FABRICIO MARCELO CEVALLOS GONZÁLEZ

**Efeito da adição de teobromina sobre as propriedades
do cimento de ionômero de vidro**

São Paulo

2018

FABRICIO MARCELO CEVALLOS GONZÁLEZ

**Efeito da adição de teobromina sobre as propriedades
do cimento de ionômero de vidro**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia (Dentística) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Bona Matos

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Cevallos González, Fabricio Marcelo.

Efeito da adição de teobromina sobre as propriedades do cimento de ionômero de vidro / Fabricio Marcelo Cevallos González ; orientador Adriana Bona Matos. -- São Paulo, 2018.

87p. : fig., tab., ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Teobromina. 2. Cimentos de ionômero de vidro. 3. Alcaloide - odontologia. I. Matos, Adriana Bona. II. Título.

Cevallos González FM. Efeito da adição de teobromina sobre as propriedades do cimento de ionômero de vidro. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Fabio Daumas Nunes

Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Ana Del Carmen Armas Vega

Instituição: UCE – Equador

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a) Igor Studart Medeiros

Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovado

Dedico este trabalho

A **Jesus**, que guiou meus passos quando me senti derrotado, dando-me a sabedoria e a força necessárias para realizar o objetivo proposto, apesar das dificuldades.

Com todo o amor do mundo, à minha mãe **Leonor**, à minha esposa **Patty** e ao meu filho **Juliancito**. O apoio de vocês foi essencial para concluir esta etapa da minha vida. Vocês são a minha razão de ser.

Aos meus **amigos, familiares e prezados sogros**, por me apoiarem a cada passo proposto e a cada objetivo alcançado.

AMO VOCÊS

Para este maravilhoso país, o Brasil, por ter aberto as suas fronteiras ao Equador, e permitir-nos aprender com seu desenvolvimento. Com enorme reconhecimento, à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e suas autoridades, por facultarem o acesso a todo o seu contingente pessoal e tecnológico para a formação de novos doutorandos, tornando real o sonho de um grupo de equatorianos que eternamente lhe serão gratos pela aprendizagem, e pessoalmente por todo o apoio acadêmico recebido.

Para as autoridades da Universidade Central do Equador e da Faculdade de Odontologia, que me concederam apoio financeiro e liberação do tempo de trabalho para que eu me dedicasse ao Doutorado, um milhão de agradecimentos pela oportunidade, Deus os abençoe.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Com todo o carinho e admiração do mundo, agradeço à minha Orientadora, Prof^a. Dr^a **Adriana Bona Matos**, por sua paciência para me guiar neste processo de formação acadêmica. Obrigado pelo apoio incondicional, pela confiança e pela amizade. Eu sempre me lembrarei de você por sua humildade e seus sábios conselhos, que me levaram a respeitá-la como professora e amiga. Deus a abençoe sempre, querida doutora!

AGRADECIMENTOS

Aos Professores dos Departamentos de Dentística, Biomateriais e Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Glauco Fioranelli Vieira, Prof^a. Dr^a. Márcia Martins Marques, Prof^a. Dr^a. Miriam Lacalle Turbino, Prof^a. Dr^a. Ericka Tavares. Prof. Dr. Igor Studart, Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, Dr^a. Lucyene.

Aos queridos amigos "Adrianetes" Amanda, Bia, Bruno, Ericka, Luciana, Livia, pela ajuda incondicional no desenvolvimento do meu projeto. Obrigado por esclarecer todas as minhas dúvidas e me ajudar incondicionalmente. Sempre lembrarei de vocês com apreço.

Eu aprecio muito toda a ajuda dada por Erick e, em especial, pelo Dr. Carlos Kenji Shimokawa pelo seu apoio incondicional no desenvolvimento da fase experimental da minha tese, já que ele transmitiu seu conhecimento sem egoísmo. Obrigado, Carlos, que Deus o abençoe, irmão, e que sempre lhe proporcione sucessos na sua vida profissional.

Aos funcionários dos Departamentos de Dentística e Biomateriais e Secretaria Geral, Aldo, Selma, Leandro, David, Débora, Douglas, Alessandra, por todo o apoio prestado durante a minha estadia no FOU SP.

Aos funcionários da biblioteca do FOU SP Glauci e Marcos, por sua colaboração no desenvolvimento da redação da tese.

À Faculdade de Odontologia da UNICAMP, especialmente à Prof^a. Dra. Cinthya e seu colaborador no Departamento de Química, Alfredo, pelo apoio prestado durante o desenvolvimento do teste de fluoreto.

À Marieta Trancoso de Castro, pelo auxílio na redação e edição deste trabalho.

Meu imenso carinho a todos os membros da "Vila Indiana", Marcelo Cascante, Cleber Vallejo, Eduardo Garrido, Guillermo Lanas, Franklin Quel, Blanquita Real, Eduardo Cepeda, Inés Villacis, Pablo Garrido, Roberto Romero, Katy Zurita. Obrigado por todos os momentos de confraternização, sorrisos e apoio. Vocês são parte deste projeto. Tenho-lhes enorme carinho, e vocês sempre poderão contar comigo, amigos de sucesso.

Com muito apreço, aos meus queridos amigos e professores Prof. Dr. Édison López e Prof^a. Dr^a. Ana Del Carmen Armas, por seus conselhos durante meu treinamento como aluno e profissional.

Finalmente, porém não menos importante, a todos os Professores que fizeram parte do programa DINTER, por dedicarem seu valioso tempo à minha formação de doutorado. Serei eternamente grato por toda a aprendizagem recebida, Deus os abençoe para sempre.

"Sentir medo é saudável, pois ajuda você a distinguir quais riscos vale a pena correr. Mas você deve sempre lembrar que existem sentimentos mais fortes, como o amor, a coragem e a autoconfiança, que lhe permitem superar esse medo até alcançar seu objetivo. E é nesse momento que você percebe que, por trás de todos os medos, foi Deus que o levou pela mão.

Fabricio Cevallos G

RESUMO

Cevallos González FM. Efeito da Adição de teobromina sobre as propriedades do cimento de ionômero de vidro [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

A proposta deste trabalho experimental *in vitro* foi avaliar se a incorporação de 1% - em peso – do alcalóide teobromina (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) ao cimento de ionômero de vidro (CIV) convencional (GC Gold Fuji 9, GC Corp, Japão) tem a capacidade de alterar as propriedades físico-químicas desse material. Para tanto, dois grupos experimentais foram propostos: G1 – CIV convencional e G2 – CIV com adição de teobromina. Foram confeccionados 160 discos de CIV de acordo com as instruções do fabricante, utilizando matrizes circulares. Para analisar as mencionadas propriedades, os discos foram submetidos a testes específicos, de acordo com as normas da *International Standard Organization* (ISO) para cada uma das propriedades. Discos de 15mmx1mm de diâmetro foram utilizados para as provas de sorção (n=5) e de solubilidade (n=5), com o auxílio de balança analítica, dissecadores e estufa a 23 e 37°C por várias semanas. O ensaio de microdureza foi realizado em amostras (n=20) de 15mmx1mm submetidas a cinco edentações, com carga de 25 gramas e 30 segundos, à temperatura ambiente. Para a avaliação da cor, discos (n=20) de 15mmx1mm foram submetidos ao espectrofotômetro, adotando-se a guia colorimétrica da Comissão internacional de Iluminação (CIE). No ensaio de resistência flexural, os espécimes (n=60) de 12mmx1mm foram armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas para posterior análise na máquina de ensaios universal. Para avaliar a influência da teobromina adicionada ao CIV na formação de biofilme por *Streptococcus mutans*, sobre os corpos da prova (n=40) de 12mmx1mm biofilmes foram desenvolvidos. As cepas de *S.mutans* foram cultivadas em Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) a 37°C. Também a dosagem de flúor foi avaliada, em discos de prova (n=10) armazenados em saliva artificial e submersos em solução TISAB para posterior análise com eletrodo de flúor e obtenção da curva da liberação dessa substância. Os dados obtidos nos testes de sorção e solubilidade, microdureza, cor e resistência flexural foram submetidos à análise de variância ANOVA um fator e ao

