

LILIAN FERREIRA

Características bioquímicas e microbiológicas do  
biofilme dentário formado *in situ* sobre materiais que  
contêm flúor ou fosfato de cálcio amorfo

ARAÇATUBA

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LILIAN FERREIRA

Características bioquímicas e microbiológicas do  
biofilme dentário formado *in situ* sobre materiais que  
contêm flúor ou fosfato de cálcio amorfo

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontopediatria.

Orientadora: *Profa. Adj. Denise Pedrini*

Co-Orientador: *Prof. Adj. Alberto C. B. Delbem*

ARAÇATUBA

2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F383c Ferreira, Lilian.  
Características bioquímicas e microbiológicas do biofilme dentário formado in situ sobre materiais que contêm flúor ou fosfato de cálcio amorfo / Lilian Ferreira. -- Araçatuba : [s.n.], 2010  
80 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010

Orientador: Profa. Denise Pedrini

Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Selantes de fossas e fissuras 2. Placa dentária 3. Flúor  
4. Fosfatos de cálcio 5. Polissacarídeos

Black D27  
CDD 617.645

# *Dados Curriculares*

Nascimento: 12.12.1977 – UBERABA/MG

Filiação: Jorge Ferreira  
Geralda Terezinha Ferreira

2001/2007: Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2008/2010: Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

# Dedicatória

**Deus**, eu vos agradeço, **Senhor**, por me conceder a vida e por tudo que conquistei até hoje.

Agradeço, **Senhor**, pela sua compaixão, pela sua graça, pela sua bondade que estão sempre presentes, sustentado-me nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos pais, **Geralda e Jorge (in memoriam)**, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo e constante apoio. Amarei eternamente vocês!!!

**Mãe**, obrigada por me ajudar a trilhar os caminhos da vida, garantindo meus estudos e ajudando realizar meus sonhos. Amo muito você!!!

Aos meus queridos irmãos, **Edilene e Luiz Claudio**, pelo amor, incentivo e carinho sempre presente. Amo muito vocês!!!

Aos meus sobrinhos os anjinhos da minha vida **Lucas e Nicholas**. A titia ama muito vocês!!!

Aos meus amigos mais que especiais **Daniela Cristina de Oliveira, Marisol Corvino Nogueira e Renan Braguini** por todos os momentos que passamos juntos. Obrigada por sempre oferecerem o ombro amigo, dividindo as angústias e compartilhando as alegrias. Amo vocês!!!

Ao meu amigo **João Francisco Donda Domingues (in memoriam)**. Você estará eternamente em meu coração!!!

À minha orientadora **Profa. Dra. Denise Pedrini**, pela sua orientação repleta de ensinamentos, paciência, carinho, amizade, seriedade e exemplo de compromisso com a docência. Muito obrigada pela confiança depositada e por ter me dado oportunidade de tamanho aprendizado.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, pela participação ativa, direta e segura. Mostrando toda a paciência, apoio e dedicação. Seus ensinamentos e experiências foram muito valiosos para meu crescimento profissional. Admiro sua competência, inteligência e disponibilidade em ajudar.

*Meu reconhecimento, admiração e gratidão...*

# Agradecimentos Especiais

À **Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki**, pela dedicação, disponibilidade, auxílio e oportunidades oferecidas, minha eterna gratidão.

À **Profa. Dra. Ana Claudia Okamoto**, pelos conhecimentos oferecidos, dedicação, carinho e amizade. Serei eternamente grata!!!

Ao **Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior**, muito obrigada pela seriedade, oportunidades oferecidas e conhecimentos microbiológicos.

Ao **Prof. Dr. Robson Frederico Cunha**, muito obrigada pelas oportunidades oferecidas e pelos conhecimentos clínicos.

Exemplo de docência e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Mário Cilense**, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IQ/UNESP/Araraquara, muito obrigada pela paciência, disponibilidade em ajudar e importante colaboração a este trabalho.

# Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do Diretor **Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé** e Vice-Diretora **Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia**, por proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de graduação, pós-graduação e crescimento profissional.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Robson Frederico Cunha**.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, **Prof. Dr. Célio Percinoto**, **Prof. Dr. Robson Frederico Cunha**, **Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery** e **Profa. Dra. Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar**, por todos os ensinamentos transmitidos, pelo carinho e respeito. Minha eterna gratidão!!!

**A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**, por todos os ensinamentos ministrados e ótima convivência.

Às queridas amigas e voluntárias da pesquisa, **Ana Carolina da Graça Fagundes, Camila Camargo, Camila Juliana, Isabelle Rodrigues Freire, Jackeline Gallo do Amaral, Jorgiana Sangalli, Juliana Elias, Luciana Assunção, Michelle Maurício Manarelli, Renata Reis dos Santos e Tássia Araújo Henriques** meus sinceros agradecimentos pela seriedade, responsabilidade e cooperação que tiveram com a pesquisa.

Aos colegas do Laboratório, **Adelisa Rodolfo Ferreira Tiveron, Ana Carolina Soares Fraga Zaze, Ana Elisa de Mello Vieira, Ana Paula Dias, Carolina Simonetti Lodi, Daniele de Cássia R. Picco, Danielle Mendes da Câmara, Eliana Mitsue Takeshita, Fernanda Lourenção Brighenti, Isabelle Rodrigues Freire, Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves, Luciene Pereira de Castro, Marcelo Juliano Moretto, Marcelle Danelon, Maria Cristina Viana Arruda, Max Douglas Faria e Márcio José Possari dos Santos** muito obrigada pela amizade, convivência, alegria, e ajuda em vários momentos dentro do laboratório!!!

Às amigas do Curso de Mestrado em Odontopediatria, **Daniela Cristina de Oliveira, Emilene M.C. Missel, Fabíola Diogo de S. Frota, Jorgiana Sangalli e Natália Manrique** pelo companheirismo e relacionamento durante o curso, minha eterna amizade. Que Deus abençoe e ilumine suas vidas trazendo muito sucesso!!!

À **Tássia Araújo Henriques**, pela amizade e dedicação prestada no auxílio da parte experimental.

Ao funcionário da Disciplina de Odontopediatria, **Mário Luis da Silva**, pela amizade, convívio e dedicação na confecção dos dispositivos palatinos.

À funcionária da Disciplina de Odontopediatria, **Maria dos Santos Ferreira Fernandes**, pela amizade, carinho, auxílio da parte experimental e confecção dos dispositivos palatinos.

Ao **Claudio Fernando Ostini**, que vivenciou indiretamente o desenvolvimento deste trabalho e por ter colaborado na edição das imagens.

Aos funcionários da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Ilídio Teodoro Filho e Maria Bertolina Mesquita de Oliveira**, pela amizade e boa vontade com que sempre me auxiliaram.

Ao funcionário da Disciplina de Microbiologia, **Robson Varlei Ranieri**, pela convivência, estar sempre disposto em ajudar e amizade.

Aos professores da disciplina de Clínica Integrada, **Profa. Dra. Daniela Atili Brandini, Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda, Prof. Dr. José Carlos Monteiro de Castro, Profa. Dra. Sônia Regina Panzarini Barioni e Prof. Dr. Wilson Roberto Poi**, pela agradável convivência e incentivo.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Ana Cláudia Grieger Manzatti, Ana Paula Rímoli de Oliveira, Cláudio Hideo Matsumoto, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Luis Claudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Claudia de Castro Benez.**

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Diogo Luís Reatto, Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria Queiroz Marcondes Zagatto**, pelo excelente profissionalismo, atenção e simpatia dispensada.

**A todos os demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**, pela ajuda e atenção que sempre me dispensaram.

Ao meu amigo **Mateus Pereira**, que mesmo distante está bastante presente através da internet. Pela amizade, carinho e força!!!

Ao amigo **Kélio Garcia Silva** pela ajuda indispensável na realização da pesquisa, disponibilidade, seriedade e amizade.

Às minhas amigas de república, **Fernanda Garcia de Oliveira e Milene Moreira Silva**, pela amizade, convivência divertida e companheirismo. As lembranças estarão guardadas eternamente no coração. Que Deus abençoe e ilumine sempre o caminho de vocês !!!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por mais este indispensável apoio financeiro que possibilitou meu aprimoramento acadêmico e também o desenvolvimento científico.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro para realização do curso de mestrado.

À **todos aqueles que de certa forma contribuíram para elaboração e conclusão deste trabalho.**

***Meu muito obrigada !!!!!!!***

# *Epígrafe*

**“Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis.”**

**(Bertolt Brecht)**

# Resumo

Ferreira L. Características bioquímicas e microbiológicas do biofilme dentário formado *in situ* sobre materiais que contêm flúor ou fosfato de cálcio amorfo [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2010.

Muito tem se avaliado a respeito das propriedades físicas e químicas dos selantes de fósulas e fissuras, mas pouco sobre seus efeitos no biofilme dentário. O objetivo deste estudo foi analisar as características bioquímicas e microbiológicas do biofilme dentário formado *in situ* sobre materiais que liberam flúor ou cálcio e fosfato. Dez voluntários utilizaram dispositivo intrabucal palatino contendo corpos-de-prova de materiais (Fuji IX GP, Auralay XF e Aegis) ou blocos de esmalte bovino. A fase experimental consistiu de 4 etapas de 8 dias cada e a utilização de sacarose para formação do biofilme. No 7º dia dos períodos experimentais foi determinado o pH do biofilme e no 8º dia, o biofilme dentário formado foi coletado para determinação de flúor (F), cálcio (Ca), fósforo (P) e polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEI) além da microbiota. Verificou-se a liberação de F, Ca e P de cada material e dos blocos de esmalte após ciclagem de pH. Após a verificação da homogeneidade dos dados, testes paramétricos e não-paramétricos foram realizados para análise dos resultados ( $p < 0,05$ ). O biofilme dentário formado sobre os materiais que liberam flúor apresentou maior presença de F, Ca e P e menor número de estreptococos do grupo *mutans* quando comparado ao bloco de esmalte. Após o uso da sacarose (7º dia), o pH do biofilme foi maior na presença do material ionomérico. O biofilme sobre o material que contém fosfato de cálcio amorfo mostrou similar concentração de Ca e P, quando comparado aos materiais que contêm flúor, e uma ação tamponante no meio, sem efeito na microbiota. Concluiu-se que os materiais que liberam flúor aumentaram as concentrações de F, Ca e P e diminuíram a de PEI e a microbiota cariogênica do biofilme dentário; e o que contém fosfato de cálcio amorfo aumentou as concentrações de Ca e P.

Palavras-chave: Selantes de fossas e fissuras. Placa dentária. Acidificação. Flúor. Fosfatos de cálcio.

Polissacarídeos.

# Abstract

Ferreira L. Biochemical and microbiological characteristics of *in situ* dental plaque formed on materials containing fluoride or amorphous calcium phosphate [dissertation]. Araçatuba: São Paulo State University; 2010.

The chemical and physical properties of the pit and fissures sealants have been widely evaluated but rare researches focus on the effects on dental plaque. The aim of this study was to evaluate the biochemical and microbiological characteristics of the *in situ* dental plaque formed on materials that release fluoride or calcium and phosphate. Ten volunteers wore an intraoral palatal device containing specimens of materials (Fuji IX GP, Auralay XF and Aegis) or bovine enamel blocks. The experimental phase consisted of 4 stages with duration of 8 days each and use of sucrose to form the dental plaque. The dental plaque pH was determined at the 7<sup>th</sup> day of the experimental periods and the dental plaque was collected at the 8<sup>th</sup> day to determine the fluoride (F), calcium (Ca), phosphorus (P), insoluble extracellular polysaccharides (EPS) and microbiota. It was observed release of F, Ca and P from each material and from the enamel blocks after pH cycling. After verification of data homogeneity, parametric and non-parametric tests were performed ( $p < 0.05$ ). The dental plaque formed on the materials that release fluoride presented more F, Ca and P and reduced number of *Streptococcus mutans* in comparison to the enamel block. After use of sucrose (7<sup>th</sup> day), the dental plaque pH was higher with the presence of ionomeric material. The dental plaque on the material containing amorphous calcium phosphate exhibited similar Ca and P concentration compared to the ones on fluoride materials, and buffering action with no effect on the microbiota. It was concluded that the materials that release fluoride increased F, Ca and P concentrations, decreased EPS concentration and the cariogenic microbiota of the dental plaque; the amorphous calcium phosphate material increased concentrations of Ca and P.

Keywords: Pit and fissures sealants. Dental plaque. Acidification. Fluoride. Calcium. Phosphates. polysaccharides.

