias à 37°C. Os grupos GC 1 e GC 2 não foram submetidos a ação do biofilme cariogênico.

5.2.1 Confeção dos espécimes para o ensaio de microinfiltração

Todas as amostras utilizadas neste teste foram cavitadas na superfície lingual ou vestibular, de forma padronizada, com uma ponta diamantada nº3058 da KG Sorensen, numa máquina de preparo cavitário(figura 2), à qual uma caneta de alta rotação foi fixada. A ponta diamantada, nº 3058, tem a forma de roda, a cavidade

ficou com o diâmetro da roda de 4(quatro)mm e a profundidade de 1(um)mm foi dada por sua espessura.



Figura 2 - Máquina de padronização cavitária.

Para a restauração da cavidade, ora realizada, foram utilizados como material restaurador provisório o X-TEMP® (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, posteriormente, para o restauração final, o sistema adesivo prime&bond 2.1®(Dentsply,Brasil, RJ, Petrópolis) e o compósito Filtek Z350 XT ®(3M ESPE, St Paul,USA) cor A3 colocado em um só incremento, para as amostras do grupo 2. No grupo 1, o procedimento foi idêntico ao do grupo 2, excetuando-se o uso do material restaurador provisório. Todos os materiais foram utilizados seguindo as instruções do fabricante. A fotoativação foi realizada utilizando um aparelho Optilux 501 (Demetron / Kerr, Danbury, CT, EUA) com um dispositivo saída de luz a 600 mW/cm². Após a restauração com a resina, os espécimes foram armazenados em saliva artificial a 37°C até o momento de indução do biofilme.

5.2.2 Confeção dos espécimes para o ensaio de microcisalhamento

Os dentes seccionados foram embutidos em resina acrílica autopolimerizável com a superfície do esmalte voltada para cima. Esta face foi planificada e polida com lixas d'água número 300 e 600, respectivamente, na politriz refrigerada à água, modelo DPU-10, PANAMBRA indústria brasileira, número de série 880E00-30 (figura 3).



Figura 3 - Politriz com as amostras do ensaio de cisalhamento.

Para o condicionamento do esmalte dentário foi passado na sua superfície o ácido fosfórico a 37% por 30 segundos, lavado e seco. Logo após foi aplicado o sistema adesivo e colocado de 3 a 4 microtubos com 0,75 mm de diâmetro em cada superfície. Esse conjunto sofreu a ação do fotopolimerizador por 40 segundos. Em seguida os microtubos foram, cuidadosamente, preenchidos com o compósito Filtek Z350 XT[®], fotoativados por 40 segundos, outra vez. Decorrida 1 hora após o preenchimento dos microtubos, eles foram removidos com uma lâmina de bisturi número 12 (figura 4).

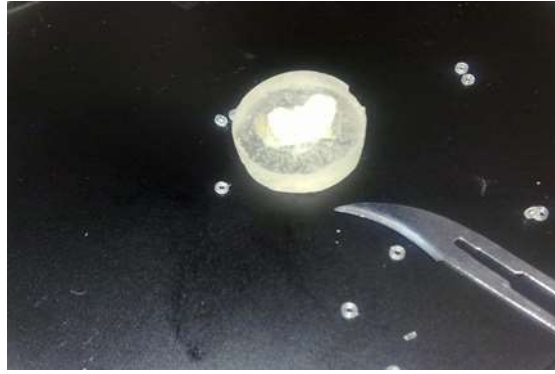


Figura 4 - Microtubos utilizados

5.3 Biofilme misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*

Após a preparação das amostras, essas foram esterilizadas através de óxido de etileno e, fixados nos poços de placas de cultura celular com cera pegajosa (Figura 5).



Figura 5 - Poços com as amostras para a cultura.

A indução do biofilme misto de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* sobre os espécimes foi realizada utilizando isolados ATCC. Para isso, alíquotas de suspensões celulares com 2×10^5 células/ml de cada microrganismo em BHI líquido suplementado com 20% de sacarose foram inoculadas sobre os corpos de prova e mantidos por 14 dias em anaerobiose a 37°C. A renovação do meio de cultura ocorreu a cada 24 horas a fim de nutrir o biofilme em formação.