teste de Tukey para comparação entre os grupos, adotando-se 5% de nível de significância ($p < 0,05$). O ensaio da influência da teobromina adicionada ao CIV na quantidade de biofilme de *Streptococcus mutans* formado e o teste de dosagem de flúor foram submetidos à análise de variância *two-way* ANOVA e ao teste de Tukey, com nível de significância de 5% para comparação entre os grupos experimentais. O segundo fator avaliado nestes dois ensaios foi o tempo. Os resultados não revelaram alteração da sorção e da solubilidade no CIV que recebeu teobromina ($p > 0,05$). A microdureza aumentou com a adição de teobromina ao CIV ($p < 0,05$). Não houve alteração de cor do CIV que recebeu teobromina ($p > 0,05$). A resistência na flexão biaxial diminuiu quando da adição de teobromina ao CIV ($p < 0,05$). Já a quantidade de biofilme formado foi menor em G2 ($p < 0,05$). Em relação à liberação de flúor, observou-se que a adição de teobromina não altera essa propriedade do CIV ($p > 0,05$). Com base em tais achados, conclui-se que a adição de teobromina a 1% ao cimento do ionômero de vidro convencional não produz alterações significativas nas propriedades desse material, podendo até mesmo otimizar algumas dessas propriedades. Ainda assim, estudos adicionais sobre o assunto devem ser realizados.

Palavras-chave: Teobromina. Ionômero de Vidro. Propriedades. Alcaloide.

ABSTRACT

Cevallos González FM. Vision effect of the theobromine about the properties of the glass ionomer cement [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original Corrigida.

The purpose of this experimental *in vitro* work, was to evaluate if the incorporation of the 1% in weight of an alkaloid: theobromine (Sigma Aldrich Darmstadt, Germany) to the conventional glass ionomer cement (GIC) (GC Gold Fuji 9; GCC Japan Corp) has the capacity to change the properties physicochemical of this material. Whereby, it was proposed two experimental groups: G1 – Conventional GIC and G2 GIC incorporated with theobromine. According to the instructions of the creator, there were created 160 specimens, for which it was used circular matrices. To analyze the mentioned properties, the specimens were analyzed under the International Standard Organization (ISO) for each property. It was used matrices of 15mmx1mm diameter for the sorption (n=5) solubility (n=5) tests. With the help of an analytical balance, desiccators and a stove at 23° and 37° for various weeks; it was made essays of micro firmness using 20 matrices of 15mmx1mm, were submitted to five indentations with a charge of 26 grams and 30 seconds in environmental temperature. For the color evaluation it was used 20 matrices of 15mmx1mm, that were submitted to a spectrophotometer following the colorimetric guide of the International Commission of Illumination (CIE). An essay of biaxial flexural strength was made in 60 matrices of 12mmx1mm that were stored in a stove at 37° for 24 hours, for a later analysis in a universal testing machine. To evaluate the influence of the theobromine incorporated to the glass ionomer cement (GIC) in the creation of biofilm *Streptococcus mutans*, there were developed 40 matrices of 12mmx1mm of biofilm. The strains of the *Streptococcus mutans* were cultivated in Tryptic Soy-Agar at 37°. It was also evaluated the fluorine release capacity using 10 test matrices stored in artificial saliva and submerged in TISAB substance for a later analysis with an fluorine electrode, to obtain the release curve of that substance. The obtained information from the test of sorption, solubility, micro strength, color and biaxial flexural strength, were submitted to an analysis of variance ANOVA one factor and Tukey's test for a comparison between

groups assuming the 5% level of significance ($p < 0,05$). The essay of the influence of the theobromine added to the GIC in the amount of biofilm *Streptococcus mutans* formed and the test of fluorine release were submitted to the Bidirectional Variance Analysis ANOVA and Tukey's test, with a significant level of 5% to the comparison between experimental groups; the second factor evaluated in this two essays was time. The results didn't show an alteration in the sorption and solubility in the GIC that received theobromine ($p > 0,05$). The micro strength increased with the addition of the theobromine to the GIC ($p < 0,05$). There were not any alterations in the color of the GIC that received theobromine ($p > 0,05$). The resistance to the biaxial flexural strength decreased when the theobromine was added to the GIC ($p < 0,05$). The amount of formed biofilm was less in the G2. In relation to the fluorine release it was observed that the addition of theobromine does not change the properties of GIC ($p > 0,05$). Based on these findings, it is concluded that the addition of theobromine in 1% to the conventional glass ionomer cement, does not produce significant changes over this material properties and also, it can optimize some of these properties. However, more studies should be done about this topic.

Keywords: Theobromine. Glass ionomer. Properties. Alkaloid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 4.1 - Grupos experimentais.....	41
Figura 4.1 - Cimento de Ionômero de Vidro convencional utilizado	42
Figura 4.2 - Teobromina cristalina para adição ao CIV	42
Figura 4.3 - Brilho de superfície ao final da manipulação do CIV	43
Figura 4.4 - CIV proporcionado para a fabricação de discos	44
Figura 4.5 - Matrizes circulares: A - alumínio (12×1mm) - para ensaio de resistência à flexão biaxial e quantificação da formação de biofilme; B - alumínio (15×1mm) – para os ensaios de microdureza, cor, sorpção e solubilidade; C - bipartida de Teflon (8,6× 1,65) – para avaliação de dosagem de flúor	44
Quadro 4.2 Instruções de uso CIV Fuji IX	45
Figura 4.6 - Placas de vidro e acetatos posicionados para montagem dos espécimes.....	45
Figura 4.7 - CIV inserido na matriz com o auxílio de uma seringa tipo centrix.....	46
Figura 4.8 - Discos do CIV elaborados com as matrizes metálicas	46
Figura 4.9 - Discos do CIV mantidos em sílica gel.....	47
Figura 4.10-Discos do CIV imersos na água destilada e estufa.....	48