# Lista de Figuras

- Figura 1 Representação gráfica dos valores de pH (média  $\pm$ dp, n=10) em função do tempo (minutos) de acordo com cada grupo. Asterisco mostra igualdade e letras distintas mostram diferença entre os grupos em cada tempo (ANOVA;  $p < 0,001$ ). 35
- Figura 2 Representação gráfica da concentração (média  $\pm$ dp, n=10) de (A) flúor, (B) cálcio, (C) fósforo e (D) polissacarídeos extracelulares insolúveis de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença entre os grupos (Kruskal-Wallis;  $p < 0,05$ : F, Ca e P. ANOVA;  $p = 0,022$ : PEI). 36
- Figura 3 Representação gráfica dos valores de unidades formadoras de colônias (UFC, média  $\pm$ dp, n=10) de microrganismos totais (A;  $p < 0,001$ ), estreptococos totais (B;  $p = 0,065$ ) e estreptococos do grupo *mutans* (C;  $p < 0,001$ ) de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença entre os grupos (Kruskal-Wallis). 37
- Figura 4 Fotomicrografias da superfície inicial e final (após período intrabucal) do esmalte e materiais estudados. Aumento de 5000 X. 38
- Figura 5 Representação gráfica da concentração (média  $\pm$ dp, n=6) de (A) flúor, (B) cálcio e (C) fósforo liberado nas soluções Des e Re durante 7 dias. Letras distintas mostram diferença entre os grupos em cada dia (ANOVA;  $p < 0,001$ ). 40

# Lista de Abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µm	Micrometro
µg	Micrograma
µg F/mL	Micrograma de flúor por mililitro
µg F/mg	Micrograma de flúor por miligrama
µg F/cm <sup>2</sup>	Micrograma de flúor por centímetro quadrado
µg Ca/mg	Micrograma de cálcio por miligrama
µg Ca/cm <sup>2</sup>	Micrograma de cálcio por centímetro quadrado
µg P/mg	Micrograma de fósforo por miligrama
µg P/cm <sup>2</sup>	Micrograma de fósforo por centímetro quadrado
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL/mg	Micro litro por miligrama
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ANOVA	Análise de variância
Ca	Cálcio
CEP	Comitê de ética em pesquisa
Com.	Comércio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Corp.	Corporation
CT	Connecticut

Des	Desmineralizante
dp	Desvio padrão
et al.	E colaboradores
F	Flúor
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
<i>g</i>	Gravidade
g	Gramas
GMC	Geraldo Maia Campos
HCl	Ácido clorídrico
IL	Illinois
Inc.	Incorporation
Ind.	Indústria
Ionômero	Cimento de ionômero de vidro Fuji IX GP
KCl	Cloreto de potássio
Kg/mm <sup>2</sup>	Quilograma por milímetro quadrado
mg	Miligramas
LTDA	Limitada
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
mol L <sup>-1</sup>	Molaridade
mmol L <sup>-1</sup>	Milimolaridade
mV	Milivolt
MA	Massachusetts

MS	Mitis Salivarius
MSBS	Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose
n	Número de repetições
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
nm	Nanometro
NaOH	Hidróxido de sódio
NY	New York
p	Nível de significância
P	Fósforo
PEI	Polissacarídeo extracelular insolúvel
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Valor de correlação
Re	Remineralizante
ref.	Referência
RJ	Rio de Janeiro
S.A.	Sociedade anônima
Selante ACP	Selante de fôssula e fissura com fosfato de cálcio amorfo Aegis
Selante F	Selante de fôssula e fissura com flúor AuraLay XF
SP	São Paulo
TISAB	Tampão ajustador de força iônica total
Tris	Hidroximetil-aminometano
UFC	Unidade formadora de colônia
UFC/mg	Unidade formadora de colônia por miligrama
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USA	United States of America

VIP	Variable Intensity Polymerizer
VMG 1	Viability Medium Göteborg 1
500 X	Aumento de quinhentas vezes
5000 X	Aumento de cinco mil vezes
>	Maior
<	Menor
$\geq$	Maior ou igual
$\pm$	Mais ou menos
=	Igual

# Sumário

1 Introdução	23
2 Proposição	25
3 Material e Método	26
4 Resultado	35
5 Discussão	41
6 Conclusão	45
Referências	46
Anexos	52

# Introdução\*

Para alcançar sucesso nas restaurações dentárias ao longo do tempo, não apenas o desempenho do profissional, mas também as diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais exercem um papel importante [1]. Essas características dos materiais restauradores podem alterar a viabilidade microbiana e, por conseguinte, a extensão da colonização bacteriana no biofilme [1-5], além de afetar a adesão de microrganismos na superfície, o que pode interferir na própria estrutura do biofilme [6]. Dessa forma, a interação biológica entre os materiais restauradores e a microbiota bucal é um dos fatores que determina o prognóstico do tratamento restaurador.

O acúmulo do biofilme dentário sobre materiais restauradores influencia a saúde bucal, principalmente por sua relação direta no desenvolvimento da cárie dentária e das doenças periodontais [7]. Pressupõe-se que cariogenicidade do biofilme é influenciada por uma interação dinâmica de fatores da dieta, salivares, microbiológicos e bioquímicos [8]. Uma vez que a formação da cárie secundária ao redor de restaurações representa uma razão primária para substituição [9], há um aumento de interesse em usar materiais dentários que podem inibir a formação do biofilme [10].

Diferentes tipos de materiais liberam diversas substâncias [11,12], as quais exercem uma ação antibacteriana contra os microrganismos bucais, quer seja *in vitro* [11,13] ou *in vivo* [14]. A composição inorgânica do biofilme é relevante para a cárie dentária, pois as reservas de flúor, cálcio e fosfato inorgânico contribuem para a supersaturação do fluido do biofilme em relação ao esmalte dentário quando ocorrem decréscimos de pH devido a fermentação dos carboidratos [15]. Um alto nível de flúor no biofilme pode inibir o crescimento de bactérias acidogênicas e acidúricas como estreptococos do grupo *mutans* [16], o qual está relacionado com o início da cárie dentária [17,18]. Além disso, a concentração de elementos inorgânicos no biofilme apresenta uma relação inversamente proporcional

---

\* Normalização segundo a revista Dental Materials (Anexo A).

ao desenvolvimento de cárie [15]. Considerando-se os fatores bioquímicos envolvidos na cárie dentária, sugere-se que uma mudança na desmineralização esteja relacionada com maiores concentrações de polissacarídeos extracelulares insolúveis e menores concentrações de minerais inorgânicos no biofilme dentário [15,19,20].

A capacidade dos materiais contendo fluoreto de sódio ou fosfato de cálcio amorfo em interferir no processo de desmineralização e remineralização [21-24] é estudada com o desenvolvimento de novos produtos. Entretanto, pouco se têm estudado sobre os efeitos dos íons flúor, cálcio e fosfato na formação e desenvolvimento do biofilme dentário formado sobre os materiais. A composição bioquímica e a microbiota do biofilme, que estão relacionadas com o processo da cárie, podem ser alteradas pela saturação da matriz do biofilme com estes íons disponibilizados pelos materiais. Diante disso, seria importante verificar se selantes de fósulas e fissuras teriam uma ação significativa sobre o biofilme dentário que poderiam influenciar os efeitos bacterianos no esmalte dentário e na progressão da cárie.

# Proposição

O objetivo deste estudo foi analisar as características bioquímicas e microbiológicas do biofilme dentário formado *in situ* sobre materiais utilizados como selantes de fósulas e fissuras que contêm flúor ou fosfato de cálcio amorfo.

# Material e Método

## 1. Delineamento experimental

Este estudo envolveu experimento *in situ* cego cruzado e *in vitro* utilizando 3 materiais e blocos de esmalte dentário bovino. No estudo *in situ* participaram dez voluntários que utilizaram dispositivos palatinos contendo 4 corpos-de-prova de materiais ou blocos de esmalte fixados em “slots” para acúmulo de biofilme dentário. Quatro períodos experimentais tiveram duração de 8 dias com intervalo de descanso de 7 dias entre eles. Para o acúmulo do biofilme utilizaram-se solução de sacarose 20% e tela plástica para sua proteção. O pH do biofilme dentário formado foi determinado no 7º dia. No 8º dia o biofilme dentário foi coletado para análise da concentração de flúor (F), cálcio (Ca), fósforo (P) e polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEI) além da avaliação da microbiota. Posteriormente, foi realizada a análise por meio da microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos corpos-de-prova dos materiais e blocos de esmalte antes e após o período experimental intrabucal. No estudo *in vitro* corpos-de-prova de cada material e blocos de esmalte foram submetidos a períodos cíclicos em soluções desmineralizante (Des) e remineralizante (Re), por 7 dias. A cada final de ciclo, as soluções foram armazenadas para determinação do F, Ca e P liberados. As análises de microscopia e da liberação dos íons nas soluções Des e Re foram realizadas com objetivo de dar suporte aos achados do biofilme. Os resultados foram analisados estatisticamente considerando como fator de variação os materiais e as variáveis: pH, as concentrações de F, Ca e P do biofilme dentário e das soluções desmineralizante e remineralizante, polissacarídeos extracelulares insolúveis, microbiota e concentração de F na água ingerida pelos voluntários. As características de superfície foram submetidas à análise descritiva.

## 2. Seleção dos voluntários

Os voluntários somente participaram da pesquisa após a leitura da Carta de Esclarecimento ao

Voluntário e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) processo nº 2008-00973 (FOA – UNESP) (Anexo B). Foram selecionados 10 adultos jovens, com idade média de 25 anos, do gênero feminino, que apresentavam bom estado de saúde geral e bucal [8,24-27] e fluxo salivar não estimulado  $\geq 0,2$  mL/min [24,26]. Como critério de exclusão da amostra, não foram selecionados fumantes, aqueles que receberam aplicações de fluoreto pelo menos até 2 semanas antes do experimento, que possuíam doenças crônicas sistêmicas e que faziam ou tinham feito uso de medicamentos com atividade antimicrobiana ou capazes de afetar fluxo salivar, nos últimos 2 meses [28]. Ao exame clínico, os voluntários não apresentavam cárie, doença periodontal ou qualquer tipo de lesão na cavidade bucal [24].

### ***3. Materiais utilizados e obtenção dos corpos-de-prova e blocos de esmalte***

Foram utilizados o cimento de ionômero de vidro Fuji IX GP (GC Corporation, Hasunuma-cho, Itabashi-ku, Tokyo, Japan) (Ionômero) e os selantes de fósulas e fissuras AuraLay XF (Denali Corporation, Hanover, MA, USA) (Selante F) e Aegis (Bosworth, Skokie, IL, USA) (Selante ACP) (Anexo C). Para cada material, foram confeccionados 48 corpos-de-prova, obtidos a partir de matrizes metálicas que apresentavam uma cavidade de 4 mm de largura, 2 mm de altura e 4 mm de espessura (Anexo C).

Os materiais foram inseridos em um único incremento na cavidade da matriz, com o objetivo de evitar a inclusão de bolhas de ar durante os procedimentos de inserção. A seguir, a superfície do material foi coberta com tira matriz de poliéster, seguida da aplicação de uma lâmina de vidro. A fotopolimerização foi realizada com auxílio de aparelho fotopolimerizador (VIP, Bisco, Schaumburg, IL, USA) (Anexo C), por período de 40 segundos, nas superfícies superior e inferior [24]. Para o material convencional foi mantida uma carga de 170,0 g por 10 minutos até o endurecimento inicial. Após o endurecimento, os excessos foram cuidadosamente removidos. Todos os corpos-de-prova utilizados apresentaram-se sem bolhas e com as superfícies lisas (Anexo C).

Os blocos de esmalte (Esmalte) (4x2x4 mm) foram obtidos a partir da secção de incisivos bovinos utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4243 - Buehler, Lake Bluff, IL, USA) montado em cortadeira elétrica (Isomet Low Speed Saw - Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Após planificação da dentina, a superfície do esmalte foi desgastada (aproximadamente 120 µm) utilizando lixa de granulação 600 (Carbimet Paper Discs, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) em politriz (APL-4 - AROTEC S.A. Ind. e Com., Cotia, SP, Brasil). Em seguida, fez-se o polimento com as lixas de granulação 800 e 1200 (Carbimet Paper Discs, Buehler) e papel de feltro para polimento (TEXMET 1000, Buehler Polishing Cloth, Lake Bluff, IL, USA) e suspensão de diamante (1 micron base-água, Buehler, Lake Bluff, IL, USA), para o acabamento final (Anexos D e E). Para seleção dos blocos realizou-se teste de dureza de superfície utilizando microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA). Foram selecionados os blocos com dureza de superfície entre 340 e 390 Kg/mm<sup>2</sup>.

#### ***4. Protocolo do estudo in situ e instrução aos voluntários***

Cada voluntário selecionado foi submetido a uma moldagem do arco superior com alginato para confecção do modelo de gesso pedra e do dispositivo palatino em resina acrílica [8,19,24-26,29]. Dez dias antes do início da fase experimental [8,19,24] foi fornecido aos voluntários dentifrício não fluoretado [8,24-27,29], escova dentária, estojo de aparelho ortodôntico (acomodação do dispositivo) e instruções sobre higiene bucal (Anexo F).

O dispositivo palatino foi confeccionado em resina acrílica (Jet – Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo) e possuía 4 “slots” [19,24] com 3 mm de altura (Anexo G) para receber corpos-de-prova ou blocos de esmalte com 2 mm de altura, os quais foram fixados nos “slots” do dispositivo palatino com cera pegajosa, que permitiu o correto posicionamento (Anexo G). Telas plásticas (Peneira grande, ref. 0041, Plásticos Gonçalves LTDA., São Paulo) foram fixadas no acrílico deixando um espaço de 1 mm

entre a tela e o corpo-de-prova ou bloco de esmalte para permitir acúmulo do biofilme [15] e minimizar distúrbios mecânicos no mesmo (Anexo G).

O dispositivo palatino contendo 4 corpos-de-prova de cada material ou blocos de esmalte permaneceu na cavidade bucal por 8 dias e foi removido somente durante a higienização e as refeições [29-31]. A higienização bucal foi realizada 3 vezes ao dia e os dispositivos escovados, exceto nas regiões das telas plásticas, na superfície palatina (Anexo F). Para promover a formação do biofilme dentário, foram dispensadas 2 gotas, 6 vezes ao dia, de solução de sacarose 20% sobre cada corpo-de-prova e bloco de esmalte, em horários previamente estabelecidos (9:00, 11:00, 14:00, 16:00, 18:00, 20:00 horas). Após o gotejamento da sacarose, os dispositivos foram deixados por 5 minutos em repouso antes de retornarem à cavidade bucal, a fim de que a sacarose fosse difundida pelo biofilme. Entre os períodos experimentais houve um intervalo de espera de 7 dias [8,24-26], onde os voluntários continuaram utilizando dentifrício não fluoretado.