Após o tempo de incubação necessário a formação do biofilme misto, os espécimes foram lavados suavemente uma vez com PBS estéril e colocados em tubos Falcon onde foram tratados com 1% de protease. Alíquotas de 100 µl destas suspensões celulares diluídas em PBS foram plaqueadas em BHI Agar para quantificação dos micro-organismos totais através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Placas com BHI Agar suplementado com 6 µg/ml de Vancomicina ou com 6 µg/ml de Fluconazol foram utilizadas para quantificação de *C. albicans* e *S. mutans*, respectivamente.⁶²

5.4 Ensaio de microinfiltração

As amostras foram preparadas, conforme a descrição contida no item 5.2.1 e, para evitar a penetração do corante azul de metileno em região não desejada, elas foram recobertas com guta-percha em bastão aquecida em toda a sua extensão, respeitando-se a distância limite de 1(mm) das margens da restauração(figura 6). Assim sendo, as amostras foram armazenadas em recipientes plásticos com água destilada para evitar a desidratação.



Figura 6 - Amostras preparadas para a microinfiltração.

Após a secagem das amostras, os espécimes foram imersos em uma solução aquosa de azul de metileno a 3%, pH 7 por quatro horas, lavados por cinco minutos em água corrente para remover o excesso da solução e secos com papel absorvente.

Cada restauração foi seccionada no centro, no sentido vestibulo-lingual, utilizando-se de discos diamantados dupla face (KG Sorensen) e peça de mão. Todos os espécimes foram fixados em lâminas de cera utilidade para apoio quando na realização do corte.

As amostras foram incluídas em acrílico autopolimerizável, separadas por grupo e numeradas individualmente, para avaliação da área microinfiltrada. A quantidade de microinfiltração foi avaliada nas duas amostras obtidas e, registrada conforme a profundidade de penetração do corante. Essa quantificação em milímetros (figura 7) foi determinada através de um estereomicroscópio com uma ampliação de 50 vezes (SZ61, Olympus, Tóquio, Japão, nº de série OC06579) com a captura da imagem através da câmera, UC30, Olympus, Alemanha.



Figura 7 - Mostrando a microinfiltração do corante.

5.5 Ensaio de microcisalhamento

As amostras preparadas de acordo com a descrição contida no item 5.2.2 foram levadas e, testadas na máquina de ensaio universal (Emic DL 2000, EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio; São José dos Pinhais, PR, Brazil) com célula de carga 50N. Uma ponta em forma de cinzel (5,22 largura x 0,6mm espessura) foi utilizada, aplicando-se uma força vertical em velocidade de 1,0 mm/min até que a falha acontecesse (figura 8). Esses valores foram registrados e compilados em tabelas de acordo com o seu grupo.



Figura 8 - Ensaio de microcisalhamento.

5.6 Análise do tipo de falha

O tipo de falha foi determinado, com a utilização de um estereomicroscópio e, uma ampliação de 50 vezes (SZ61, Olympus, Tóquio, Japão, nº de série OC06579). A captura da imagem foi feita através da câmera, UC30, Olympus/Alemanha, que estava acoplada ao estereomicroscópio.

O tipo de falha foi avaliado através dos seguintes critérios:

- I – falha adesiva entre esmalte/adesivo;
- II – falha coesiva entre adesivo/compósito;
- III – falha mista.

5.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do *software* Statgraphics Centurion (STATPOINT Technologies, Inc, USA). Inicialmente, foi verificada a normalidade da distribuição através do teste de Shapiro-Willk e a homogeneidade das variâncias através do teste de Levene. Com base nesta análise preliminar, os dados originais foram submetidos a análise de variância de dois fatores (Biofilme x Restauração provisória). Foi considerado o nível de significância de 5% para interpretação dos resultados.