Figura 4.11-Microdurômetro Hardness Tester, Shimadzu, Kyoto, Japão	49
Figura 4.12-Representação esquemática das indentações nos espécimes	49
Figura 4.13-Espectrofotômetro (CM3700A, Konica Minolta, Tokio, Japão)	50
Figura 4.14-Máquina de Ensaio Universal Instron (EMIC, LINHA DL 2000)	52
Figura 4.15-Matrizes bipartidas do teflon inseridas com CIV.....	54
Figura 4.16-Representação esquemática amostras lavadas individualmente em 1ml de água deionizada	55
Figura 4.17-Amostras imersas 1ml de saliva artificial.....	55
Figura 4.18-Agitador acoplado à incubadora (Nova Ética, Incubadora Modelo 430 RDB, São Paulo Brasil)	56
Figura 4.19-Representação esquemática espécimenes acoplados à incubadora....	56
Gráfico 5.1- Concentração de flúor liberado em saliva artificial dos grupos experimentais	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Média, desvio padrão valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de sorção	59
Tabela 5.2 - Média, desvio padrão valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de solubilidade	60
Tabela 5.3 - Média, desvio padrão, valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de microdureza	61
Tabela 5.4 - Média e desvio padrão dos grupos experimentais quando realizado ensaio de cor.....	62
Tabela 5.5 - Média, desvio padrão, valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de resistência flexural	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1	Ionômero de Vidro	27
2.1.1	Composição	27
2.1.2	Classificação	27
2.1.3	Reação de presa	28
2.1.4	Propriedades	28
2.1.5	Indicações e contraindicações	30
2.1.6	Vantagens e desvantagens	31
2.1.7	Toxicidade	31
2.1.8	Manipulação	32
2.2	<i>Theobroma cacao</i>	32
2.2.1	Teobromina	33
2.2.1.1	<i>Composição química</i>	34
2.2.1.2	<i>Mecanismo de ação</i>	34
2.2.1.3	<i>Propriedades</i>	35
2.2.1.4	<i>Usos terapêuticos na Medicina</i>	35
2.2.1.5	<i>Usos terapêuticos na Odontologia</i>	35
2.2.1.6	<i>Toxicidade</i>	37
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Delineamento experimental	41
4.2	Formulação do composto experimental	41
4.3	Montagem dos espécimes	43
4.4	Ensaio de sorção e solubilidade	46
4.5	Ensaio de microdureza	48
4.6	Avaliação de cor por espectrofotometria	50
4.7	Ensaio de resistência a flexão biaxial	51
4.8	Quantificação da formação de biofilme por <i>S. mutans</i>	52
4.9	Avaliação da dosagem de Flúor	53
4.10	Forma de análise dos resultados	57

5	RESULTADOS	59
5.1	Ensaio de sorção	59
5.2	Ensaio de solubilidade	59
5.3	Ensaio de microdureza	60
5.4	Avaliação da cor	61
5.5	Ensaio de resistência flexural	62
5.6	Quantificação da formação de biofilme por <i>S. mutans</i>	63
5.7	Avaliação da dosagem de flúor	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Característica da odontologia contemporânea, a filosofia de mínima intervenção (MI) propõe o cuidado profissional baseado na detecção precoce da doença cárie, e na possibilidade de restaurar suas sequelas de maneira menos invasiva possível, ou seja, preservando os tecidos dentários. Neste contexto, destaca-se a importância de utilizar materiais adesivos.

O cimento do ionômero de vidro (CIV) tem sido utilizado na prevenção da progressão da atividade de cárie em crianças, idosos e pacientes especiais ⁽¹⁾. Trata-se de um material que apresenta boa compatibilidade com a estrutura dentária, além de propriedades anti-cariogênicas relacionadas a capacidade do material de liberar flúor para o meio bucal, defendendo o dente de agressões bacterianas ⁽²⁾⁽³⁾. Além disso, favorece a remineralização do esmalte, sendo um bom adjuvante na restauração final, para combater lesões secundárias ⁽⁴⁾. O CIV apresenta ainda a capacidade de aderir quimicamente ao esmalte, à dentina e ao cimento ⁽¹⁾.

Embora tenha características desfavoráveis em relação à dureza, à resistência à tração, à abrasão e à flexão, dificuldade de polimento e limitações estéticas, ⁽⁵⁾ o CIV tem suas indicações específicas, ocupando posição de destaque no preparo de boca prévio ao tratamento restaurador; na execução da técnica do ART (*atraumatic restorative treatment*); restaurações temporárias, uso em odontopediatria, odontogeriatría, pacientes especiais e hospitalizados.

Como ocorre com outros materiais adjuvantes odontológicos, o cimento de ionômero de vidro foi modificado ao longo dos anos, com o objetivo de melhorá-lo, sem alterar as suas propriedades favoráveis. A adição de diferentes compostos a esse cimento ampliou as suas possibilidades de atuar na interrupção da progressão das lesões de cárie ⁽⁶⁾.

Mais recentemente, as pesquisas têm se voltado ao estudo de plantas ou frutos e seus princípios ativos. Esse é o caso do cacau. De acordo com alguns investigadores, as sementes desse fruto – ricas em polifenóis, flavonóides e alcalóides – têm um efeito bacteriostático e remineralizador que inibe a progressão do biofilme e a atividade do *Streptococcus mutans*, principal micro-organismo causador da cárie ⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

Os primeiros estudos voltados à ação de sementes de cacau em odontologia foram realizados em animais, e remontam aos anos 30 do século passado. A partir dos anos 50 e 60 do mesmo século, tiveram início investigações voltadas ao *Theobroma cacao*, princípio ativo obtido da casca e das sementes de cacau que, graças à elevada quantidade de flavonóides e substâncias polifenólicas relacionadas à redução e à produção de ácidos no meio bucal, promove a diminuição do risco de cárie ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

A árvore de cacau também tem alcalóides, caso da teobromina, que pertence à família das metilxantinas juntamente com a teofilina e a cafeína. As primeiras pesquisas sobre esse alcalóide, foram realizadas nos anos 90 e evidenciaram sua capacidade de estimular a formação de apatita ⁽¹²⁾. Por incrementar a ação remineralizadora da saliva, a teobromina aumenta a cristalinidade do esmalte dentário, tornando-o mais resistente à dissolução ácida ^{(12) (13)}.

Ao longo dos anos, outras investigações sobre a teobromina foram empreendidas, com o objetivo de incorporá-la a compostos para uso dentário, tais como, solução de flúor, proporcionando maior eficiência bactericida, remineralizadora ou dessensibilizante ⁽¹⁴⁾. Dentre tais investigações, destaca-se aquela que avaliou os efeitos da adição desse alcalóide a pastas dentífricas fluoradas e não fluoradas para o controle da hipersensibilidade. Os resultados demonstraram uma obliteração aparente dos túbulos dentinários, o que favoreceria a redução da sensibilidade ⁽¹⁵⁾.

Assim, por apresentar resultados promissores quando adicionada a outros tipos de materiais ^(7,12,14,16,17), supomos que a adição da teobromina ao CIV poderia potencializar seus efeitos anticariogênicos, sem alterar as propriedades mecânicas do material. Esta iniciativa inovadora é de importância para a prevenção da cárie, bem como para a melhoria da saúde bucal da população. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de 1% de teobromina ao CIV nas propriedades antibacterianas, ópticas e mecânicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ionômero de Vidro

2.1.1 Composição

O cimento de ionômero de vidro é constituído por pó de vidro - aluminofluorossilicato de cálcio - e líquido, composto de poliácidos, eletrólitos, radicais carboxílicos e água, tornando-se um material de reação ácido-base ⁽⁴⁾. Quimicamente, a base de todos os ionômeros é principalmente fluoreto de cálcio, dióxido de silício e óxido de alumínio, além de fosfatos e outros fluoretos, tais como, de sódio. No que concerne ao líquido associado aos copolímeros (47%), tem-se a seguinte composição: ácido poliacrílico em maior quantidade, ácidos itacônicos, tartáricos e maléicos em porcentagens menores e água, responsável pelas trocas de íons ⁽¹⁾⁽⁴⁾.

Ao longo do tempo, e para melhorar suas propriedades, a composição do CIV foi modificada com a incorporação de metais, tais como, ligas de prata; elementos resinosos (Metacrilato de hidroxietilmetacrilato - HEMA ou Bisfenol glicidil metacrilato - BIS-GMA), o que faz com que o material também tenha uma reação química ativada por uma reação química ou fotopolimerização ⁽¹⁸⁾.