### ***5. Avaliação da acidificação do biofilme dentário***

O pH inicial do biofilme dentário, bem como sua alteração após o tratamento com sacarose 20%, foram determinados no 7º dia. A análise foi realizada de manhã, com os voluntários em jejum e sem realizar a higiene bucal. Para a análise, o dispositivo palatino permanecia na boca dos voluntários, em posição, e as avaliações do pH foram realizadas de acordo com Ribeiro et al. [32], com um microeletrodo de contato com ponta ultrafina (Beetroted® MEPH-3L, WPI, New Haven, CT, USA) conectado a um medidor de pH em combinação com um microeletrodo de referência (Analyser Comércio e Indústria LTDA, São Paulo, SP) (Anexo H). A extremidade ativa do microeletrodo foi inserida entre a tela plástica que recobria os corpos-de-prova ou blocos de esmalte, para tocar, diretamente, o biofilme dentário [33] (Anexo H).

O microeletrodo foi calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0 antes de cada sessão experimental. O pH foi determinado no biofilme em 2 pontos (mesial e distal) dos “slots” do dispositivo que continham os corpos-de-prova ou os blocos de esmalte. A média dos valores de pH

dos 2 lados foi calculada. Após a determinação do pH inicial, o dispositivo palatino foi removido e uma gota da solução de sacarose 20% foi aplicada em cada “slot”. Após 1 minuto, o dispositivo foi reposicionado na boca [33,34] e novas medidas de pH foram realizadas após 5, 15 e 30 minutos nos mesmos locais que as medidas iniciais.

### **6. Análise da microbiota do biofilme dentário**

No 8º dia, foi coletado o biofilme dentário, com os voluntários em jejum ao entregarem os dispositivos palatinos. A tela plástica que recobria os corpos-de-prova ou blocos de esmalte foi removida assepticamente em câmara de fluxo laminar e o biofilme foi coletado com auxílio de cureta estéril e inserido em tubos tipo eppendorf previamente pesados em balança analítica (AR2140 – Adventurer, Ohaus Corp., USA). A seguir, 5 mg de biofilme foram ressuspensos em caldo VMG 1 e submetidos a sonicação (Digital Sonicator - Modelo S400 - Misonix, Inc., Farmingdale, NY, USA) por 1 minuto (6 pulsos de 10 segundos cada - amplitude 5%). Após esse procedimento, o biofilme foi submetido a diluições seriadas em caldo VMG 1 para minimizar o contato com o oxigênio atmosférico.

No isolamento microbiano, de diluições seriadas pré-estabelecidas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas em ágar infuso de cérebro e coração suplementado com extrato de levedura (0,5%) e enriquecido com hemina (1 µg/mL), menadiona (5 µg/mL) e sangue desfibrinado de cavalo, para determinação do número total de microrganismos viáveis na amostra, enquanto o número de estreptococos bucais totais foi determinado em ágar Mitis Salivarius (ágar MS) e o total de estreptococos do grupo *mutans* foi avaliado em ágar Mitis Salivarius Bacitracina Sacarose (ágar MSBS) [35] (Anexo I). As placas foram incubadas em anaerobiose (90% N<sub>2</sub> + 10% CO<sub>2</sub>), em dessecadores de vidro do tipo Pyrex (Anexo I), por 7 dias (ágar infuso de cérebro e coração), 3 dias (ágar MS) e 3 dias (ágar MSBS).

A identificação das colônias de estreptococos e estreptococos do grupo *mutans* foi feita através de análise morfocolonial e morfocelular. Colônias escuras com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com aspecto rugoso, com ou sem a presença de uma gota na superfície (colônias mucóides), constituídas por

cocos Gram positivos dispostos em cadeias foram consideradas colônias típicas pertencentes ao gênero *Streptococcus*. De cada tipo morfológico de colônia presente nas placas de ágar MS e MSBS foi feito um esfregaço, corado pelo método de Gram, para observação das características morfotintoriais com objetiva de imersão. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada com auxílio de contador de colônias (Colony Counter Digital-S, J.P. Selecta, S.A., Barcelona, Spain) (Anexo I). Os dados foram expressos em UFC/mg de biofilme dentário (peso úmido).

### **7. Preparação do biofilme dentário para determinações bioquímicas**

O restante do biofilme foi desidratado em dessecador contendo pentóxido de fósforo (Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 12 horas, à temperatura ambiente, determinando-se, a seguir, o peso seco.

Em seguida, foi adicionado HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, na proporção de 250 µL/mg de peso seco de biofilme. Após 3 horas sob agitação constante em mesa agitadora orbital plana (TE-420 - Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) à temperatura ambiente, o mesmo volume de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado ao microtubo. As amostras foram centrifugadas (Hanil - Combi - 514 R, Incheon, South Korea) a uma velocidade de 11000 g por 1 minuto, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi utilizado para determinar as concentrações de F, Ca e P [34]. Ao precipitado foi adicionado NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (500 µL/mg de peso seco de biofilme). As amostras foram homogeneizadas em vórtex (AP-56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil), por 1 minuto, agitadas por 3 horas à temperatura ambiente e centrifugadas por 1 minuto (11000 g) [36]. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 75% refrigerado, em uma quantidade de três vezes o volume do sobrenadante obtido e as amostras permaneceram no freezer a -30°C por aproximadamente 12 horas (“overnight”). A seguir, foi realizada uma nova centrifugação e o precipitado obtido foi ressuspensionado em NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> [37] para a dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis, pelo método colorimétrico de fenol-sulfúrico [38].

## 8. Ciclagem de pH

Corpos-de-prova de cada material e blocos de esmalte (n=6) foram colocados aleatoriamente em tubos de ensaio de polipropileno com tampa, suspensos por um fio de aço inoxidável. Cada tubo continha 2 mL das soluções desmineralizante (Des) ou remineralizante (Re) [39]. Inicialmente, os corpos-de-prova e blocos de esmalte foram armazenados 6 horas em solução Des (2,0 mmol L<sup>-1</sup> Ca e P, em tampão acetato 75 mmol L<sup>-1</sup>) com pH 4,6. Em seguida, as amostras foram transferidas para novos tubos contendo solução Re (Ca 1,5 mmol L<sup>-1</sup>, P 0,9 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 150 mmol L<sup>-1</sup> em tampão Tris 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0), permanecendo por 18 horas. Estes procedimentos foram repetidos durante 7 dias.

Os tubos foram deixados sob agitação constante (mesa agitadora TE-420 Orbital - Tecnal), à temperatura de 37±1°C (Anexo J). Os corpos-de-prova e os blocos de esmalte foram lavados com água deionizada e secos com papel absorvente antes de serem imersos em nova solução. As soluções foram recolhidas, diariamente, identificadas e armazenadas em tubos de ensaio de polipropileno a 4°C para leitura do flúor, cálcio e fósforo liberados (Anexo J).

## 9. Análise da concentração de flúor, cálcio e fósforo do biofilme dentário e das soluções Des e Re

O flúor do biofilme dentário foi analisado com o eletrodo íon específico (Orion, 9409, Orion Research Inc., Beverly, MA, USA) e um microeletrodo de referência (Analyser), acoplados a um analisador de íons (Orion 720 A) (Anexo K). O conjunto foi calibrado utilizando os padrões de concentração de flúor de 0,08 a 1,28 ou de 0,0625 a 1,0 µg F/mL, obtidos por diluição seriada, acrescido de TISAB II (“tampão ajustador de força iônica total”). Para as dosagens foram pipetados 0,04 mL da amostra e acrescentado 0,04 mL de TISAB II e as leituras (duplicata) foram realizadas em mV, sendo transformadas em µg F/mg de biofilme.

Para a dosagem de flúor das soluções Des e Re, o eletrodo (Anexo K) foi calibrado com soluções padrão de 0,0625 a 1,0 ou de 0,25 a 4,0 µg F/mL. Para as dosagens foram pipetadas 0,8 mL das soluções e acrescido 0,8 mL de TISAB II. As leituras foram realizadas sob agitação constante de

agitador magnético (TE-081 - TECNAL) (Anexo K). As concentrações de flúor das soluções foram determinadas separadamente ( $\mu\text{g F/cm}^2$  de área de material). Posteriormente, os resultados das soluções Des e Re foram somados (Des+Re), completando um período de 24 horas e um ciclo da metodologia utilizada (ciclagem de pH).

As concentrações de cálcio do biofilme dentário e das soluções Des e Re foram determinadas pelo método colorimétrico utilizando-se Arsenazo III, de acordo com o método descrito por Vogel et al. [40], em placas de 96 poços (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo 92096 – TPP, Switzerland). Alíquotas de 0,015 mL (duplicata) do biofilme e 0,005 mL das soluções Des e Re foram utilizadas para as leituras em leitor de placas (PowerWave 340, Biotek), no comprimento de onda de 650 nm (Anexo L). Esses valores foram convertidos para  $\mu\text{g Ca/mg}$  e  $\mu\text{g Ca/cm}^2$ , respectivamente.

As dosagens do fósforo do biofilme dentário (alíquota de 0,1 mL) e das soluções Des e Re (alíquota de 0,05 mL) foram realizadas conforme descrito por Fiske e Subbarow [41]. As leituras em duplicata foram realizadas em espectrofotômetro (Hitachi U-1100 UV/Vis spectrophotometer - Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) (Anexo L) no comprimento de onda de 660 nm. Esses valores foram convertidos para  $\mu\text{g P/mg}$  e  $\mu\text{g P/cm}^2$ , respectivamente.

### ***10. Análise da concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis do biofilme dentário***

A concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis foi determinada colorimetricamente pelo método fenol-sulfúrico [38]. Realizou-se uma curva de calibração, com padrões contendo 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g}$  de glicose (utilizou-se uma solução de glicose estoque fresca, contendo 100  $\mu\text{g}$  glicose/mL). Todas as análises foram feitas em duplicata utilizando 0,2 mL da amostra e espectrofotômetro (Hitachi U-1100 UV/Vis spectrophotometer - Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) (Anexo L) no comprimento de onda de 490 nm e os valores foram expressos em  $\mu\text{g}$  glicose/mg de biofilme.

### ***11. Análise da concentração de flúor na água ingerida pelos voluntários***

Foi coletada 10 mL da amostra de água ingerida por cada voluntário, no segundo e quinto dia de cada período experimental, para dosagem de flúor utilizando um eletrodo específico combinado para íon flúor (9609 BN – Orion) e analisador de íons digital (Orion 720 A) (Anexo K), previamente calibrado com soluções padrão (0,25 a 4,0 µg F/mL) [24]. Foi pipetado 0,5 mL da amostra, em duplicata, e acrescentou-se TISAB II na proporção 1:1, sendo as dosagens realizadas sob agitação constante (TE-081 – TECNAL) (Anexo K). Os valores foram expressos em µg F/mL.

### ***12. Microscopia eletrônica de varredura***

Os corpos-de-prova de cada material e os blocos de esmalte antes (n=2) e após (n=2) o período experimental intrabucal foram levados ao aparelho de metalização SCD 050 (BAL-TEC S.A., Tokyo, Japan) (Anexo M) para a deposição de uma camada de 20 nm de ouro. Após esse procedimento, os corpos-de-prova foram levados ao microscópio eletrônico de varredura SM-300 (TOPCON, Tokyo, Japan) (Anexo M). As imagens foram realizadas com aumento de 500 (Anexo N) e 5000 vezes. Análise descritiva foi realizada verificando a presença ou não de alterações superficiais.

### ***13. Análise estatística***

O programa GMC (versão 2002) foi utilizado com limite de significância de 5% [42]. Os dados de flúor e fósforo liberados nas soluções Des e Re, após transformação apresentaram distribuição normal e homogênea (Teste de Cochran). Análise de Variância paramétrica (two-way ANOVA) foi utilizada para os dados de flúor, cálcio e fósforo nas soluções Des e Re e pH do biofilme seguido pelo teste de Tukey e Bonferroni para os dados de polissacarídeos extracelulares insolúveis. Os dados de flúor, cálcio, fósforo, microbiota no biofilme dentário e flúor na água ingerida pelos voluntários apresentaram-se heterogêneos e foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Miller. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre as variáveis acima para determinar a presença de influência entre elas.

## Resultado

Quanto à avaliação do pH do biofilme dentário, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos nos tempos inicial e de 5 min (Figura 1). No tempo de 15 min, o Ionômero foi semelhante ao Selante ACP ( $p>0,05$ ) e diferente dos demais grupos ( $p<0,05$ ). Os grupos Esmalte, Selante F e Selante ACP foram estatisticamente semelhantes. No tempo de 30 min, o Ionômero foi estatisticamente diferente dos demais grupos. O Selante F e o Selante ACP apresentaram resultados similares ( $p>0,05$ ) e o Esmalte menor valor médio de pH ( $p<0,05$ ).