6 RESULTADOS

6.1 Resistência de união

Os dados originais de resistência de união (MPa) foram submetidos a análise de variâncias de dois fatores (presença de biofilme x colocação de restauração provisória). O resultado da análise é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Análise de variâncias dos valores originais de resistência de união (MPa)

Fonte	Soma dos Quadrados	GL	Quadrados médios	F	p
Biofilme (B)	9,29148	1	9,29148	1,50	0,2311
Restauração provisória (RP)	0,00200008	1	0,00200008	0,00	0,9858
B x RP	17,7226	1	17,7226	2,85	0,1019
Resíduo	180,06	29	6,20896		
TOTAL	208,417	32			

Pelos valores de p , pode-se inferir que os fatores principais: presença de biofilme ($p = 0,2311$) e colocação de restauração provisória ($p = 0,9858$), bem como a interação dupla (presença de biofilme x colocação de restauração provisória, $p = 0,1019$) não apresentaram significância estatística.

A Figura 9 mostra o gráfico de barras dos valores médios de resistência de união (MPa).

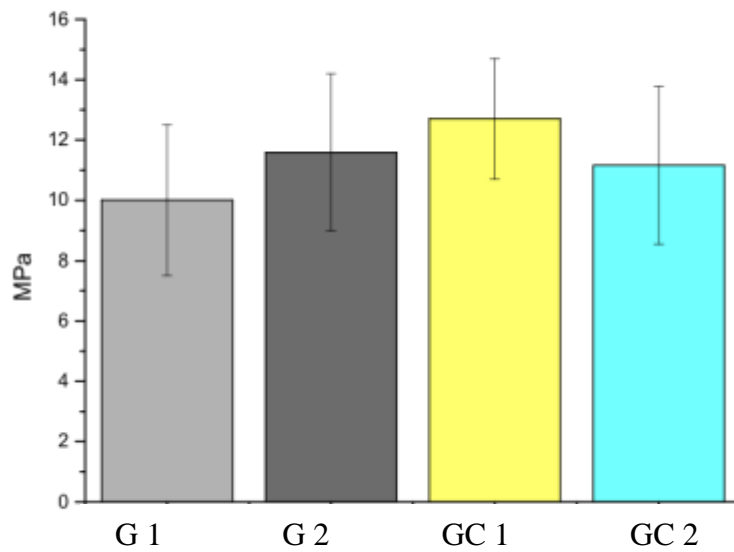


Figura 9 - Valores médios de resistência de união (MPa).

6.2 Microinfiltração

Os dados originais de microinfiltração (mm) foram submetidos a análise de variâncias de dois fatores (presença de biofilme x colocação de restauração provisória). O resultado da análise é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise de variâncias dos valores originais de microinfiltração (mm)

Fonte	Soma dos Quadrados	GL	Quadrados Médios	F	p
A:Biofilme	0,257301	1	0,257301	4,18	0,0542
B:Restauração provisória	0,172551	1	0,172551	2,81	0,1095
INTERAÇÃO					
AB	0,00717604	1	0,00717604	0,12	0,7362
Resíduo	1,22996	20	0,0614981		

Pelos valores de p , pode-se inferir que os fatores principais: presença de biofilme ($p = 0,0542$) e colocação de restauração provisória ($p = 0,1095$), bem como a interação dupla (presença de biofilme x colocação de restauração provisória, $p = 0,7362$) não apresentaram significância estatística.

Os valores em milímetros obtidos pelo exame dos observadores calibrados dos espécimes estão registrados na tabela 3.

Tabela 3 – Penetração do corante em milímetros.

Espécime	G1	G2	GC 1	GC 2
1	0.155mm	0mm	0.605mm	0,745mm
2	0.235mm	0.17mm	0mm	0.30
3	0.17mm	0.395mm	0.2mm	0.08mm
4	0mm	0mm	0.4mm	0.35mm
5	0.285mm	0.57mm	0.285mm	1,07mm
6	0mm	0.52mm	0.39mm	0.56mm

6.3 Análise do tipo de falha

Três observadores foram calibrados para realizar as medições da penetração de corante na interface esmalte-compósito. O gráfico 1 mostra os valores registrado pelos observadores, nota-se a prevalência da falha adesiva em todos os grupos estudados.