2.1.2 Classificação

Autores ^(4,19,20) classificam os CIVs de acordo com a sua natureza em convencional (de presa química) ou resinoso (fotopolimerizável ou de tripla cura). Classificam também este material de acordo com seu uso clínico: cimentação, restauração, forramento / base de cavidade ou para selantes de fóssulas e fissuras ^(4,19,20).

2.1.3 Reação de presa

A reação de geleificação é decorrente de reação ácido-base que dá origem a um sal estruturado e nucleado, de modo que o ácido intervém no vidro promovendo a formação de íons de cálcio, estrôncio, zinco, flúor e alumínio e de um único núcleo de sílica. A seguir, os íons de cálcio, estrôncio e alumínio formam uma matriz de policarboxilato que permite a liberação de fluoreto de sódio a partir do ionômero, o que dá início a presa do material que, no caso de ionômeros de vidro convencionais dura de 4 a 7 minutos, no caso dos de tripla cura, de 2 a 3 minutos, e naqueles fotopolimerizáveis, até 30 segundos ^{(21,22)(23)}. A reação de geleificação contempla quatro estágios, a saber: formação de sal, transformação sol-gel, endurecimento e hidratação ⁽¹⁾.

2.1.4 Propriedades

O ionômero de vidro possui propriedades biológicas, químicas e mecânicas ⁽¹⁾. Dentre suas propriedades biológicas, a principal é, sem dúvida, a capacidade de absorver e liberar flúor, característica que lhe confere a capacidade de controlar eficientemente lesões cariosas iniciais e secundárias. A liberação de flúor tem seu maior potencial nas primeiras 48 horas e diminui à medida que o tempo passa, até estabilizar e constantemente liberar mais fluoretos de acordo com as contribuições que o meio oral recebe. Em virtude de tal característica, o ionômero de vidro é considerado um reservatório de fluoreto, substância esta que também tem ação antimicrobiana bactericida e contribui para a remineralização biológica dos tecidos dentais ^{(21-24)(22,25,26)(27)}.

No que concerne às propriedades químicas do ionômero de vidro, elas se concentram na sua capacidade adesiva ao substrato dental. O grau de adesão do ionômero ao dente é melhor quando se dá ao nível do esmalte, que é mais mineralizado, menor na dentina – que possui mais água -, e ainda menor na dentina cariada – mais desmineralizada em virtude do ataque bacteriano. É importante notar que a adesão é dada pela combinação dos grupos carboxílico, que promovem a

quelação entre os íons de cálcio e o substrato dental, resultando em ligação micromecânica quando o cimento endurece ^(28–30) ⁽²⁹⁾.

Em relação às propriedades mecânicas, o CIV é um material comprovadamente resistente à tensão. Tal resistência é maior nos ionômeros resinosos do que nos convencionais e, de acordo com estudos, a compressão deve ser de 125 Megapascals (MPa) em dentição definitiva e 100 MPa em dentição decídua ⁽³¹⁾. A grande resistência à compressão faz com que o CIV atue como um colchão dentinário contra esforços mastigatórios e oclusais. Ressalta-se que, também nesse aspecto, os ionômeros resinosos são mais eficientes do que os ionômeros convencionais ^(1,2).

Outra propriedade mecânica do cimento de ionômero de vidro é sua resistência ao desgaste e à erosão que, entretanto, não é superior àquela de materiais resinosos. Por essa razão, e para evitar o risco de microfiltração, faz-se necessário tomar precauções em todos os procedimentos que envolvam a utilização do CIV ⁽³²⁾. O cimento de ionômero de vidro pode sofrer alterações dimensionais se exposto à umidade ⁽³³⁾ e, no que diz respeito à cor, ainda é insatisfatório o que limita seu uso pra restaurações estéticas ⁽²³⁾.

Já a microdureza do ionômero de vidro está associada à duração e ao desgaste do próprio material, bem como ao controle do processo de endurecimento. A maioria dos estudos voltados ao assunto aponta melhor dureza superficial em ionômeros modificados com metais ou com resinas do que em ionômeros convencionais, e comenta que essa situação possivelmente está relacionada à maior capacidade de absorção de água dos ionômeros resinosos, cuja composição inclui monômeros hidrofílicos ⁽³⁴⁾. A par disso, a dureza do material pode variar em função de fatores como manuseio inadequado deste, existência de agentes modificantes em sua composição e até mesmo a dieta do paciente, pois estudos revelam que as alterações de pH diminuem a dureza e corroem a superfície restaurada, sendo os ionômeros convencionais os mais afetados ⁽³⁵⁾.

Um dos principais defeitos dos ionômeros de vidro, especialmente dos convencionais, é a sua baixa resistência à fratura, que pode ser decorrente de processo químico incompleto do material. Assim sendo, esse fenômeno é controlado à medida que o material amadurece ⁽³⁶⁾. Deve-se destacar, porém, que a literatura especializada atribui maior resistência à flexão biaxial aos ionômeros encapsulados

convencionais: a maior precisão desses materiais no início do processo de estabelecimento químico lhes garantiria menor incidência de fraturas ^(31,37).

Tanto a solubilidade quanto a sorção têm influência no sucesso de tratamentos nos quais o CIV é utilizado. A solubilidade pode ocorrer em até 30 dias – período em que há grande retenção de água -, e a capacidade de ganhar massa está relacionada à biocompatibilidade e à degradação do material com o substrato dental. Já a sorção ocorre entre 24 horas e 7 dias depois do processamento do material, e guarda relação direta com as propriedades mecânicas deste - resistência, flexão e dureza – que, quando alteradas podem promover ruptura marginal e mudança dimensional, causando microinfiltração subsequente ⁽³⁸⁾. Investigações realizadas por estudiosos do assunto registram que os ionômeros de vidro convencionais têm baixos valores de sorção e altos valores de solubilidade, enquanto os ionômeros modificados com resina apresentam altos valores de sorção e baixos valores de solubilidade ^{(38–40)(39)}.

2.1.5 Indicações e contraindicações

As indicações do CIV estão associadas ao tipo de ionômero. Os ionômeros são usados em procedimentos de intervenção mínima, *atraumatic restorative treatment* (ART – tratamento restaurativo atraumático), restaurações de lesões de cárie especialmente em cavidades de classe I, III e V, para controlar problemas relacionados à hipersensibilidade cervical, e também para cimentação de dispositivos ortodônticos, base ou forramento cavitário e restaurações provisórias, entre outras atividades clínicas ⁽⁴¹⁾.

Por apresentarem maior resistência em comparação com os ionômeros convencionais, os ionômeros resinosos são muito utilizados para a cimentação de núcleos, próteses fixas, restaurações indiretas e coroas metálicas, de porcelana ou à base de cerômero ⁽²³⁾. Além disso, e graças à sua capacidade de absorção e liberação de fluoreto, os ionômeros resinosos também podem ser empregados como selantes, exibindo melhor capacidade adesiva que os convencionais ^(23,43). Entretanto, esse material não deve ser utilizado em regiões de alto impacto mastigatório devido à sua baixa resistência à fratura, não deve ser empregado em restaurações de grande porte,

especialmente em dentes permanentes, e não deve ser instalado diretamente sobre a polpa, pois sua presença pode provocar reação adversa ⁽⁴⁴⁾.

2.1.6 Vantagens e desvantagens

Dentre as principais vantagens do ionômero de vidro, incluem-se sua capacidade adesiva com o substrato dentário e outros materiais, sua constante liberação de flúor, e a facilidade e rapidez de manipulação de que é dotado ⁽⁴⁾.