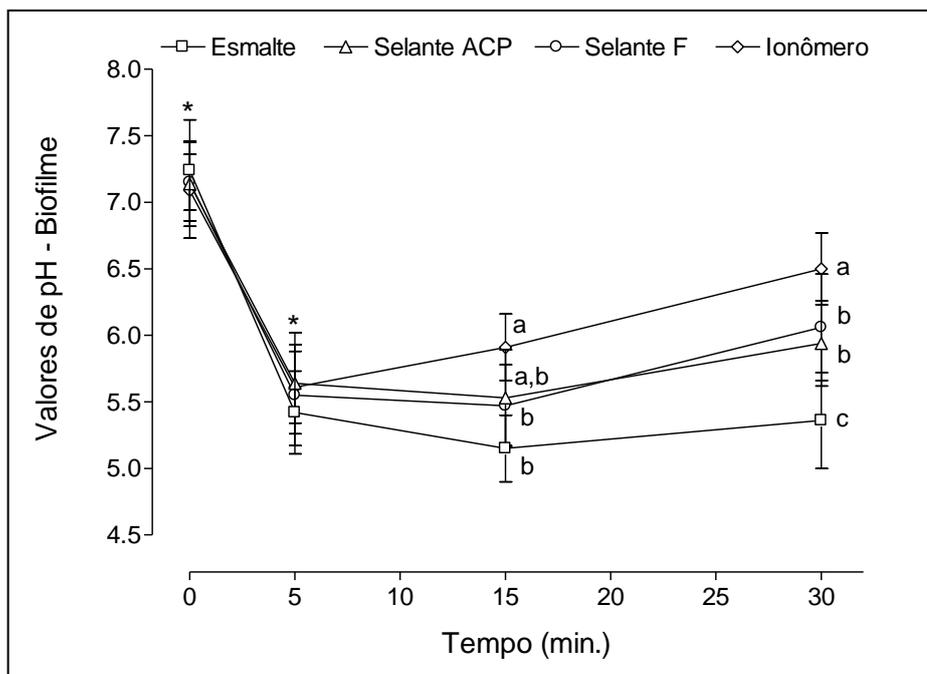


Figura 1 – Representação gráfica dos valores de pH (média  $\pm$ dp, n=10) em função do tempo (minutos) de acordo com cada grupo. Asterisco mostra igualdade e letras distintas mostram diferença entre os grupos em cada tempo (ANOVA;  $p<0,001$ ).

A concentração de F no biofilme dentário (Figura 2A), mostrou que o grupo Esmalte foi estatisticamente semelhante ao Selante ACP e diferente do Selante F e Ionômero, os quais apresentaram diferenças estatísticas. Quanto à concentração de Ca presente no biofilme (Figura 2B),

os grupos Selante ACP, Selante F e Ionômero, foram estatisticamente semelhantes entre si, porém diferentes do Esmalte. Para a concentração de P no biofilme dentário (Figura 2C), o Esmalte foi significativamente diferente dos grupos Selante ACP, Selante F e Ionômero, sendo estes semelhantes entre si ( $p>0,05$ ). A análise da concentração de PEI (Figura 2D), mostrou que o Esmalte, Selante F e Ionômero foram estatisticamente semelhantes entre si e diferentes do Selante ACP ( $p<0,05$ ). Observou-se correlação entre F e P ( $r=0,347$ ;  $p=0,028$ ) e Ca e P no biofilme ( $r=0,848$ ;  $p<0,001$ ).

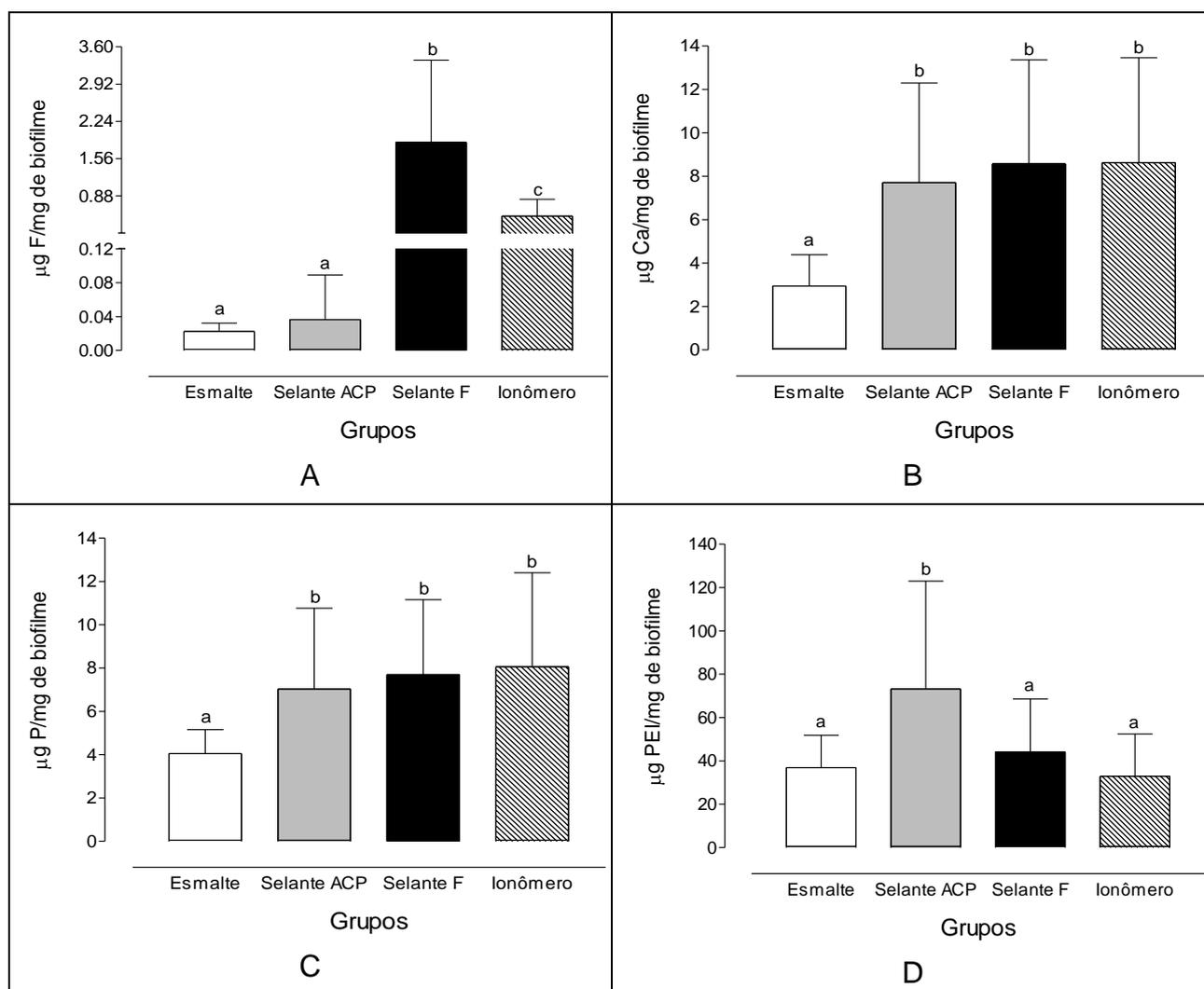
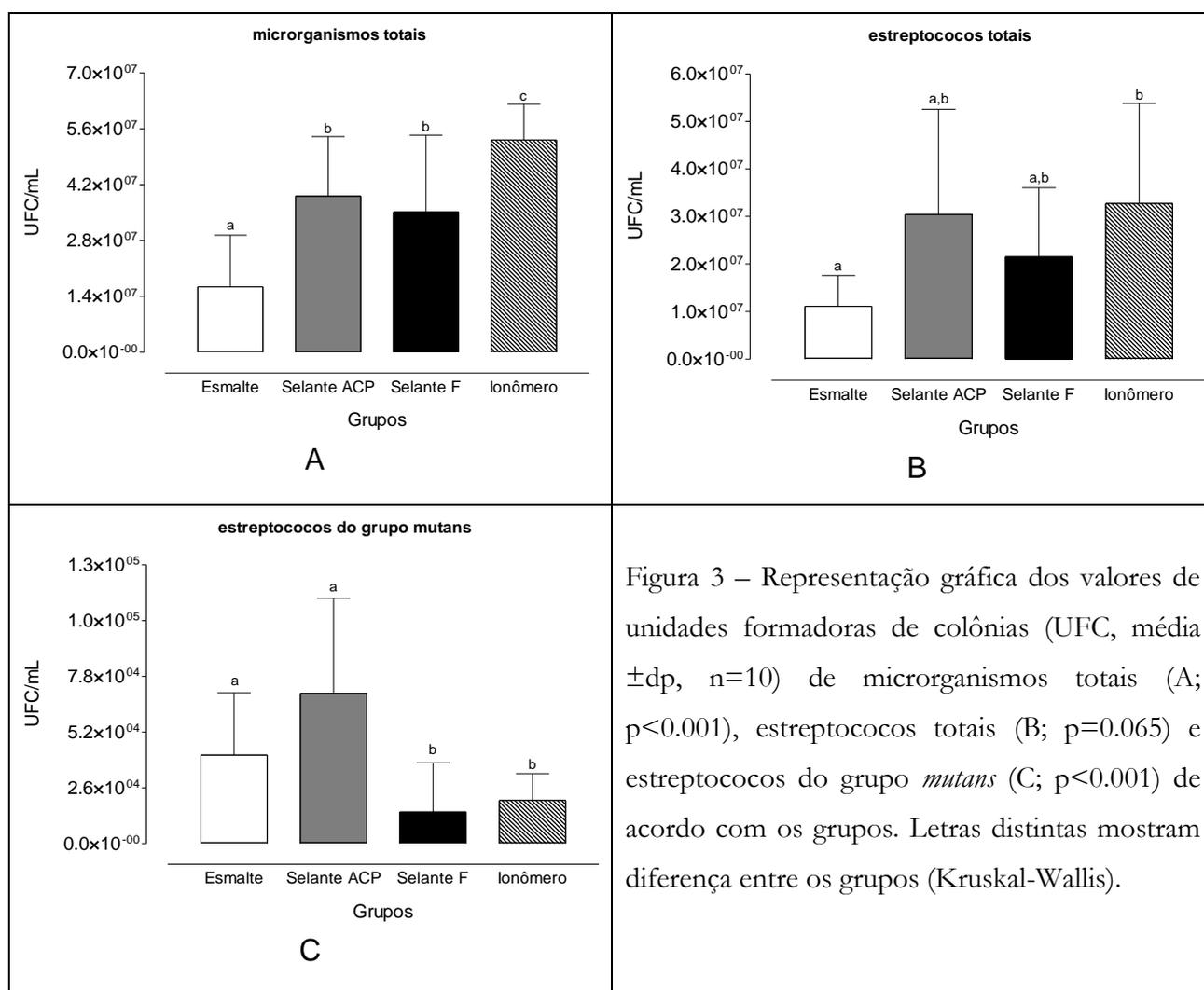


Figura 2 – Representação gráfica da concentração (média  $\pm$ dp,  $n=10$ ) de (A) flúor, (B) cálcio, (C) fósforo e (D) polissacarídeos extracelulares insolúveis de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença entre os grupos (Kruskal-Wallis;  $p<0,05$ : F, Ca e P. ANOVA;  $p=0,022$ : PEI).

Na análise da microbiota do biofilme dentário, observou-se que os valores obtidos para o número total de microrganismos cultiváveis com os grupos Selantes ACP e Selante F foram estatisticamente

semelhantes entre si e diferentes do grupo Esmalte e Ionômero (Figura 3A). No que concerne ao número de estreptococos totais (Figura 3B), os grupos Esmalte, Selante ACP e Selante F foram estaticamente semelhantes entre si, porém analisando-se o Esmalte e Ionômero, estes foram significativamente diferentes. Em relação à quantificação de estreptococos do grupo *mutans* (Figura 3C), os grupos Esmalte e Selante ACP mostraram valores mais elevados de cocos cariogênicos e estatisticamente semelhantes entre si e diferentes do Selante F e Ionômero, os quais apresentaram resultados semelhantes entre si ( $p>0,05$ ).



A Figura 4 apresenta as fotomicrografias em microscopia eletrônica de varredura das superfícies de esmalte e materiais estudados, em aumento de 5000 X.

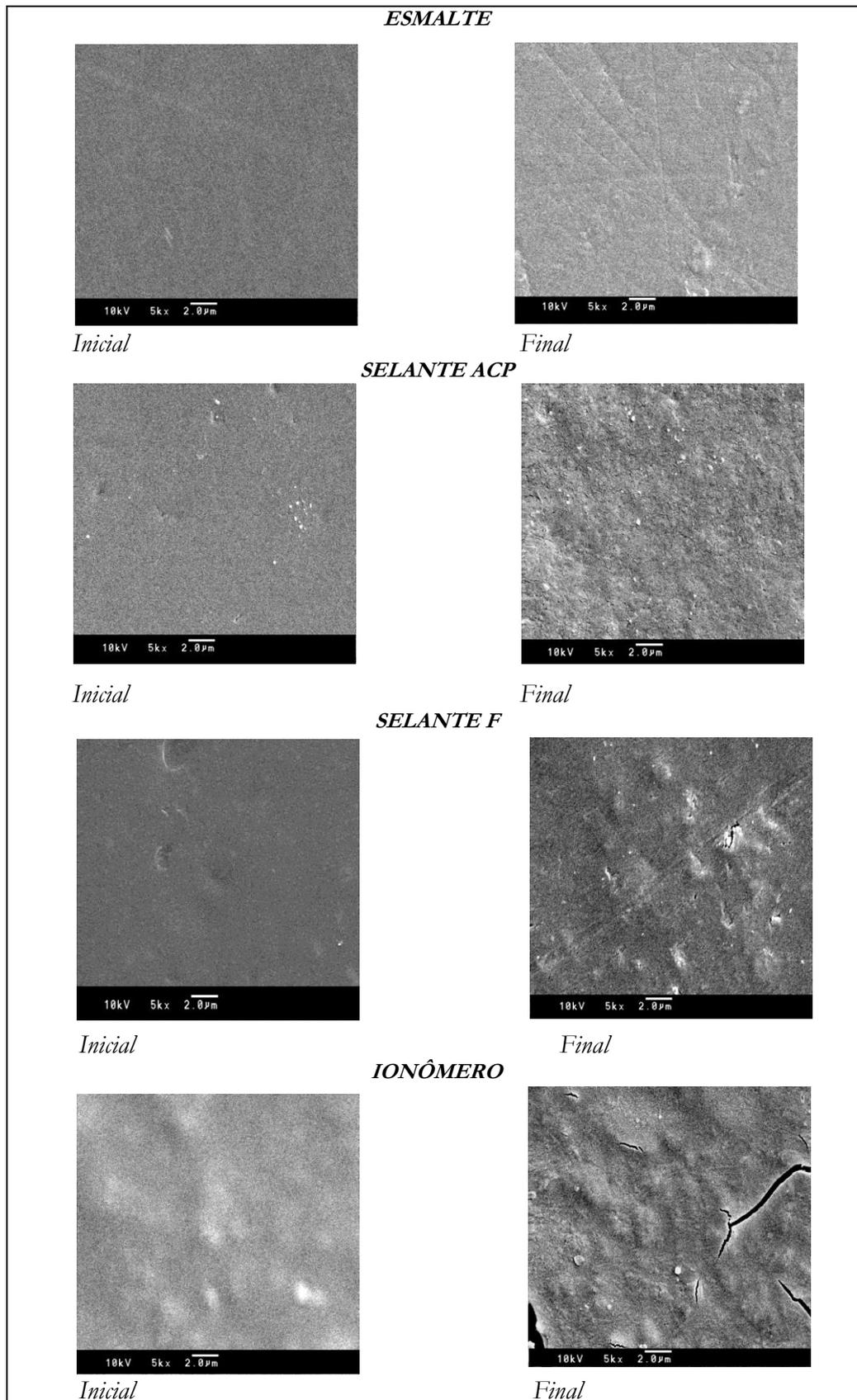


Figura 4 – Fotomicrografias da superfície inicial e final (após período intrabucal) do esmalte e materiais estudados. Aumento de 5000 X.