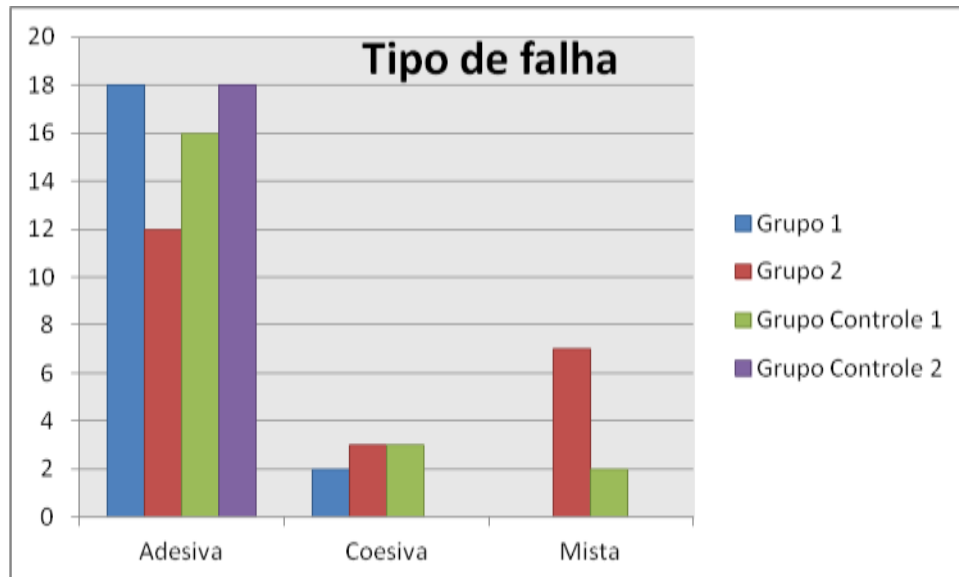


Gráfico 1 - Número de falha mais frequente.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo foi executado com o objetivo de verificar a influência de um material restaurador temporário, sem eugenol, sobre o mecanismo de adesão dos compósitos dentários. E, se dessa forma, analisar o possível surgimento da formação de fendas (*gap*) entre o material restaurador e o esmalte dentário devido à falta de adesão entre eles. É notória, a elevada utilização de um material restaurador provisório, sem eugenol, em situações clínicas, que necessitem de uma intervenção posterior à consulta inicial, tais como, em urgências odontológicas, em tratamentos protéticos e endodônticos, pois esses procedimentos possuem uma etapa na qual é realizada uma restauração provisória. Entretanto, essa mesma restauração provisória, realizada com o objetivo de preservar o remanescente dentário pode propiciar o surgimento de uma cárie secundária, precocemente, devido à presença de remanescente do material restaurador provisório aderido à estrutura do esmalte dentário impedindo a completa penetração do adesivo ao esmalte condicionado, prejudicando o microimbricamento mecânico e, deixando fendas entre a parede cavitária e o esmalte dentário.^{44,54,60}

Devido a grande incidência da cárie secundária, juntamente com um procedimento clínico, frequentemente, utilizado na rotina diária do odontólogo e,

diante dos relatos de diversos autores informando que ela é a razão mais importante para a falha de restaurações dentárias, sendo a responsável por 60% das substituições das restaurações na prática odontológica, respaldaram a execução da atual pesquisa *in vitro*. Os mesmos micro-organismos envolvidos na etiologia da cárie primária, também, desempenham um importante papel na cárie secundária.^{17,23,33,39} O desenvolvimento dessa cárie está diretamente relacionada ao surgimento e ao crescimento do biofilme adjacente a restauração, bem como a presença de fendas na interface dente-restauração.^{15,21}

Neste estudo foram avaliadas através dos testes de microcissalhamento e microinfiltração, duas amostras submetidas à ação de um biofilme cariogênico. Sendo comparadas amostras restauradas, diretamente, em compósito com aquelas que receberam uma restauração provisória, sem eugenol, antes de serem restauradas com o compósito.