No que diz respeito às desvantagens, destaca-se o longo tempo necessário para a reação de geleificação, uma vez que a eliminação de alumínio no pó e a transformação em fluoretos demandam 24 horas. Como o endurecimento não é rápido, pode ocorrer perda ou absorção de água, enfraquecendo as propriedades mecânicas do material ⁽²³⁾. O risco de microinfiltração pode ser considerado uma desvantagem adicional, e ocorre quando o material não é trabalhado de forma adequada. O manuseio inadequado do material promove alterações em suas propriedades ⁽³²⁾.

2.1.7 Toxicidade

A toxicidade do ionômero de vidro é relativa e depende de fatores, tais como, manipulação imprópria. No entanto, a maioria dos autores concorda que a toxicidade do material é muito baixa para o paciente, dada a sua elevada compatibilidade com o ambiente bucal. Dentre os diferentes tipos, o ionômero convencional é o menos tóxico e, no âmbito dos ionômeros modificados, os híbridos têm risco de difusão de monômeros resinosos, através dos túbulos dentinários para a polpa, causando inflamação e reações alérgicas. De qualquer maneira, as regras de biossegurança devem ser rigorosamente seguidas pela equipe odontológica, pois o contato direto com o material pode provocar dermatite e a inalação deste pode desencadear problemas respiratórios ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾⁽⁴⁶⁾.

2.1.8 Manipulação

A manipulação do produto pode ser considerada o passo mais importante para a obtenção de bons resultados, pois o correto preparo do material preserva as suas propriedades. As indicações do fabricante ⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁸⁾ devem ser respeitadas para evitar alterações das propriedades mecânicas e a ocorrência de desgaste decorrentes de mistura muito fluida, ou mudanças na capacidade de adesão à estrutura dentária provocadas por mistura muito seca ⁽⁴⁹⁾.

O material só deve ser utilizado se sua superfície estiver brilhante, o que indica a disponibilidade dos radicais carboxílicos e, conseqüentemente, a capacidade de adesão. Habitualmente, os ionômeros convencionais são apresentados sob a forma de pó e líquido, dependendo do fabricante. As proporções devem ser dosadas de acordo com a necessidade de tratamento, mas na maioria das vezes têm-se 1-1 ou 2-1 pó e líquido, respectivamente. Idealmente, deve-se utilizar papel de cera e espátula de plástico, o tempo de mistura deve ser de 25 a 30 segundos, e o tempo de trabalho de aproximadamente 2 minutos ^(44,49). Também existem no mercado os ionômeros encapsulados, dosados na fábrica, cujas doses exatas podem garantir a manutenção das propriedades do material, mas eles precisam de um equipamento adicional para a mistura. O tempo para a trituração deve ser respeitado de acordo com as indicações dos fabricantes ^(50,51).

2.2 Theobroma cacao

A denominação latina do cacau, *Theobroma cacao*, provém das expressões gregas theo (deus) e broma (comida), o que resulta em “comida dos deuses”⁽¹⁶⁾. Planta da família Malvaceae, cultivada em regiões tropicais, os frutos, folhas e sementes do cacau produzem ingredientes ativos que são utilizados na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica ⁽⁵²⁾.

Dizem que os primeiros vestígios desses frutos datam da era pré-colombiana, mas há evidências que apontam as primeiras colheitas dessa fruta na Amazônia. A história também diz que nos anos 1200 e 1600 a.C. o cacau já era usado como medicina alimentar e energética, e que houve um tempo em que só podia ser consumido por pessoas da alta sociedade. Sabe-se que foi usado até mesmo como moeda de troca pelos astecas. Com o passar dos anos e com a chegada dos espanhóis ao continente americano, o resto do planeta pode conhecer seus grandes benefícios, e hoje é consumido em todo o mundo ^(52,53).

Na atualidade, o cacau é uma fruta conhecida mundialmente como base do chocolate e seus derivados. Seus componentes - grãos, folhas e sementes - são quimicamente compostos por fenóis, alcalóides, ácidos graxos e carboidratos ⁽¹⁶⁾. Além disso, o cacau contém antioxidantes, catequinas e epicatequinas que podem ter influência no controle e na prevenção de certas doenças ⁽⁵⁴⁾. Há estudos que atribuem o controle de certas bactérias da cavidade oral e outras propriedades, como a remineralização da estrutura dentária, entre outras, aos polifenóis e a um álcali - a teobromina – existentes no cacau ^(12,55,56).

2.2.1 Teobromina

A teobromina é um composto que faz parte do cacau, e a terminação ina é utilizada para todos os alcalóides e compostos que contêm nitrogênio. O nitrogênio é o responsável pelo sabor amargo do chocolate ⁽¹⁶⁾. Assim, pode-se afirmar que a teobromina é um alcalóide que pertence à classe de moléculas conhecidas como metilxantinas, que também inclui a teofilina - principal metilxantina do chá - e a cafeína - principal metilxantina do café. A teobromina pode ser extraída da árvore do cacau, especialmente das sementes de seus frutos, e sua quantidade depende da variedade dessa planta, embora em média atinja percentuais entre 1,5, 2,2 e 2,7% ⁽⁵²⁾.

2.2.1.1 *Composição química*

A teobromina, quimicamente estruturada como $C_7H_8N_4O_2$, correspondente a 3,7-dimetilxantina o 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H- purina-2,6-diona, em seu estado puro é uma substância sem cor ou odor e amarga mas, ao ser sintetizada, ganha coloração branca ⁽⁵⁷⁾.

2.2.1.2 *Mecanismo de ação*

Estudos demonstram a eficácia do extrato de sementes de cacau para evitar o crescimento e o desenvolvimento de bactérias cariogênicas no meio bucal, processo que compreende a diminuição da produção de ácido e a síntese de glucano de *Streptococcus mutans*, tendo atividade inibitória na enzima glucosiltransferase ^(7,55,58).

Há também evidências científicas que destacam a capacidade antioxidante de certos compostos polifenólicos, flavonóides e oligoelementos de cacau na redução da atividade inflamatória das citocinas ^(55,59). Pode-se também mencionar que os ácidos graxos - oleico e linoleico - do cacau têm ação inibitória antibacteriana contra os *S. mutans* ^(60,61).

Além disso, investigações *in vitro* indicam que os alcalóides obtidos a partir das sementes ou cascas do cacau têm a capacidade de remineralizar o esmalte dental porque a teobromina aumenta o tamanho dos cristais de hidroxiapatita ⁽¹²⁾. Assim sendo, pode ser considerada como um sistema de formação de apatita que também aumenta a dureza superficial do esmalte, tornando-o mais resistente aos ataques do ácido bacteriano. Nessa perspectiva, a teobromina pode ser considerada uma boa opção a ser adicionada aos compostos fluorados, com o objetivo de reforçar tanto a ação preventiva quanto restauradora destes ⁽¹²⁾.

2.2.1.3 *Propriedades*

O fruto, as folhas, as sementes e os elementos que compõem o cacau possuem propriedades benéficas ao ser humano, com sua ação antibacteriana, reparadora, remineralizadora, preventivo oxidativas, antioxidante fitoquímico, anti-inflamatória, oncoprotectora e estimulante do sistema nervoso, entre outras, mas também são utilizados em outras áreas, como medicina veterinária, cosmetologia indústria de alimentos ^{(53,62,63)(57)}.