Antes do período intrabucal, o Ionômero apresentou uma superfície mais irregular quando comparados aos demais grupos. Após 8 dias, todos os materiais sofreram influência do biofilme dentário quando comparados ao Esmalte, porém o Ionômero mostrou-se mais alterado (Figura 4).

A análise da concentração de flúor na água ingerida pelos voluntários durante o período do experimento, mostrou valores médios semelhantes (Kruskal-Wallis;  $p=0,995$ ):  $0,46 \pm 0,49 \mu\text{g F/mL}$  (Esmalte),  $0,39 \pm 0,45 \mu\text{g F/mL}$  (Selante ACP),  $0,44 \pm 0,46 \mu\text{g F/mL}$  (Selante F) e  $0,44 \pm 0,47 \mu\text{g F/mL}$  (Ionômero) (máximo 1,15 e mínimo 0,01) (Anexo O).

O material que mostrou maior liberação de F na solução Des e Re foi o Selante F ( $p<0,05$ ) seguido pelo Ionômero quando comparados ao Esmalte e Selante ACP (Figura 5A) que apresentaram resultados semelhantes ( $p>0,05$ ). O Selante ACP liberou maior concentração de Ca (Figura 5B) nos dois dias iniciais quando comparado ao Esmalte ( $p<0,05$ ) e resultados similares entre o 3° e 5° dia ( $p>0,05$ ). O Selante F e o Ionômero apresentaram os menores valores de Ca liberado nas soluções Des e Re em relação aos demais grupos ( $p<0,05$ ). A quantidade de P (Figura 5C) liberada pelo Selante ACP foi maior no 1° dia, quando comparado aos demais grupos ( $p<0,05$ ) e similar ao Esmalte entre o 2° e 6° dia ( $p>0,05$ ). Houve correlação entre o F presente no biofilme dentário e o F liberado nas soluções Des e Re ( $r=0,982$ ;  $p=0,018$ ).

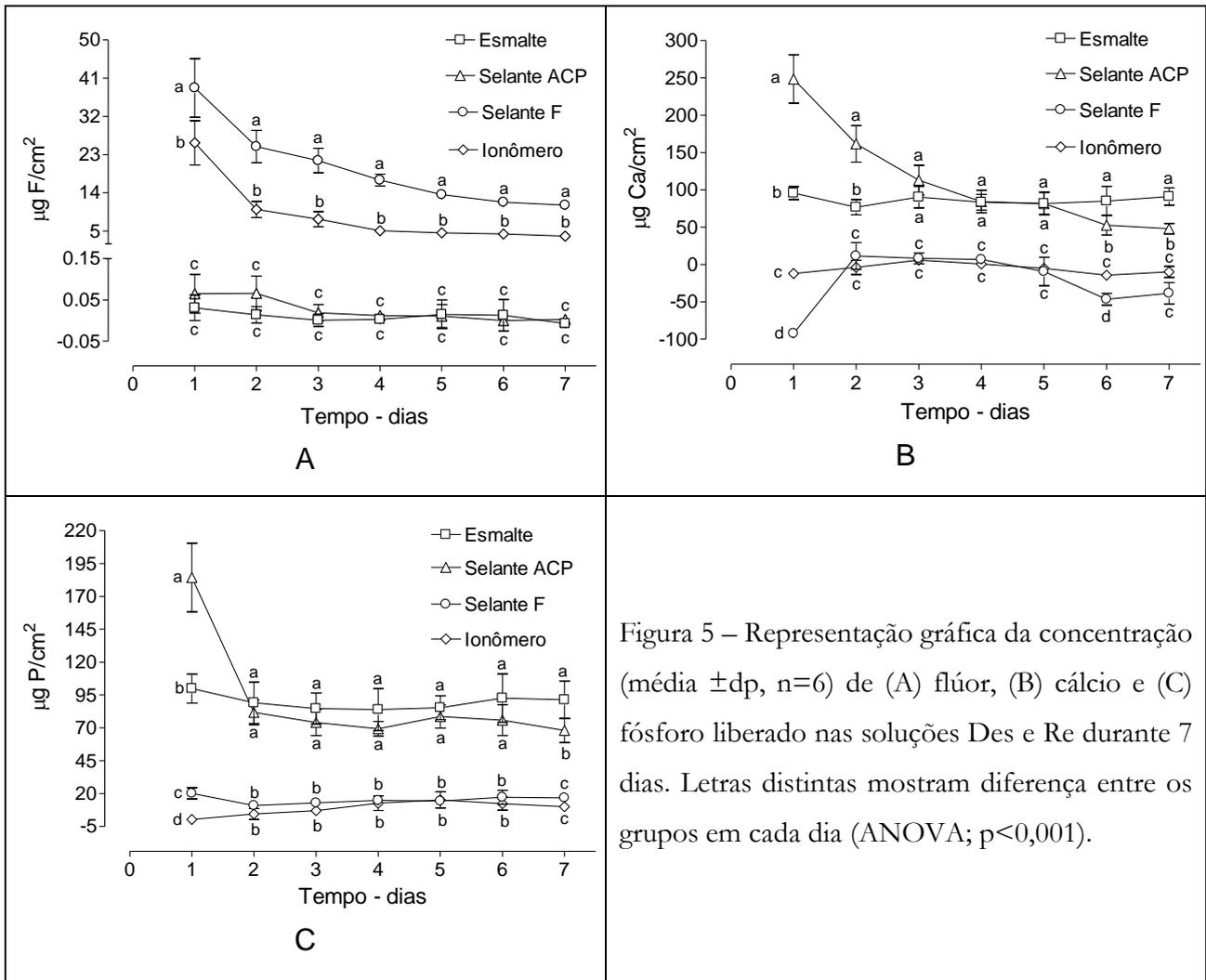


Figura 5 – Representação gráfica da concentração (média ±dp, n=6) de (A) flúor, (B) cálcio e (C) fósforo liberado nas soluções Des e Re durante 7 dias. Letras distintas mostram diferença entre os grupos em cada dia (ANOVA; p<0,001).

## Discussão

Os materiais que contêm flúor ou cálcio e fosfato na sua composição foram desenvolvidos para liberar estes íons ao meio com o objetivo de inibir a perda mineral e/ou ativar a remineralização da estrutura dentária adjacente. Neste sentido, além de disponibilizarem estes íons ao dente, têm a capacidade de saturar o biofilme dentário podendo alterar seu potencial cariogênico. As concentrações de flúor, cálcio e fósforo no biofilme determinam as saturações minerais do dente no meio ambiente bucal [43-45]. Para determinar o quanto esta liberação de íons dos materiais é importante, neste estudo, os materiais foram submetidos à formação de um biofilme dentário *in situ* utilizando a sacarose como substrato cariogênico.

Estudos que verificaram o papel da sacarose na formação de um biofilme cariogênico mostram que um aumento na frequência [19,46] e concentração [33] produz uma diminuição nas concentrações de cálcio, fósforo e flúor, bem como, um aumento nos polissacarídeos extracelulares insolúveis na matriz. A subsaturação desses íons no biofilme está relacionada à maior perda mineral do esmalte [33,46,47]. No presente estudo, a maior concentração de flúor no biofilme (Figura 2A) foi propiciada pelos materiais que mostraram grande liberação deste íon nas soluções Des e Re (Figura 5A) evidenciada pela presença de correlação entre estes dados. Este acréscimo de flúor ao biofilme não teve influência da água de abastecimento, pois a concentração ingerida pelos voluntários durante cada período experimental não diferiu. A baixa concentração de flúor nos grupos Esmalte e Selante ACP confirmam estes dados (Figura 2A). A maior concentração de cálcio e fósforo no biofilme do grupo Selante ACP foi explicada pela grande disponibilidade destes íons observada nas análises das soluções Des e Re (Figura 5B e C). De acordo com estas análises, não há liberação de Ca e P pelos grupos Selante F e Ionômero, porém observam-se concentrações semelhantes destes íons ao grupo Selante ACP no biofilme dentário. Os resultados de Ca e P para os grupos Selante F e Ionômero confirmam a

saliva como uma importante fonte desses íons, pois estes materiais não apresentam capacidade de liberá-los (Figura 5B e C). Segundo Pessan et al. [48] e Whitford et al. [49], as concentrações de flúor no biofilme estão diretamente relacionadas às concentrações de cálcio, mostrando que a maior quantidade de cálcio retida no biofilme nos grupos Selante F e Ionômero foi devido à capacidade destes disponibilizarem flúor ao meio. Com o Selante ACP não se observou uma maior presença de flúor com a liberação de Ca no biofilme, provavelmente pela pouca disponibilidade de flúor pela saliva, verificada pela baixa concentração média de flúor na água ingerida pelos voluntários dentro de cada grupo. Apesar de não haver relatos na literatura sobre a influência do flúor na concentração de fósforo no biofilme os resultados do presente estudo mostram uma correlação entre F e P. Esta correlação pode ser indireta e estar relacionada ao cálcio já que uma correlação também foi observada entre o Ca e P.

Como os materiais apresentaram capacidade de saturar o biofilme dentário com Ca, P e F quando comparado ao grupo Esmalte, a determinação da influência desses íons sobre a microbiota bucal tornou-se necessária. A quantidade de microrganismos totais não foi influenciada pela maior concentração de íons no biofilme sobre os materiais. Um fator que pode ter contribuído é a característica superficial dos materiais (Figura 4), uma vez que as propriedades superficiais têm importante papel na adesão e colonização bacteriana das restaurações [50]. O início da colonização bacteriana é caracterizado por efeitos nas propriedades físico-químicas superficiais dos materiais restauradores e pelo mecanismo ativo e passivo de aderência bacteriana, geralmente envolvidos com adesão ao substrato subjacente [51]. A menor presença de microrganismos no grupo Esmalte (Figura 3A) pode estar relacionada ao preparo dos blocos que produziu uma superfície lisa (Figura 4), diferente da superfície ao natural. Estas observações mantiveram-se com os dados da quantidade de estreptococos totais (Figura 3B). Apesar das características superficiais estarem mais alteradas nos grupos Selante ACP, Selante F e Ionômero, observou-se uma redução do número de estreptococos do grupo *mutans* nos grupos que disponibilizaram flúor ao biofilme dentário. A característica superficial alterada e menor concentração de flúor com o grupo Selante ACP produziram resultados similares ao grupo Esmalte (Figura 3C). Estes dados suportam a idéia de que a liberação de flúor deve estar

envolvida na redução de microrganismos cujo metabolismo depende da ação de enzimas sacarolíticas, sensíveis à inibição pelo flúor, como os estreptococos do grupo *mutans* [52].

O flúor está relacionado não somente com a supressão seletiva de alguns patógenos bucais, mas também com a inibição da síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis [53]. No presente estudo, a produção de PEI do biofilme sobre os materiais que liberaram flúor foi semelhante a do grupo Esmalte (Figura 2D). Uma ação semelhante foi observada provavelmente devido às alterações superficiais nos grupos Selante F e Ionômero, que estiveram relacionados a uma contagem maior de microrganismos totais e estreptococos totais. Entretanto, é possível observar algum efeito, pois a síntese de PEI foi menor quando comparada a um material que não libera flúor (Selante ACP). Apesar de disponibilizar Ca e P para o meio (Figuras 2B e C, 5B e C), o Selante ACP apresentou maior proporção de estreptococos totais e do grupo *mutans* e síntese de PEI em relação aos demais grupos mostrando que não houve uma atividade antimicrobiana desses íons.

Em nosso estudo, a aplicação da solução de sacarose promoveu uma queda no pH do biofilme (Figura 1), possivelmente pelo aumento da produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos sacarolíticos, particularmente *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*. Nenhum grupo inibiu a redução do pH após 5 minutos da aplicação da sacarose. Aparentemente a quantidade de íons presente no biofilme (Figura 2) não foi suficiente para impedir a produção de ácidos. Entretanto, após 30 minutos, pHs maiores foram somente observados com os materiais liberadores de íons (Figura 1). A ação do ácido neste tempo (5 - 30 minutos) deve produzir uma biodegradação da superfície dos materiais estudados, contribuindo para a maior liberação de íons. Como os materiais ionoméricos convencionais sofrem maiores alterações quando comparados aos resinosos com pH do meio reduzido [39] melhor resultado foi obtido com o grupo Ionômero. O material com fosfato de cálcio amorfo também mostrou um aumento do pH que provavelmente está relacionada a uma maior liberação de Ca e P, sendo que o cálcio é rapidamente seqüestrado pelo ácido láctico liberado pelos microrganismos, formando lactato de cálcio, reduzindo a quantidade de ácidos orgânicos presentes e elevando o pH. Como não foi observado nenhum efeito significativo destes íons sobre a síntese de polissacarídeos extracelulares

insolúveis (Figura 2D) e na contagem de estreptococos do grupo *mutans* (Figura 3C), possivelmente ocorreu uma ação tamponante do material sobre o biofilme dentário.