Os testes "*in vitro*" empregados para a avaliação da infiltração marginal de materiais forradores e/ou restauradores à estrutura dentária se fundamentam, principalmente, na avaliação da penetração de corantes e, na análise de fendas entre a restauração e a estrutura dentária, na tentativa de simular as mesmas alterações que ocorrem durante a sua função no meio bucal.^{48,72}

A microinfiltração é definida como a passagem, clinicamente não detectável, de bactérias, fluidos, moléculas ou íons entre a parede cavitária e o material restaurador. É um fenômeno que envolve um mecanismo de difusão, por isso, o reconhecimento da relação dinâmica entre a estrutura dentária e o material restaurador. Ela é considerada um fator preponderante na longevidade da restauração e pode levar à degradação marginal, formação de cáries secundárias, sensibilidade pós-operatória, hipersensibilidade, podendo levar ao desenvolvimento de patologias pulpares.^{16,28,70}

A microinfiltração também contribui para a corrosão, dissolução ou descoloração de certos materiais restauradores. Esse problema se apresenta com maior gravidade nos compósitos, principalmente em função de algumas propriedades inerentes ao material, como por exemplo, a contração de polimerização, o coeficiente de expansão térmica do dente e da restauração que são diferentes, a sorção de água do material restaurador quando exposto ao ambiente oral, a qualidade da camada híbrida, a técnica de inserção, e a configuração das paredes cavitárias.^{70,71}

Há uma grande variação na escolha do corante utilizado nas análises da microinfiltração, existem soluções e suspensões de partículas de diferentes tamanhos. A concentração dos corantes utilizados também, pode variar entre 0,5% a 10%, enquanto o tempo de imersão do espécime no corante pode variar entre 4 e 72 horas ou mais, o que significa que diferentes concentrações de corantes podem variar no tempo de penetração entre 5 minutos e 1 hora. No presente estudo foi utilizado o azul de metileno a 3% imergindo as amostras por 4 horas. E, após esse período, elas foram retiradas do azul de metileno e lavadas por 5 minutos.

O método quantitativo foi utilizado neste estudo para análise da microinfiltração, pois ele é mais criterioso e apresenta resultados numéricos que podem ser repetidos por outro avaliador. Para a análise das amostras é necessário um microscópio com câmera acoplada para a captura das imagens observadas, bem como um computador e um software que interprete essas imagens que são interligados à câmera.²⁷

Os resultados obtidos demonstram não haver influência negativa no mecanismo de adesão das amostras estudadas, pois elas apresentaram valores, estatisticamente não significantes, conforme os registros da tabela 2. Eles refletem a metodologia utilizada, entretanto os resultados registrados por Hayati et al.²⁷, demonstram uma correlação positiva entre a infiltração marginal e a presença do biofilme cariogênico agindo por 7 e por 30 dias.

Para a avaliação da resistência de união foi utilizado o teste de microcissalhamento, pela facilidade de manipulação aliado a possibilidade de construir vários cilindros de compósito com 0,7mm de diâmetro, numa única amostra, possibilitando a obtenção de várias leituras e, conseqüentemente, realizar o cálculo da média desses valores. A maior dificuldade está na combinação da fixação dos microtubos, aderindo-os a superfície do esmalte condicionado, juntamente com a aplicação do adesivo no exato local da construção dos cilindros de compósito. As variações na espessura e na extensão do adesivo podem causar diferenças expressivas nos valores do teste.

Nas comparações dos valores obtidos com os estudos similares, nota-se que esses são diferentes entre si, em função das variantes na execução da técnica preconizada. A média da resistência adesiva ao microcissalhamento, obtida neste estudo, está de acordo com os estudos de Heintze et al.²⁸ e de Bahr et al.³. Eles

compararam a resistência de união através do teste de microcisalhamento de diferentes sistemas adesivos ao esmalte dentário e a materiais poliméricos.

O tipo de falha mais frequente apresentada neste teste de microcisalhamento foi a adesiva, conforme os resultados apresentados no gráfico nº 1, demonstrando ser o ponto de menor resistência de união entre a cavidade e o compósito.^{28,48,58,72} Esses resultados estão em consonância com as observações dos estudos de Bavbek et al.⁶. Eles relataram a elevada prevalência das falhas adesivas ocorridas nos testes de microcisalhamento de diferentes sistemas adesivos.