2.2.1.4 *Usos terapêuticos na Medicina*

Muitos são os estudos que comprovam os benefícios da utilização dos componentes do *Theobroma cacao*, na sua forma natural ou bioquimicamente processados em uma droga, na medicina humana ⁽⁶⁴⁾. A literatura especializada traz registros que apontam mais de cem benefícios do cacau para a saúde humana, como seu uso para prevenir doenças cardiovasculares, de vez que aparentemente controla lesões oxidativas do DNA e aumenta o nível de plasma de antioxidantes com a finalidade de impedir a oxidação do colesterol LDL ^(54,59). Os benefícios dos componentes antioxidantes do cacau também foram relacionados a efeitos anticancerígenos, especialmente aqueles de origem genética tóxica, crescimento tumoral e controle de células de câncer de cólon ^(54,59).

2.2.1.5 *Usos terapêuticos na Odontologia*

O chocolate, atualmente apontado como o descobrimento gastronômico mais expressivo no mundo, foi durante séculos considerado um alimento de elevado potencial cariogênico devido à sua mistura com açúcares lácteos, frutas secas e aromatizantes, entre outros componentes. Porém, há investigações que lhe atribuem efeito antibacteriano, originando controvérsias sobre o seu potencial prejuízo à

cavidade oral ^(58,65). Por essa razão, pesquisas voltadas aos possíveis benefícios dos componentes do cacau no ambiente bucal têm sido empreendidas em vários campos da odontologia.

Investigação *in vitro* realizada em escovas de dentes contaminadas com *Streptococcus mutans* e submetidas a enxaguante bucal constituído por 0,1% de extrato de semente de cacau diluído em água destilada resultou em considerável redução de bactérias. Os autores atribuem tal redução à presença de elementos antibacterianos e antiglicosiltransferase na solução de cacau ⁽⁶⁶⁾.

Ao avaliarem o pH da saliva após o consumo de chocolate e sua relação com o risco de cárie, estudiosos concluíram que a ingestão desse produto não produz níveis críticos de acidez do meio - ou seja, tais níveis são insuficientes para promover danos no esmalte do dente -, mas pode afetar a dentina se a higiene bucal não for adequada ⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾.

O grau de dureza da superfície do esmalte dentário de terceiros molares desmineralizados e posteriormente submetidos a 100mg/ml e 200mg/ml de teobromina diluídos em água destilada, durante cinco minutos foi comparado com o grau de dureza de um grupo controle constituído pelos mesmos elementos dentários – terceiros molares -, que receberam substâncias remineralizadoras à base de cálcio e fosfato, aplicadas durante 18 horas. As análises microscopia eletrônica de varredura e de dureza Vickers revelaram aumento da dureza nas amostras submetidas à teobromina, especialmente naquelas que receberam concentração de 200mg/ml dessa substância ⁽¹³⁾.

Para avaliar os efeitos sinérgicos da teobromina e certos compostos remineralizantes em diferentes concentrações, como o fluoreto de sódio e o hexahidrato de cloreto de estrôncio, pesquisadores utilizaram quatro combinações, a saber: a) flúor + estrôncio; b) flúor + teobromina; c) estrôncio + teobromina; d) flúor + estrôncio + teobromina. Os dentes foram submetidos a um teste de dureza, a seguir a lesão de cárie foi induzida com ácido láctico e carbopol. Na sequência, os dentes foram submetidos a um processo de desmineralização com ácido acético e, finalmente, deu-se a fase de remineralização com saliva artificial e as combinações acima mencionadas. Isso feito, teste de dureza Knoop foi realizado para avaliar a porcentagem de recuperação da dureza inicial. Os autores concluíram que as combinações de teobromina não apresentaram melhores efeitos anticariogênicos que

o fluoreto ou o estrôncio, e que também apresentaram efeitos negativos contra a lesão da cárie⁽¹⁴⁾.

2.2.1.6 Toxicidade

Não há evidências claras sobre a toxicidade da teobromina em seres humanos, e tampouco registros relativos a efeitos adversos que esse alcalóide possa causar na saúde bucal, razão pela qual os estudiosos consideram que essa substância não apresenta grandes riscos para a saúde em geral ⁽⁶⁹⁾.

Investigações voltadas aos efeitos fisiológicos das metilxantinas, que são mediadas principalmente pelos chamados receptores de adenosina, demonstram que alimentos ou fármacos industrializados formulados à base de cacau, quando em doses adequadas, não apresentam risco para a saúde humana ⁽⁷⁰⁾. Ainda assim, há pesquisas que relatam efeitos adversos do cacau e de suas metilxantinas constituintes em humanos. Portanto, a teobromina, principal metilxantina desse fruto, deve ser considerada ⁽⁶⁹⁾.

Nessa perspectiva, verifica-se que a maioria das investigações aponta que o abuso de cacau ou de seus derivados pode causar dores de cabeça severas, transpiração e tremores, dentre outras alterações ⁽⁶⁹⁾.

Já no que concerne especificamente à teobromina, estudos mais remotos demonstram efeitos adversos em seres humanos - com episódios de náuseas ou anorexia - mas, ao contrário de outras metilxantinas, como aquelas presentes no chá ou no café, esse alcalóide não apresenta efeitos negativos ao sistema nervoso central porque seu tempo de vida no corpo cessa em até dez horas em virtude de sua eliminação na urina ⁽⁶⁹⁾.

O consumo de teobromina na proporção de 0,6 e 0,8% em dieta pulverizada comercial promoveu alterações tóxicas em ratos, que apresentaram perda de peso e alterações nos testículos e no timo ⁽⁷¹⁾. Entretanto, a constatação de que a cafeína a 0,5% é menos tóxica é um indicativo de que o mesmo pode ocorrer com a teobromina, pois essas duas substâncias constituem-se em metilxantinas ⁽⁷²⁾.

Outra investigação conduzida em ratos revelou que a teobromina incorporada a uma dieta rica em proteínas é mais tóxica do que quando incorporada a alimentos ricos em fibras, indicando que a aceleração metabólica diminui a toxicidade desse alcalóide. A toxicidade manifestada pelos animais incluiu alterações como atrofia testicular, a espermatogênese e oligo espermatogênese ⁽⁷³⁾.

Alguns estudos responsabilizam as metilxantinas – como a teofilina e a cafeína - por mortes acidentais decorrentes de sobredosagem, mas é importante notar que o uso terapêutico desses alcalóides é limitado em virtude de sua ação promotora de arritmias cardíacas e convulsões ⁽⁷⁴⁾.

Pesquisas realizadas mais recentemente apontam que alcaloides, como a teobromina ou a teofilina, contribuem com a vasodilatação e a broncodilatação, auxiliam no relaxamento muscular leve, e também podem ser usados para controlar distúrbios respiratórios como a asma. Tais constatações contradizem os estudos anteriormente elencados, que mencionam tão somente a ação tóxica dessas substâncias ^(75,76).

Por outro lado, há relatos de que alcalóides como a teobromina ou a cafeína podem causar efeitos humorais no sistema nervoso central ou, em outros casos, aumentar a diurese. A teobromina pode até atuar como bioestimulante do sistema nervoso quando associada à cafeína, e pode promover respostas negativas se não for administrada adequadamente ⁽⁷⁷⁾⁽⁷⁸⁾.