A liberação de flúor por um material no biofilme dentário pode influenciar na contagem de estreptococos do grupo *mutans* e na produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis e ácidos. Isto tem um impacto direto sobre a desmineralização e remineralização da estrutura dentária. Apesar do Selante ACP não mostrar uma ação sobre os fatores de virulência citados acima, a saturação do meio com Ca e P advindo do fosfato de cálcio amorfo confere uma capacidade tamponante no biofilme. Este efeito apresenta um grande benefício sobre o processo de perda e ganho mineral [24,54]. Os resultados sugerem que diferentes abordagens preventivas evidenciadas nos materiais utilizados podem constituir meios de prevenção capazes de interferir com a síntese de ácidos orgânicos ou com o destino dos mesmos, representando formas válidas de interferir com a relação parasita-hospedeiro que determina o desenvolvimento da cárie dentária.

## Conclusão

Concluiu-se que o biofilme dentário formado sobre os materiais que liberam flúor apresentou um aumento de flúor, cálcio e fósforo e uma diminuição do número de microrganismos do grupo *mutans* e da concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis. O biofilme formado sobre o material que contém fosfato de cálcio amorfo mostrou um aumento na concentração de Ca e P e uma ação tamponante no meio, sem efeito na microbiota.

## Referências\*

- [1] Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A and Netuschil L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci*, 2002; 110:48-53.
- [2] Eick S, Glockmann E, Brandl B and Pfister W. Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J Oral Rehabil*, 2004; 31:278-285.
- [3] Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C and Arciola CR. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomater*, 2004; 25:4457-4463.
- [4] Brambilla E, Cagetti MG, Gagliani M, Fadini L, García-Godoy F and Strohmeier L. Influence of different adhesive restorative materials on mutans streptococci colonization. *Am J Dent*, 2005; 18:173-176.
- [5] Beyth N, Domb AJ and Weiss EI. An *in vitro* quantitative antibacterial analysis of amalgam and composite resins. *J Dent*, 2007; 35:201-206.
- [6] Milleding P, Gerdes S, Holmberg K and Karlsson S. Surface energy of noncorroded and corroded dental ceramic materials before and after contact with salivary proteins. *Eur J Oral Sci*, 1999; 107:384-392.
- [7] Steinberg D and Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent*, 2002; 30:47-51.
- [8] Tenuta LM, Lima JE, Cardoso CL, Tabchoury CP and Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. *Pesqui Odontol Bras*, 2003; 17:326-331.

---

\* Normalização segundo a revista *Dental Materials* (Anexo A).

- [9] Mjör IA, Moorhead JE and Dahl JE. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. *Int Dent J*, 2000; 50:361-366.
- [10] Van Dijken JWV, Kalfas S, Litra V and Oliveby A. Fluoride and *mutans streptococci* levels in plaque on aged restorations of resin-modified glass ionomer cement, compomer and resin composite. *Caries Res*, 1997; 31:379-383.
- [11] Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A and Haller B. Antibacterial activity of restorative dental biomaterials *in vitro*. *Caries Res*, 2002; 36:101-107.
- [12] Hayacibara MF, Rosa OP, Koo H, Torres SA, Costa B and Cury JA. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. *J Dent Res*, 2003; 82:267-271.
- [13] Friedl KH, Schmalz G, Hiller KA and Shams M. Resin-modified glass ionomer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth. *Eur J Oral Sci*, 1997; 105:81-85.
- [14] Netuschil L, Brex M, Vohrer KG and Riethe P. Vital fluorescence to assess *in vitro* and *in vivo* the antibacterial effect of amalgams. *Acta Stomatol Belg*, 1996; 93:129-134.
- [15] Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT and Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res*, 2000; 34:491-497.
- [16] Van Loveren C, Lammens AJ and Ten Cate JM. Development and establishment of fluoride-resistant strains of *Streptococcus mutans* in rats. *Caries Res*, 1990; 24:337-343.
- [17] Shemesh M, Tam A and Steinberg D. Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *J Med Microbiol*, 2007; 56:1528-1535.
- [18] Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH and Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol*, 2008; 23:206-212.
- [19] Cury JA, Rebello MA and Del Bel Cury AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res*, 1997; 31:356-360.

- [20] Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF and Mayer MP. Water insoluble glucan synthesis by *mutans* streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res, 2000; 79:1371-1377.
- [21] Kantovitz KR, Pascon FM, Correr GM, Borges AF, Uchôa MN and Puppim-Rontani RM. Inhibition of mineral loss at the enamel/sealant interface of fissures sealed with fluoride- and non-fluoride containing dental materials *in vitro*. Acta Odontol Scand, 2006; 64:376-383.
- [22] Paradella TC, Koga-Ito CY and Jorge AO. Ability of different restorative materials to prevent *in situ* secondary caries: analysis by polarized light-microscopy and energy-dispersive X-ray. Eur J Oral Sci, 2008; 116:375-380.
- [23] Langhorst SE, O'Donnell JN and Skrtic D. *In vitro* remineralization of enamel by polymeric amorphous calcium phosphate composite: quantitative microradiographic study. Dent Mater, 2009; 25:884-891.
- [24] Silva KG, Pedrini D, Delbem ACB, Ferreira L and Cannon M. *In situ* evaluation of the remineralization capacity of pit and fissure sealants containing amorphous calcium phosphate and/or fluoride. Acta Odontol Scand, 2010; 68:11-18.
- [25] Tenuta LM., Ribeiro CC, Gonçalves NC, Del Bel Cury AA, Aires CP, Tengan C, Tagliaferro EP, Pecharki GD, Napimoga MH, Tabchoury CP and Cury JA. The short-term *in situ* model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. J Dent, 2005; 33:491-497.
- [26] Delbem ACB, Carvalho LP, Morihisa RK and Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization *in situ*. Caries Res, 2005; 39:258-260.
- [27] Yamamoto K, Arai K, Fukazawa K, Fukui K, Nagamatsu K, Kato K, Nakagaki H and Robinson C. Effect of plaque fluoride released from a glass-ionomer cement on enamel remineralization *in situ*. Caries Res, 2005; 39:157-160.
- [28] Koo H and Cury JA. Avaliação *in situ* de um dentifrício contendo MFP/DCPD na incorporação de fluoreto e remineralização do esmalte humano. Rev Odontol Univ, 1999; 13:245-249.

- [29] Fushida CE and Cury JA. *In situ* evaluation of enamel-dentin erosion by beverage and recovery by saliva. Rev Odontol Univ São Paulo, 1999; 13:127-134.
- [30] Kielbassa AM, Schulte-Monting J, Garcia-Godoy F and Meyer-Lueckel H. Initial *in situ* secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. Oper Dent, 2003; 28:765-772.
- [31] Attin T, Siegel S, Buchalla W, Lennon AM, Hannig C and Becker K. Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an *in situ* study. Caries Res, 2004; 38:62-66.
- [32] Ribeiro CC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Rosalen PL and Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. Br J Nutr, 2005; 94:44-50.
- [33] Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H and Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. Caries Res, 2006; 40:28-32.
- [34] Lodi CS, Manarelli MM, Sasaki KT, Fraiz FC, Delbem ACB and Martinhon CC. Evaluation of fermented milk containing probiotic on dental enamel and biofilm: *in situ* study. Arch Oral Biology, 2010; 55:29-33.
- [35] Gold OG, Jordan HV and Vanhoute J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, 1973; 18:1357-1364.
- [36] Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB and Cury, JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. Caries Res, 2002; 36:347-352.
- [37] Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC and Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. Caries Res, 2007; 41:9-15.
- [38] Dubois M, Grilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 1956; 28:350-356.

- [39] Silva KG, Pedrini D, Delbem ACB and Cannon M. Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials. *Oper Dent*, 2007; 32:328-335.
- [40] Vogel GL, Chow LC and Brow WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res*, 1983; 17:23-31.
- [41] Fiske CH and Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem*, 1925; 66:375-400.
- [42] Campos GM. GMC 2003 (computer program). Ribeirão Preto, School of Dentistry. <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html#gmc>, 2003.
- [43] Carey CM, Gregory TM, Rupp NW, Tatevossian A and Vogel GL. The driving forces in human dental plaque fluid for demineralization and remineralization of enamel mineral. In: Leach SA, editor. *Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth*. Oxford: IRL Press; 1986. p. 163-173.
- [44] Vogel GL, Carey CM, Chow LC and Tatevossian A. Microanalysis of plaque fluid from single-site fasted plaque. *J Dent Res*, 1990; 69:1316-1323.
- [45] Margolis HC and Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res*, 1992; 71:1776-1784.
- [46] Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL and Cury JA. *In situ* effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res*, 2004; 83:71-75.
- [47] Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA and Rosalen PL. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Res*, 2005; 39:123-129.
- [48] Pessan JP, Sicca CM, de Souza TS, da Silva SMB, Whitford GM and Buzalaf MAR. Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *Eur J Oral Sci*, 2006; 114:489-493.

- [49] Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE and Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res*, 2002; 36:256-265.
- [50] Quirynen M and Bollen CM. 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.
- [51] Quirynen M. The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of *in vitro* and *vivo* experiments. *J Dent*, 1994; 22:13-16.
- [52] Gonçalves NC, Valsecki Jr A, Salvador SL and Bergamo GC. Effect of sodium fluoride mouth rinses containing xylitol and sorbitol on the number of *Streptococcus mutans* from human saliva. *Rev Panam Salud Publica*, 2001; 9:30-34.
- [53] Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res*, 2008; 20:17-21.
- [54] Tung MS and Eichmiller FC. Amorphous calcium for tooth mineralization. *Compend Contin Educ Dent* 2004; 25:9-13.

# Anexos

## Anexo A

### NORMALIZAÇÃO: REVISTA DENTAL MATERIALS

#### DENTAL MATERIALS

##### *Guide for Authors*

Official Publication of the [Academy of Dental Materials](#)

Guide for Authors

Authors are requested to submit their original manuscript and figures via the online submission and editorial system for Dental Materials. Using this online system, authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process. Please register at: [✉](mailto:dem@ees.elsevier.com) <http://ees.elsevier.com/dema>.

Dental Materials now only accepts online submissions.

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on [✉www.elsevier.com/artworkinstructions](http://www.elsevier.com/artworkinstructions). The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

## Manuscripts

The journal is principally for publication of *Original Research Reports*, which should preferably investigate a defined hypothesis. Maximum length 6 journal pages (approximately 20 double-spaced typescript pages) including illustrations and tables.

*Systematic Reviews* will however be considered. Intending authors should communicate with the Editor beforehand, *by email*, outlining the proposed scope of the review. Maximum length 10 journal pages (approximately 33 double-spaced typescript pages) including figures and tables.

Three copies of the manuscript should be submitted: each accompanied by a set of illustrations. The requirements for submission are in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", *Annals of Internal Medicine*, 1977,126, 36-47. All manuscripts must be written in American English. Authors are urged to write as concisely as possible.

The Editor and Publisher reserve the right to make minimal literary corrections for the sake of clarity. Authors for whom English is not the first language should have their manuscripts read by colleagues fluent in English. If extensive English corrections are needed, authors may be charged for the cost of editing. For additional reference, consult issues of *Dental Materials* published after January 1999 or the Council of Biology Editors Style Manual (1995 ed.).

All manuscripts should be accompanied by a *letter of transmittal*, signed by each author, and stating that the manuscript is not concurrently under consideration for publication in another journal, that all of the named authors were involved in the work leading to the

publication of the paper, and that all the named authors have read the paper before it is submitted for publication.

**Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety.**

Manuscripts not conforming to the journal style will be returned. In addition, manuscripts which are not written in fluent English will be rejected automatically without refereeing.

## **Format**

### *General*

- number all pages consecutively.
- type double-spaced on A4 or 8.5 x 11-inch bond paper, with margins of 30 mm.
- double-space references.
- indent or space paragraphs.
- arrange article in the following order: Title, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgements, References, Tables, Figures, Captions.
- start each section on a separate page.

### *Title page*

- Title (capitalize the first letter of the first word) e.g. Comparison of the color stability of ten new composites.
- Authors (first name, middle initial, surname) e.g. Kenneth J. Anusavice 1, Victoria Marker 2
- Authors' addresses (abbreviated) e.g.

1 Department of Biomaterials, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

2 Department of Biomaterials Science, Baylor College of Dentistry, Dallas, Texas, USA

- Short Title (45 characters) e.g Color stability of composites
- **Corresponding Author details (essential): Name, complete address, phone, fax, and E-mail numbers**

*Abstract* (structured format)

- 250 words or less.
- subheadings should appear in the text of the abstract as follows: Objectives, Methods, Results, Significance. (For Systematic Reviews: Objectives, Data, Sources, Study selection, Conclusions). The Results section may incorporate small tabulations of data, normally 3 rows maximum.

*Keywords*

Up to 10 keywords should be supplied e.g. dental material, composite resin, adhesion.

*Introduction*

This must be presented in a structured format, covering the following subjects, although actual subheadings should not be included:

- succinct statements of the issue in question;
- the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue (reference);
- the aims and objectives of the research being reported relating the research to dentistry, where not obvious.

*Materials and methods*

- describe the procedures and analytical techniques.
- only cite references to published methods.