A cavidade oral abriga mais de 250 espécies microbianas. Ao contrário do epitélio bucal, o dente com a sua morfologia tem muitas áreas inacessíveis aos mecanismos de limpeza fisiológicos. Por isso, o dente torna-se um lugar ideal para a adesão de muitas dessas espécies. Esta adesão ocorre numa sequência metódica, sucessiva e progressiva. Os micro-organismos são capazes de se aderirem à película salivar sobre o dente e formam uma área conveniente para a subsequente agregação de outros micro-organismos que são incapazes de uma adesão inicial. Estes micro-organismos são todos endógenos, ou seja, fazem parte da microbiota oral do hospedeiro, eles não são agentes infecciosos externos. Em verdade, esta colonização natural do dente impede qualquer invasão por um micro-organismo exógeno fornecendo uma resistência à colonização por eles.^{35,42,68,69}

As cepas utilizadas nesse estudo, formada por *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, são muito prevalentes na cárie dentária. Entretanto, pode ser que a sua ação dentro deste estudo tenha sido prejudicada pela falta de interação com outros micro-organismos da cavidade oral. Pois, as variações nas condições da oferta de nutrientes, pH e composição salivar, hábitos alimentares e de higiene oral irão determinar a evolução ou paralisação da doença cárie. Não sendo possível controlar todas as condições, fica clara a limitação imposta ao estudo, o que não o invalida, pois a cárie é uma doença multifatorial.^{35,42,59,68,69}

Os resultados obtidos nos testes ora executados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, eles referendam os estudos prévios de que o material restaurador provisório, sem eugenol, não interfere na resistência de união ao esmalte e na microinfiltração.^{25,51,52,75}

8 CONCLUSÃO

O uso prévio do cimento temporário sem eugenol e a ação de um biofilme cariogênico não afetaram a resistência de união ao esmalte e a microinfiltração das restaurações. A utilização do condicionamento ácido total e uma cuidadosa limpeza da cavidade que receberá a restauração final, em compósito foram eficientes para promover uma correta união entre o esmalte e o compósito.

REFERÊNCIAS

1. Andrade AM et al. Evaluating resin-enamel bonds by microshear and microtensile bond strength tests: effects of composite resin. *J Appl Oral Sci*, 2010, 18(6):591-8.
2. Anusavice, KJ. *Phillips materiais dentários*.10a ed. Moreira JLM, tradutor. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan AS,1998.p 59.
3. Bähr N et al. Effect of different adhesives combined with two resin composite cements on shear bond strength to polymeric CAD/CAM materials. *Dent Mater J*, 2013, 32(3):492-501.
4. Barbosa RPS et al. Effect of cariogenic biofilm challenge on the surface hardness of direct restorative materials *in situ*. *Journal of Dentistry* 2012, doi:10.1016/j.jdent.2012.01.012.
5. Bauer JRO et al. Influence of ZOE temporary filling on resin dentin bond strength using different adhesive strategies. *ConScientiae Saúde*, 2008, 7(2):181-9.
6. Bavbek AB et al. Micro-shear bond strength of adhesive resins to enamel at different relative humidity conditions. *Dental Materials Journal* 2013; 32(3): 468–5.
7. Beyth N et al. *Streptococcus mutans* biofilm changes surface-topography of resin composites. *Dental Materials* 2008, 24:732-6.
8. Brambilla E et al. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater* 2009,25:1067-72.
9. Brandt WC et al. Influence of light-curing units on the flexural strength and flexural modulus of different resin composites. *Braz J Oral Sci*.April/June 2008- vol. 7-nº25.
10. Buonocore MG. A simple method of increasing adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces.*J Dent Res*. 1955, 34:849-53.

11. Buonocore, MG et al. A report on a resin composition capable of bonding to human dentin surfaces. *J Dent Res*. 1956;35:846-51.
12. Busscher HJ et al. Biofilm Formation on Dental Restorative and Implant Materials. *J Dent Res* 2010, 89(7):657-65.
13. Carlen A et al. Surface characteristics and *in vitro* biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials* 2001, 22:481-7.
14. Carvalho RM et al. A review of polymerisation contraction: the influence of stress development versus stress relief. *Oper Dent* 1996, 21:17-24.
15. Carvalho CN et al. Effect of Zoc temporary restoration on resin-dentin bond strength using different adhesive strategies. *J Esthet Restor Dent* 2007, 19:144–53.
16. Cenci MS et al. Relationship between gap size and dentine secondary caries formation assessed in a microcosm biofilm model. *Caries Research*, 2009, 43: 97-102.
17. Chaiyabutr Y, Kois JC. The effect of tooth-preparation cleansing protocol on the bond strength of self-adhesive resin cement to dentin contaminated with a hemostatic agent. *Operative Dentistry* 2011; 36:18–26.
18. Chrysanthakopoulos, NA. Replacement and longevity of composite resin-based restorations in permanent teeth in Greece. *International Dental Journal*, 2012, 62(3):161-6.
19. Collins CJ, Bryant RW, Hodge KL. A clinical evaluation of posterior composite resin restorations: 8-year findings. *J Dent* 1998, 26:311-17.
20. Dummer PMH, Harrison KA. *In vitro* plaque formation on commonly used dental materials. *J Oral Rehabil* 1982; 9:413–17.
21. Ermis RB et al. Bonding to ground versus unground enamel in fluorosed teeth. *Dental Materials* 2007, 23:1250–5
22. Feng L, Suha BI, Shortall AC. Formation of gaps at the filler–resin interface induced by polymerization contraction stress Gaps at the interface. *Dental Materials*, 2010, 26:719–29.

23. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials*, 2006, 22: 211-22.
24. Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G: Placement and replacement of composite restorations in Germany. *Oper Dent* 1995, 20:34-8.
25. Ganss C, Jung M. Effect of eugenol-containing temporary cements on bond strength of composite to dentin. *Operative Dentistry* 1998; 23:55–62.
26. Hansel C et al. Effects of various resin composite (co)monomers and extracts on two caries-associated micro-organisms *in vitro*. *J Dent Res* 1998,77:60-76.
27. Hayati F et al. An artificial biofilm induced secondary caries model for *in vitro* studies. *Australian Dental Journal*, 2011, 56: 40–7.
28. Heintze SD. Clinical relevance of test on bond strength, microleakage and marginal adaptation. *Dental Materials* 2013, 29:59-84.
29. Hori FS, Carvalho RCR. Experimental Adhesives with Different Hydrophilicity: Microshear Test in after 1, 7, and 90 Days' Storage. *J Adhes Dent* 2012; 14: 107–11.
30. Irie M, Suzuki K, Watts DC. Immediate performance of selfetching versus system adhesives with multiple light activated restoratives. *Dental Materials* 2004;20:873–80.
31. Jakubovics NS. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. *Molecular Oral Microbiology*, 2010, 25: 4–14 .
32. Kawai K, Tsuchitani Y. Effects of resin composite components on glucosyltransferase of cariogenic bacterium. *J Biomed Mater Res* 2000, 51:123-7.
33. Khalichi Pet al. The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of *Streptococcus mutans* gene expression. *Biomaterials* 2009, 30: 452-9.
34. Klausner LH, Green TG: Placement and replacement of amalgam restorations: a challenge for the profession. *Oper Dent* 1987, 12:105-12.

35. Lima FG et al. Influence of microleakage, surface roughness and biofilm control on secondary caries formation around composite resin restorations: an *in situ* evaluation. *J Appl Oral Sci.* 2009 17(1):61-5.
36. Lin J et al. Bonding of self-adhesive resin cements to enamel using different surface treatments: bond strength etching pattern evaluations. *Dental Materials*, 2010, 29(4): 425-32.
37. Lucena C et al. Statistical errors in microleakage studies in operative dentistry. A survey of the literature 2001–2009. *Eur J Oral Sci* 2011; 119: 504–10.
38. Matos AB et al. Effects of acid etching on dentin surface: SEM morphological study. *Braz Dent J.* v8, n.1, p 35-41, 1997.
39. Mjör IA, Moorhead JE, Dahl JE: Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *Int Dent J* 2000, 50:361-6.
40. Mjör IA. Frequency of secondary caries at various anatomical locations. *Oper Dent*, 1985, 10:88-92.
41. Mjör IA. The reasons for replacement and the age of failed restorations in general dental practice. *Acta Odontol Scand* 1997, 55:58-63.
42. Mo S et al. The microfloral analysis of secondary caries biofilm around class I and class II composite and amalgam fillings. *BMC Infectious Diseases* 2010, 10:241.
43. Moorthy A. et al. Cuspal deflection and microleakage in premolar teeth restored with bulk-fill flowable resin-based composite base materials. *Journal of Dentistry* 2012, 40:500-5.
44. Murray PE et al. Bacterial microleakage and pulp inflammation. *Dental Materials*. 2002, 18: 470-8.
45. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16:265-73.
46. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *Journal of Dentistry* 1997; 25:355–72.