Entretanto, há que ressaltar que os possíveis efeitos tóxicos da teobromina em seres humanos seriam menos deletérios do que aqueles oriundos da cafeína ou da teofilina, que também são metilxantinas contidas no cacau. Poucos são os relatos de toxicidade da teobromina, possível razão pela qual organizações como a *Food and Drug Administration* (FDA – Administradora de Alimentos e Drogas) ou a *World Anti-Doping Agency* (WADA – Agência Mundial Anti-Doping) não incluíram esse alcalóide na lista de elementos cujo consumo implica risco à saúde, sendo sua comercialização para ensaios clínicos em seres vivos realizada livremente. Ainda assim, não se pode ignorar os efeitos tóxicos dessa substância em animais, com ênfase aos mamíferos não humanos ⁽⁷⁰⁾⁽⁷⁹⁾⁽⁸⁰⁾.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito da adição de 1% de teobromina sobre as seguintes propriedades do cimento de ionômero de vidro convencional: cor, dureza, sorção, solubilidade, flexão biaxial, capacidade antimicrobiana e liberação de flúor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Um único fator de variação foi testado, perfazendo um total de dois grupos experimentais analisados por seis variáveis de resposta (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 - Grupos experimentais

Fator de variação	Adição de princípio ativo	Sem adição
		Adição de 1% de Teobromina
Unidades experimentais	Discos de cimento de ionômero de vidro	
Variáveis resposta	Ensaio de sorção e solubilidade (n total=10) Ensaio de microdureza (n total =20) Avaliação de cor por espectrofotometria (n total =20) Ensaio de resistência à flexão biaxial (n total =60) Quantificação da formação de biofilme por <i>S. mutans</i> . (n total =40) Avaliação da dosagem de Flúor (n total=10)	

4.2 Formulação do composto experimental

Neste estudo, foi utilizado um cimento de ionômero de vidro convencional (GC Gold Fuji 9, GC Corp, Japão, Número do Lote 1701241) ⁽⁴⁴⁾ (Figura 4.1), para compor os espécimes do G1. Para obtenção dos espécimes do G2, o composto experimental foi obtido incorporando 1% - em peso - de Teobromina (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) (Figura 4.2), ao pó do CIV, totalizando 0,05 gramas, aferido em balança analítica com precisão de 0,01mg (ATX 224, Shimadzu, Japão). Esta concentração foi determinada em estudo piloto, levando em consideração que as características de manipulação do material, com brilho de superfície ao final da manipulação, (Figura

4.3), estivessem presentes. Assim, em todos os ensaios realizados, metade da amostra pertencia ao G1, enquanto a outra metade ao G2.

Figura 4.1 – Cimento de Ionômero de Vidro convencional utilizado

Figura 4.2 - Teobromina cristalina para adição ao CIV

Figura 4.3 - Brilho de superfície ao final da manipulação do CIV

4.3 Montagem dos espécimes

O material foi proporcionado conforme indicado para a elaboração de discos de trabalho 2 colheres medida do pó para 2 gotas de líquido, aglutinado gentilmente com espátula plástica por um período de até 30 segundos em temperatura de 23°C (Figura 4.4). Foram utilizadas matrizes circulares de três diferentes tamanhos (diâmetro X espessura, em milímetros), (Figura 4.5), a depender do ensaio que era realizado: bipartida de Teflon (8,6× 1,65) – para avaliação de dosagem de flúor; alumínio (12×1mm) - para ensaio de resistência à flexão biaxial e quantificação da formação de biofilme; e alumínio (15×1mm) – para os ensaios de microdureza, cor, sorção e solubilidade.

Figura 4.4 – CIV proporcionado para a fabricação de discos

Figura 4.5 – Matrizes circulares: A - alumínio (12×1mm) - para ensaio de resistência à flexão biaxial e quantificação da formação de biofilme; B - alumínio (15×1mm) – para os ensaios de microdureza, cor, sorção e solubilidade; C - bipartida de Teflon (8,6× 1,65) – para avaliação de dosagem de flúor

Sobre uma placa de vidro polida foi colocada uma placa de acetato, sobre a qual foi posicionada a matriz de alumínio, (Figura 4.6). O CIV foi manipulado segundo as instruções do fabricante (Quadro 4.2) e inserido na matriz com o auxílio de uma seringa tipo centrix (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil), com ligeiro excesso (Figura 4.7). Sobre esse conjunto foi posicionada uma nova placa de acetato e sobre ela outra placa de vidro polida. O CIV foi mantido na matriz a 37°C, por 24 horas a contar do início da manipulação do material. Findo esse período, a matriz de alumínio foi removida e os discos acabados na sua periferia, com lixa de granulação 1000, (Figura 4.8).

Quadro 4.2 – Instruções de uso CIV Fuji IX

INSTRUÇÕES DE USO	
Relação Pó / Líquido (g / g)	3.6 / 1.0
Tempo de mistura (S)	25-30"
Tempo de trabalho (min. S)	2'00"
Tempo total de presa (min. S)	2'20"
Condição dos testes: temperatura (23+- 1°C), umidade relativa (50 +- 10%) ISO 9917: 1991 (E) (cimentos dentais a base de água).	

Figura 4.6 – Placas de vidro e acetatos posicionados para montagem dos espécimes

Figura 4.7 – CIV inserido na matriz com o auxílio de uma seringa tipo centrix

Figura 4.8 – Discos do CIV elaborados com as matrizes metálicas

4.4 Ensaio de sorção e solubilidade

O teste de sorção e solubilidade foi baseado na Norma ISO 4049.⁽⁸¹⁾ Os espécimes (n total=10) foram colocados em um dissecador com sílica gel azul (Figura 4.9), mantidos em estufa (marca Orion Fanen-Brasil) a 37°C por 22 horas. Em seguida, foram trocados para um outro dissecador a 23°C, no qual permaneceram por duas horas. A seguir, cada um dos espécimes foi pesado em balança analítica com precisão de 0,01mg (ATX 224, Shimadzu, Japão), com intervalo de 24 horas, até a obtenção de uma massa constante (m_1).

Figura 4.9 – Discos do CIV mantidos em sílica gel

Após a obtenção da (m_1), o diâmetro e a espessura dos espécimes foram mensurados com um paquímetro digital (MPI/E-101, Mytutoyo, Tokyo, Japan). O diâmetro foi mensurado em quatro pontos equidistantes e a espessura no centro e em quatro pontos espaçados na circunferência do espécime. A partir das medidas de diâmetro e espessura, foram calculados a área do espécime em mm^2 , e o volume do espécime em mm^3 .

Em seguida, os espécimes foram imersos, individual e verticalmente, em 10mL de água destilada contida em tubos do ensaio, durante sete dias, em estufa (marca Orion Fanen-Brasil) a 37°C (Figura 4.10). Findo esse período, os espécimes foram lavados com água destilada e secos com jatos de ar por 15 segundos e, um minuto depois, pesados em balança analítica de precisão de 0,01mg (m_2). Posteriormente, os espécimes foram submetidos ao mesmo processo de secagem descrito para obtenção da m_1 , até a obtenção de nova massa constante (m_3).

Figura 4.10 – Discos do CIV imersos na água destilada e estufa

A sorção e a solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) foram obtidas com o auxílio das seguintes equações:

$$Wsl = \frac{m1 - m3}{V}$$

$$Wsp = \frac{m2 - m3}{V}$$

Wsp = Sorção

Wsl = Solubilidade

m2 = massa da amostra em microgramas, após a imersão em água por 7 dias

m3 = massa da amostra recondicionada, em microgramas

m1 = massa condicionada em microgramas antes da imersão em água

V = volume da amostra em mm^3

4.5 Ensaio de microdureza

Vinte espécimes foram montados e armazenados por 24 horas em temperatura ambiente, em umidade relativa. Para leitura da microdureza Vickers foram realizadas cinco indentações (carga de 25g, por 30s) espaçadas por $100\mu\text{m}$ no microdurômetro (HVM-G series 21, Micro Vickers Hardness Tester, Shimadzu, Kyoto,

Japão) (Figura 4.11), com o auxílio de *software* HMV-G específico para o aparelho supracitado. As cinco indentações estavam dispostas como na (Figura 4.12). O valor de dureza final para cada espécime foi obtido pelo cálculo da média aritmética das cinco indentações de cada espécime.