- include at least general composition details and batch numbers for all materials.
- identify names and sources of all commercial products e.g  
"The composite (Silar, 3M Co., St. Paul, MN, USA)..."  
"... an Au-Pd alloy (Estheticor Opal, Cendres et Metaux, Switzerland)."
- specify statistical significance test methods.

### *Results*

- refer to appropriate tables and figures.
- refrain from subjective comments.
- make no reference to previous literature.
- report statistical findings.

### *Discussion*

- explain and interpret data.
- state implications of the results, relate to composition.
- indicate limitations of findings.
- relate to other relevant research.
- suggest directions for future research.

### *Conclusion* (if included)

- must NOT repeat Results or Discussion
- must concisely state inference, significance, or consequences

### *Acknowledgements*

As appropriate, e.g.:

"Based on a thesis submitted to the graduate faculty, University of Virginia, in partial fulfilment of the requirements for the M.S. degree."

"This investigation was supported in part by Research Grant DE 00000 from the National Institute of Dental Research, Bethesda, MD 20892."

*References* - must now be given **according to the following numeric system**:

Cite references in text in numerical order. Use square brackets: in-line, not superscript e.g. [23]. All references must be listed at the end of the paper, double-spaced, without indents.

For example:

1. Moulin P, Picard B and Degrange M. Water resistance of resin-bonded joints with time related to alloy surface treatments. *J Dent*, 1999; 27:79-87.
2. Taylor DF, Bayne SC, Sturdevant JR and Wilder AD. Comparison of direct and indirect methods for analyzing wear of posterior composite restorations. *Dent Mater*, 1989; 5:157-160.

Avoid referencing abstracts if possible. If unavoidable, reference as follows:

3. Demarest VA and Greener EH. Storage moduli and interaction parameters of experimental dental composites. *J Dent Res*, 1996; 67:221, Abstr. No. 868.

## **Tables and figures**

All tables and figures must be thoroughly discussed in the text of the manuscript.

### *Tables*

- one table to a page, each with a title.
- number tables in order of mention using Arabic numerals.
- must be able to "stand alone" apart from text.

- when appropriate, standard deviations of values should be indicated in parentheses; (do NOT use  $\pm$  notation).
- results of statistical analysis must be included, use superscript letters to indicate significant differences.
- for explanatory footnotes, use symbols (\*, #, \*\*, ##).

### *Figures*

- Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. Images to be supplied separately in jpg, gif or other graphics file.
- only black and white photographs for print publication.
- omit titles and other information contained in the figure caption.
- maximum of 6 figures per manuscript.
- figures grouped together should have similar dimensions and be labelled "a, b, c", etc.
- place magnification markers directly on the micrographs.
- authors should consider that the majority of figures will be reduced to the width of a single column (approximately 85 mm). Preferably figures should exactly match, or be no more than 1.5 times that width.
- authors can indicate if they feel a figure should be full page width.

*Dental Materials* has been selected for inclusion in a new 'colourful e-products' workflow. Figures that appear in black and white in the printed version of the journal can be IN COLOUR, online, in ScienceDirect. Authors wishing to make use of this facility should ensure that 1. the artwork is in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and at the correct resolution 2. RGB colourspace is used and 3. for colour online and black and

white in print, both colour and black and white artwork (file and/or hardcopy) is provided.

**There will be no charges to the authors for colour figures online.**

### *Graphs*

- unique, concise axis labels; do not repeat the Figure caption.
- uniform size for graphs of similar type.
- type size that will be easily read when the graph is reduced to one column width.
- lines that are thick and solid (100% black).

### *Captions to tables and figures*

- list together on a separate page.
- should be complete and understandable apart from the text.
- include key for symbols or abbreviations used in Figures.
- individual teeth should be identified using the FDI two-digit system.

## **General Notes on Text**

*Abbreviations and acronyms:* terms and names to be referred to in the form of abbreviations or acronyms must be given in full when first mentioned.

### *Correct Usage*

- use S.I. units (International System of Units). If non-SI units must be quoted, the SI equivalent must immediately follow in parentheses.
- use correct symbols for  $\mu$ , L (as in  $\mu\text{m}$ , mL, etc.)
- put leading zeros in all numbers less than 1.0
- write out number of ten or fewer (ten rats) except when indicating inanimate quantities (10 mL)

- always use digits for dates, dimensions, degrees, doses, time, percentages, ratios, statistical results, measurements, culture cells, and teeth.
- the complete names of individual teeth must be given in the text.

### **General Policy**

- receipt of manuscripts will be acknowledged.
- after initial review, authors will be notified of status.
- every effort is made to obtain timely reviews; please remember that the referees and the editor are volunteers.
- a list of revisions and responses to reviewers' critiques must accompany resubmitted revised manuscripts.

On Submission: Agreement, by the act of ticking a box, to the statement, "This paper has been compiled with the knowledge, input and approval of all the named authors."

On acceptance, authors will be required to sign a *transfer of copyright agreement*. If figures, tables, or other excerpts, are included from copyrighted works the author is responsible for obtaining written permission from the copyright holder prior to submitting the final version of the paper. Full credit must be given to such sources.

*Offprints and page charges*: no page charges are levied on articles published in *Dental Materials*. Each corresponding author receives 25 offprints of their article free of charge after it has been published; they will also have the opportunity to order additional copies.

### **Submission Package Checklist:**

- *letter of transmittal* signed by all authors.

- One electronic copy of the manuscript.
- One electronic copy of each image and table, all labelled.

For further guidance on electronic submission, please contact Author Services, Log-In Department, Elsevier Ltd, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK. E-mail: [authors@elsevier.co.uk](mailto:authors@elsevier.co.uk), fax: +44 (0)1865 843905, tel: +44 (0)1865 843900.

# Anexo B

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP–

OF. 044/2008  
CEP  
SFCD/bri

Araçatuba, 30 de abril de 2008.

#### Referência Processo FOA 2008-00973

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **“EFEITO DE MATERIAIS UTILIZADOS COMO SELANTES DE FÓSSULAS E FISSURAS NO BIOFILME DENTAL FORMADO “IN SITU”**” expede o seguinte parecer:

**Aprovado:**

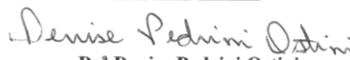
Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, **deverá ser enviado o relatório parcial em 29/04/2009 e o relatório final em 29/06/2010.**

  
Prof. Dr. Stefan Fiúza de Carvalho Dekon  
Coordenador do CEP

Ilma. Senhora  
**Dr. DENISE PEDRINI OSTINI**  
Araçatuba-SP-

**Ciente.De acordo.**

5/5/2008

  
**Dr. Denise Pedrini Ostini**

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária –  
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP  
Tel (18) 620-3203 E-mail: [diretor@foa.unesp.br](mailto:diretor@foa.unesp.br)

## Anexo C

### OBTENÇÃO DOS CORPOS-DE-PROVA

- *Materiais utilizados, matriz, fotopolimerização e corpos-de-prova.*

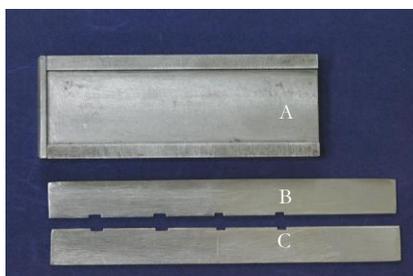


#### 1. Materiais utilizados:

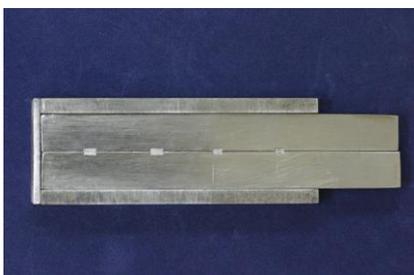
A- Fuji IX GP (GC Corporation, Hasunuma-cho, Itabashi-ku, Tokyo, Japan).

B- Aegis (Denali Corporation, Hanover, MA, USA).

C- Auralay XF (Bosworth, Skokie, IL, USA).



2. Matriz metálica utilizada na confecção dos corpos-de-prova, constituída por 3 partes. A: base; B e C: partes que justapostas formam os orifícios para inserção dos materiais.



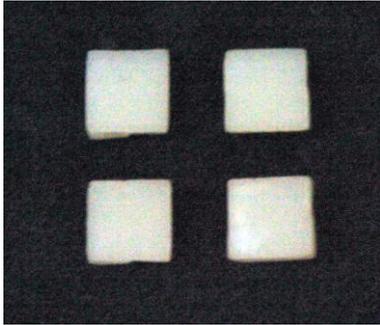
3. Matriz montada criando 4 cavidades de 4 mm de largura, 2 mm de altura e 4 mm de espessura para cada corpo-de-prova.



4. Fotopolimerizador VIP (Bisco, Schaumburg, IL, USA).



5. Fotopolimerização dos corpos-de-prova.



6. Corpos-de-prova confeccionados.

## Anexo D

### OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE BOVINO

- Seções: *radicular; face vestibular; vestibular longitudinal e transversal.*



1. Coroa de dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (D 91 - KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), montado em motor de bancada (Nevoni, São Paulo, SP, Brasil), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).



2. Coroa dentária fixada em placa de acrílico (4x4x 0,4 cm) com cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA, São Paulo, SP, Brasil) pela sua face proximal.



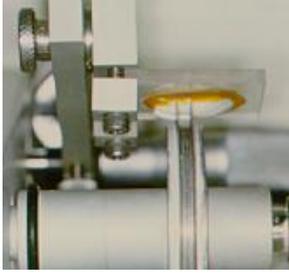
3. Placa montada em cortadeira (Isomet Low Speed Saw - Buehler, Lake Bluff, IL, USA).



4. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond – n. 11-4244 - Buehler, Lake Bluff, IL, USA) separando a superfície vestibular da lingual, sob refrigeração com água destilada/deionizada.



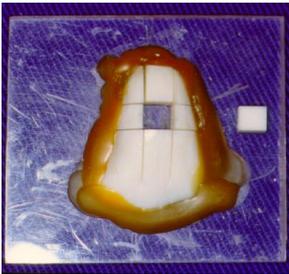
5. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



6. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond – n. 11-4243 - Buehler, Lake Bluff, IL, USA), montados em cortadeira (Isomet Low Speed Saw – Buehler) sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura.



7. Secção da face vestibular no sentido transversal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond n. 11-4243 - Buehler), montados em cortadeira (Isomet Low Speed Saw – Buehler) sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura.

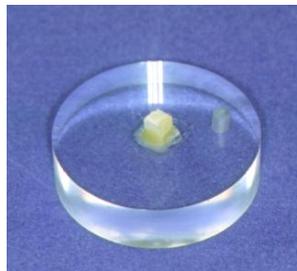


8. Face vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, espécime de esmalte (4x2x4 mm).

## Anexo E

### DESGASTE E POLIMENTO DOS ESPÉCIMES DE ESMALTE

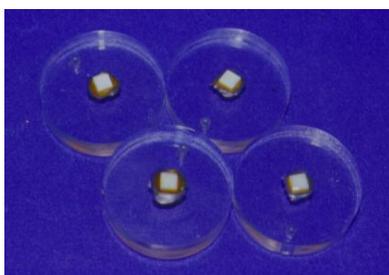
*- Planificação da dentina, polimento do esmalte e secção transversal.*



1. Espécime de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada ( $\pm 3$  cm de diâmetro por  $\pm 8$  mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.



2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando politriz (APL-4 - AROTEC S.A. Ind. e Com., Cotia, SP, Brasil) e lixas de granulação 320 (Carbimet Paper Discs 30-5108-320 - Buehler, Lake Bluff, IL, USA), 2 pesos, durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração.



3. Espécimes polidos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima.

#### Seqüência do polimento do esmalte:

1. Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação;
2. Na politriz APL-4 AROTEC – lixa de granulação 600 (30 segundos – 2 pesos), 800 (30 segundos – 2 pesos) e 1200 (30 segundos – 2 pesos) (Carbimet Paper Discs, 30-5108 - Buehler, Lake Bluff, IL, USA) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
3. Na politriz APL-4 AROTEC – acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth, Lake Bluff, IL, USA) (1 minuto – 2 pesos) e suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler, Lake Bluff, IL, USA);
4. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler, Lake Bluff, IL, USA) diluída 20:1 em água destilada/deionizada (3 minutos);
5. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

## Anexo F

### LISTA DE INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

- 1- Todos os materiais utilizados na pesquisa não acarretarão em custo ao voluntário.
- 2- Os voluntários não deverão utilizar qualquer tipo de produto fluoretado (exceto água) ou anti-séptico bucal duas semanas antes e durante todo o experimento.
- 3- Dez dias antes e durante todo o experimento os voluntários deverão escovar os dentes com dentífrico não fluoretado fornecido pela pesquisadora.
- 4- A pesquisa será composta por 4 etapas, com duração de 8 dias cada uma, com intervalo de 7 dias entre elas.
- 5- Os voluntários deverão usar o dispositivo bucal durante todo o dia, inclusive para dormir e **DEVERÁ REMOVÊ-LO SOMENTE PARA AS REFEIÇÕES** ocasião em que o dispositivo deverá permanecer na caixa própria para armazená-lo.
- 6- Evite que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para cada refeição.
- 7- Realize sua higiene bucal normalmente (3 vezes ao dia – após as principais refeições e antes de dormir), utilizando o dentífrico fornecido.
- 8- Os blocos **NÃO** deverão ser escovados. Os voluntários poderão realizar a escovação do dispositivo somente **NA FACE VOLTADA PARA O PALATO** e com o dentífrico fornecido pela pesquisadora.
- 9- Os voluntários deverão gotejar duas gotas da solução fornecida pela pesquisadora sobre os blocos 6 vezes ao dia, nos seguintes horários: 9:00, 11:00, 14:00, 16:00, 18:00 e 20:00 horas. O dispositivo deverá ser reposicionado na boca após 5 minutos.
- 10- O voluntário deverá realizar a coleta de uma amostra da água que está ingerindo no 2º e 5º dia após a instalação do aparelho, nos frascos fornecidos pela pesquisadora.
- 11- No 7º dia, o voluntário deverá comparecer no consultório da disciplina de Clínica Integrada, localizado na Rua José Bonifácio, 1193, para realizar a determinação do pH do biofilme dentário. Este procedimento será previamente marcado com a pesquisadora.
- 12- Para determinação do pH do biofilme dentário, o voluntário deverá comparecer ao local **SEM** realizar a 1ª escovação do dia e em **JEJUM**.
- 13- Quando qualquer material estiver acabando ou sentir algum desconforto na utilização do dispositivo, entrar em contato com a pesquisadora.