47. Pashley DH. Clinical considerations of microleakage. *J Endod* 1990,16:70-7.
48. Perdigão J. Dentin bonding-Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials*, 2009, doi:10.1016/j.dental.2009.11.149.
49. Peris AR et al. Assessment of dentin bond strength, caries lesions depth and fluoride release. *Dental Materials*, 2007, 23:308–16.
50. Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry:The monomer systems. *Eur J Oral Sci*, 1997, 105: 97-116.
51. Peutzfeldt A, Asmussen E. Influence of eugenol-containing temporary cement on bonding of self-etching adhesives to dentin. *Journal of Adhesive Dentistry* 2006, 8:31–4.
52. Peutzfeldt A, Asmussen E. Influence of eugenol-containing temporary cement on efficacy of dentin-bonding systems. *European Journal of Oral Science* 1999;107:65–9.
53. Reis AF et al. Degradação das interfaces resina-dente: uma revisão da literatura. *Revista de Odontologia da UNESP* 2006, 35(3):191-9.
54. Ribeiro JC et al. The influence of temporary cements on dental adhesive systems for luting cementation. *Journal of Dentistry*, 2011, 39:255–62.
55. Sahar E et al. Effect of temporary cements on the bond strength of ceramic luted to dentin. *Dental Materials* 2005, 21:794-803.
56. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clinical Oral Investigation* 2003, 7:181-8.
57. Schmalz G, Ergucu Z, Hiller KA. Effect of dentin on the antibacterial activity of dentin bonding agents. *J Endod* 2004, 30:352-8.
58. Shimada Y et al. Microshear bond strength of dual resin cement to glass ceramic. *Dental Materials*,2002,18, 380-8.

59. Silva EM et al. Influence of organic acids presente in the oral biofilm on the microtensile bond strength of adhesive systems to human dentin. *J Biomed Mater Res* 2012, 100B: 735-41.
60. Silva JPL et al. Effect of eugenol exposure time and post-removal delay on the bond strength of a self-etching adhesive to dentin. *Operative Dentistry* 2011, 36-1, 66-71.
61. Skjorland KK. Bacterial accumulation on silicate and composite materials. *J Biol Buccale* 1976; 4:315–22.
62. Sousa RP et al. *In situ* effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent* 2009, 37:44-51.
63. Souza AR et al. Influência do eugenol na microdureza da resina composta utilizando sistemas adesivos atuais. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 2000, v14,nº3.237-42
64. Svanberg M, Mjor IA, Ørstavik D. Mutans Streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glassionomer restorations. *J Dent Res* 1990; 69:861–4.
65. Takahashi Y et al. Influence of resin monomers on growth of oral streptococci. *J Dent Res* 2004, 83:302-6.
66. Takimoto M et al. Influence of temporary cement contamination on the surface free energy and dentine bond strength of self-adhesive cements. *Journal of Dentistry* 2012, 40: 131–8.
67. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary selfetching systems I: depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dental Materials* 2001;17:296–308.
68. Usha C, Sathyanarayanan R. Dental caries- A complete changeover(part I). *J Conserv Dent*, 2009,12, issue 2, 46-53.
69. Usha C, Sathyanarayanan R. Dental caries- A complete changeover(part II). *J Conserv Dent*, 2009,12, issue 3,87 -100.
70. Van Dijken JWV, Pallesen U. A six-year prospective randomized study of a nano-hybrid resin composite in Class II. *Dental Materials* 2013, 29:191-8.

71. Van Landuyt K.L et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007, 28: 3757-85.
72. Van Meerbeeck B et al. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dental Materials*, 2010, 26:e100-e21.
73. Van Meerbeek B et al. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011, 27:17-28.
74. Watanabe EK et al. Effects of thermocycling on the tensile bond strength between resin cement and dentin surfaces after temporary cement application. *International Journal of Prosthodontics* 1999;12:230–5.
75. Yap AU et al. Influence of ZOE temporary restorations on microleakage in composite restorations. *Operative Dentistry* 2002; 27:142–6.