- 14- Favor verificar todos os dias se os fragmentos estão em suas cavidades e se a tela protetora continua intacta. Caso não estejam, entrar em contato imediatamente com a pesquisadora.
- 15- No 8º dia, às 8:00 horas, o dispositivo deve ser retirado da boca e colocado dentro do estojo que o acompanha, com uma gaze umedecida sobre as telinhas. A pesquisadora recolherá o material para análise. Este procedimento, também será previamente marcado com a pesquisadora.
- 16- Qualquer dúvida entrar em contato com a pesquisadora (Lilian Ferreira) pelo telefone: 3636-3235 (Odontopediatria) ou 3621-8650.

## Anexo G

### DISPOSITIVO PALATINO

- *Montagem do dispositivo palatino.*



1. Dispositivo palatino com 4 “slots” de 4 mm de largura, 3 mm de altura e 4 mm de espessura.



2. Corpos-de-prova inseridos nos “slots” do dispositivo palatino.



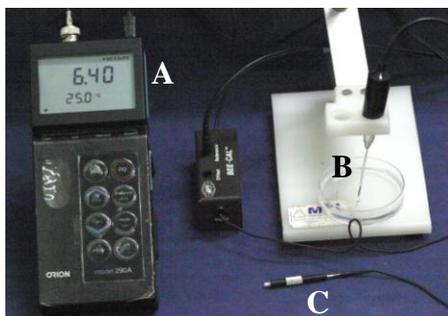
3. Telas plásticas fixadas no dispositivo palatino.

---

## Anexo #

### AVALIAÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO DO BIOFILME DENTÁRIO

- Avaliação do pH, medidor de pH, microeletrodo de contato.



1. Aparelhos utilizados:

A- Analisador de pH/íons Orion 720A.

B- Microeletrodo de referência (Analyser Comércio e Indústria LTDA, São Paulo, SP).

C- Microeletrodo de contato (Beetrode® MEPH-3L, WPI, New Haven, CT, USA)



2. A voluntária posicionava o dedo indicador em uma solução de KCl 3M, onde também estava imerso o microeletrodo de referência. O pH do biofilme foi aferido com um microeletrodo de contato e o valor registrado no analisador de pH/íons foi anotado.



3. Procedimento de avaliação da acidificação do biofilme dentário.



4. Extremidade ativa do microeletrodo de contato com ponta ultrafina entre a tela plástica tocando diretamente o biofilme dentário.

## Anexo I

### ANÁLISE DA MICROBIOTA DO BIOFILME DENTÁRIO

- Dessecador, meios de cultura, microrganismos do biofilme dentário e contador de colônias.

---



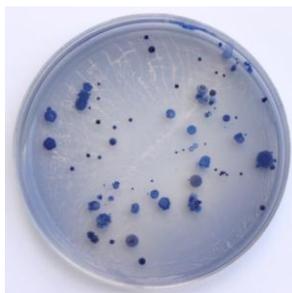
1. Dessecador de vidro do tipo Pyrex (Vidrolabor Indústrias LTDA, São José do Rio Preto, SP) para incubação microbiana em condições de anaerobiose.

---



2. Ágar infuso de cérebro e coração para contagem do número total de microrganismos heterotróficos. Presença de diferentes tipos morfocoloniais.

---



3. Ágar Mitis Salivarius (ágar MS) para determinação do número total de estreptococos bucais. Presença de diferentes tipos morfocoloniais.

---



4. Ágar Mitis Salivarius Sacarose (ágar MSBS) para determinação do número total de estreptococos do grupo *mutans*. Presença de colônias com superfície rugosa.

---



5. Contador de colônias (Colony Counter Digital-S, J.P. Selecta, S.A., Barcelona, Spain) para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

## Anexo J

### LIBERAÇÃO DE FLÚOR, CÁLCIO E FÓSFORO NAS SOLUÇÕES DES E RE

*- Agitação e armazenamento das soluções.*

---



1. Mesa agitadora (TE-420 ORBITAL - TECNAL) com velocidade de 110 rpm e temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

---



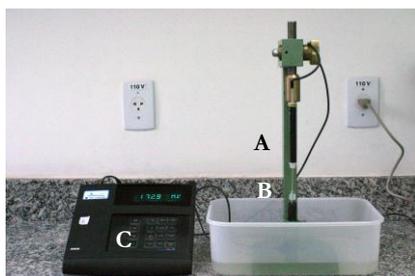
2. Armazenamento das soluções Des e Re em tubos de ensaio de polipropileno a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior leitura de flúor, cálcio e fósforo liberados.

---

## Anexo K

### ANÁLISE DE FLÚOR: BIOFILME, SOLUÇÕES DES E RE E ÁGUA DOS VOLUNTÁRIOS

- *Eletrodos, analisador e agitador.*



1. Para análise da concentração de flúor do biofilme dentário utilizou-se:

A- Eletrodo específico Orion 9409-BN (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA).

B- Microeletrodo de referência (Analyser Comércio e Indústria LTDA, São Paulo, SP).

C- Analisador de íons Orion 720 A (Orion Research, Inc.).



2. Para a determinação do flúor das soluções Des e Re e água ingerida pelos voluntários utilizou-se:

A- Eletrodo específico combinado para íon flúor (9609 BN - Orion, Research, Inc.).

B- Analisador de íons digital (Orion 720 A, Orion Research, Inc.).

C- Agitador magnético (TE-081 - TECNAL).

## Anexo C

### ANÁLISE DE CÁLCIO, FÓSFORO E POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES INSOLÚVEIS

- Placa para cultura, leitor de placas e espectrofotômetro.



1. A concentração de cálcio do biofilme dentário e das soluções Des e Re foi determinada através de método colorimétrico realizado em placas de 96 poços, modelo 92096-TPP, Switzerland.



2. As leituras de absorvância na análise da concentração de cálcio do biofilme dentário e soluções Des e Re foram realizadas em leitor de placas BioTek, modelo PowerWave 340, a 650 nm.



3. As leituras de absorvância na determinação da concentração de fósforo do biofilme dentário e das soluções Des e Re e de polissacarídeos extracelulares insolúveis do biofilme dentário foram realizadas a 660 nm e 490 nm, respectivamente, no espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1100 (Hitachi High Technologies, Minato-ku, Tokyo, Japan).

## Anexo M

### MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

*- Metalizador e microscópio eletrônico de varredura.*

---



1. Metalizador SCD 050 (BAL-TEC S.A. – Tokyo, Japan).

---



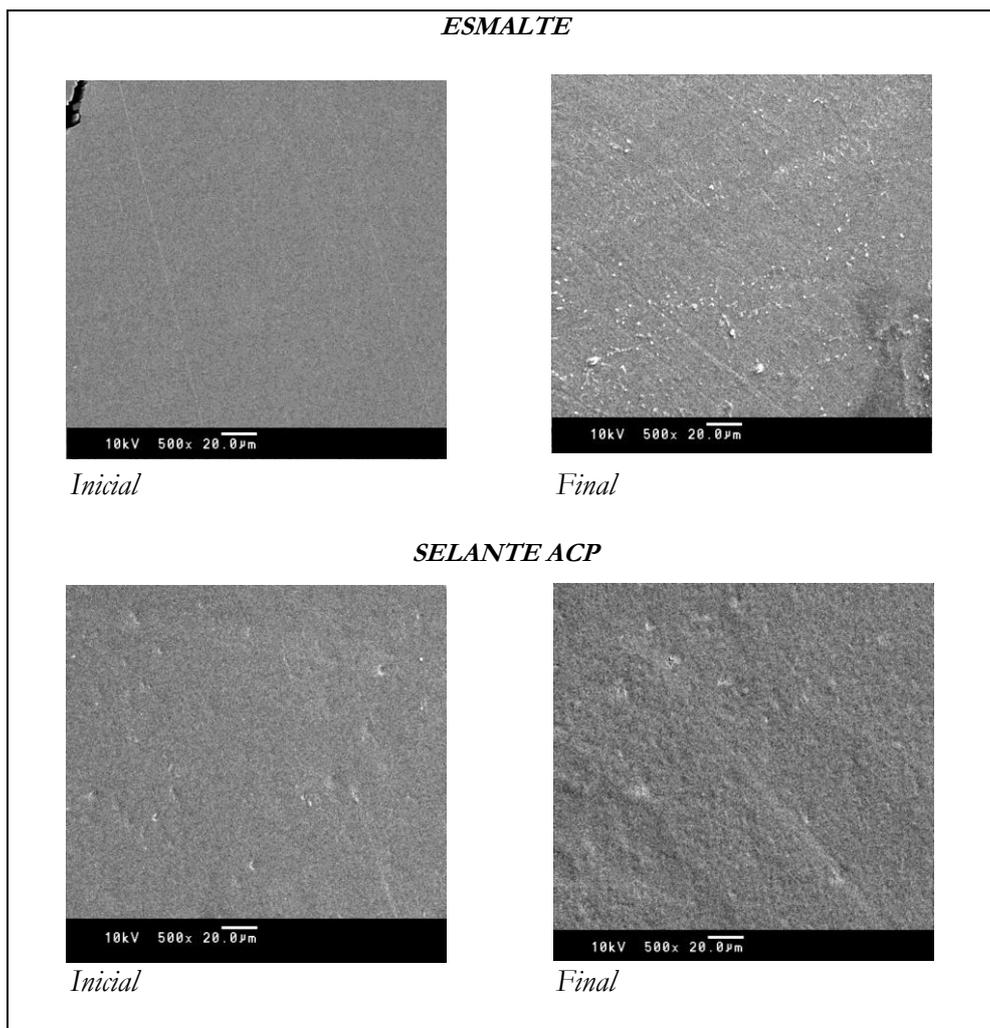
2. Microscópio eletrônico de varredura SM-300 (TOPCON – Tokyo, Japan) do Instituto de Química de Araraquara - UNESP.

---

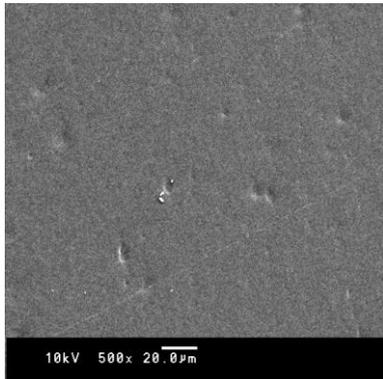
## Anexo N

### FOTOMICROGRAFIAS DA SUPERFÍCIE DO ESMALTE E MATERIAIS

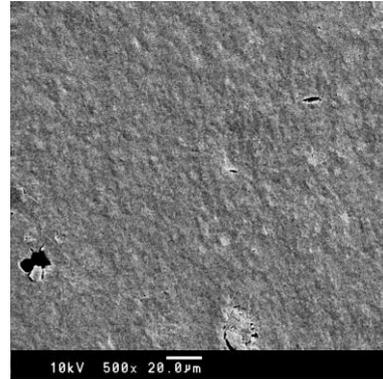
- Inicial e após o período experimental intrabucal (MEV - aumento de 500 X).



**SELANTE F**

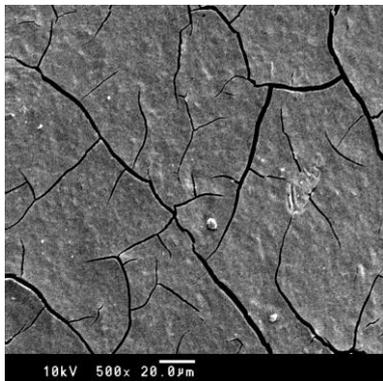


*Inicial*

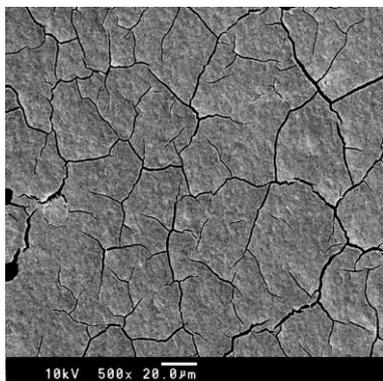


*Final*

**IONÓMERO**



*Inicial*



*Final*

## Anexo 0

### ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR NA ÁGUA INGERIDA PELOS VOLUNTÁRIOS

*- Tabela dos resultados*

Valores médios da concentração de flúor na água ingerida pelos voluntários ( $\mu\text{g F/mL}$ ) de acordo com os grupos

Voluntários	Grupos			
	Esmalte	Selante ACP	Selante F	Ionômero
1	1,06	1,05	1,04	1,00
2	0,01	0,01	0,01	0,01
3	1,15	1,14	1,14	1,08
4	0,16	0,16	0,24	0,24
5	1,06	0,63	0,90	1,07
6	0,02	0,02	0,02	0,02
7	0,01	0,12	0,10	0,22
8	0,70	0,73	0,72	0,68
9	0,41	0,05	0,21	0,05
10	0,01	0,01	0,01	0,01
Média (dp)	0,46 (0,49)	0,39 (0,45)	0,44 (0,46)	0,44 (0,47)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)