Figura 4.11 - Microdurômetro Hardness Tester, Shimadzu, Kyoto, Japão

Figura 4.12 - Representação esquemática das indentações nos espécimes

4.6 Avaliação de cor por espectrofotometria

Nos mesmos vinte espécimes produzidos para o ensaio de microdureza, foi realizada a detecção da cor utilizando um espectrofotômetro (CM3700A, Konica Minolta, Tokio, Japão) (Figura 4.13), acoplado ao *software* especializado medidor de cor, de acordo com a norma ISO 7491 ⁽⁸²⁾. A cor dos espécimes foi registrada com base no sistema colorimétrico CIE L*a*b*, no qual L* indica a luminosidade e a* e b* são as coordenadas cromáticas. Enquanto a* é coordenada vermelho / verde (+a indica vermelho e -a indica verde), b* é coordenada amarelo / azul (+b indica amarelo e -b indica azul).

Figura 4.13 - Espectrofotômetro (CM3700A, Konica Minolta, Tokio, Japão)

O *software* foi pré-calibrado em branco, tal como indicado pelo fabricante. O iluminador utilizado foi o D65, com ângulo de entrada de 45° e ângulo geométrico de observação de 2°. A cor foi obtida mediante a equação.

$$\Delta E^* = \frac{[\Delta L^*^2 + \Delta a^*^2 + \Delta b^*^2]}{2}$$

onde:

ΔL^* = diferença em mais claro e escuro (+ = mais claro, - = mais escuro)

Δa^* = diferença em vermelho e verde (+ = mais vermelho, - = mais verde)

Δb^* = diferença em amarelo e azul (+ = mais amarelo, - = mais azul)

ΔE^* = diferença total de cor

4.7 Ensaio de resistência a flexão biaxial

Para o ensaio de resistência flexural, os 60 espécimes foram armazenados na estufa (marca Orion Fanen-Brasil) a 37°C, por 24 horas. Foi utilizada uma máquina de Ensaio Universal (EMIC, LINHA DL 2000) (Figura 4.14), onde foi acoplado o acessório específico para este ensaio, comandado pelo *software* Tesc. Foi aplicada uma carga em Newtons de 1000N e 5000N sobre os espécimes; o cálculo da flexão biaxial foi realizado com base na seguinte formula:

$$\frac{\sigma_f = -0,2387F(X - Y)}{w^2}$$

onde σ_f é a resistência à flexão biaxial, F é a carga no momento da fratura, w é a espessura do espécime e X e Y são determinados pelas seguintes equações:

$$X = (1+\nu)1n(B/C)^2 + [(1-\nu)/2](B/C)^2$$

$$Y = (1+\nu)[1+1n(A/C)^2] + (1-\nu)(A/C)^2,$$

onde ν é o coeficiente de Poisson (0,3)⁽⁸³⁾, A é o raio do círculo formado pelas esferas de apoio (5) B é o raio da ponta do pistão (0,79) e C é o raio do espécime (12).

Figura 4.14 - Máquina de Ensaio Universal Instron (EMIC, LINHA DL 2000)

4.8 Quantificação da formação de biofilme por *S. mutans*

A metodologia adotada para a quantificação dos biofilmes de *S. mutans* foi baseada em ⁽⁸⁴⁾ ⁽⁸⁵⁾ ⁽⁸⁶⁾, com algumas modificações. Os ensaios foram realizados em 40 espécimes de CIV.

Os biofilmes foram desenvolvidos sobre os espécimes, que foram inseridos em placas de microtitulação de 24 poços. As cepas de *S. mutans* (UA159) foram cultivadas em Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) a 37°C, por 16 horas, em câmara à atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as colônias foram raspadas e transferidas para meio líquido Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, Leeuwarden, Holanda) adequadas a DO₆₀₀=0,3 verificada em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Os tubos foram incubados novamente em câmara de CO₂ nas mesmas condições descritas anteriormente por três horas.

Findo o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 5.000Xg durante 5 minutos e o sobrenadante ressuspense em Biofilm Medium (BM) baseado no manuscrito de ⁽⁸⁷⁾ acrescido de 1% de sacarose, como fonte de carboidratos e padronizadas na $DO_{600}=0,8$ (cerca de 1×10^{10} ufc/ml). Das suspensões padronizadas, alíquotas de 1ml foram depositadas em cada poço, em quintuplicata, durante três horas. Depois desse período, o meio foi substituído por TSB suplementado por 1% de sacarose por períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, sendo o meio TSB trocado a cada 24 horas.

Para a avaliação da biomassa, o meio de cultura foi removido e a coloração do biofilme foi realizada com 500µl de safranina a 0,4% durante 15 minutos, em temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes por imersão em água destilada. Em seguida, as descolorações dos biofilmes foram realizadas com 500µl de etanol a 95% por 15 minutos. Após esse período, cinco alíquotas de 50µl da solução de etanol de cada poço foram transferidas para placas de 96 poços e verificadas em leitor de Elisa (Microplate Reader Model 680, Biorad, Foster City, California, EUA) na absorbância de 490nm (A_{490}). Desse modo, foram obtidas cinco leituras de cada poço experimental, totalizando quinze leituras para cada experimento.

4.9 Avaliação da dosagem de Flúor

Para a avaliação da dosagem de flúor, tomou-se por base as metodologias propostas por ⁽⁸⁸⁾ ⁽⁸⁹⁾ ⁽⁹⁰⁾, com algumas modificações. Com a utilização de matrizes circulares bipartidas de Teflon (8,6 mm de diâmetro por 1,65mm de espessura) com um suporte de alumínio foram montados os espécimes, à temperatura ambiente ($23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e $50 \pm 5\%$ de umidade relativa), de acordo com o padrão ISO 7489 e seguindo as instruções do fabricante.

Sobre uma placa do vidro polida foi colocada uma placa de acetato, sobre a qual foi posicionada a matriz bipartida do teflon, acoplada ao suporte metálico. O CIV foi colocado na matriz, conforme descrito anteriormente, tendo sido adicionada uma peça de fio dental com parafina para poder suspender as amostras no meio a ser utilizado, (Figura 4.15).

Figura 4.15 - Matrizes bipartidas do teflon inseridas com CIV

Após o processo de endurecimento do material, as amostras foram liberadas das matrizes e colocadas em uma estufa (marca Orion Fanen-Brasil) (37°C, 100% de umidade relativa) por período de 24 horas antes do início do experimento. Posteriormente, as amostras foram removidas da estufa e lavadas individualmente em 1ml de água deionizada, (Figura 4.16). Realizado esse procedimento, os discos foram individualmente imersos em tubos estéreis para centrífuga de 5ml contendo 1ml de saliva artificial de armazenamento, (Figura 4.17). [Ca 1,5mM (CaCl_2 0,1665g/l); PO_4 0,9mM (NaH_2PO_4 0,133g/l); KCl 150mM (KCl 11,184g/l); Tris buffer 20mM (2,4228g/l) e NaN_3 0,02%]. O pH foi ajustado para 7,0 pela adição de HCl diluído, tendo sido preparado um litro de solução.

Figura 4.16 - Representação esquemática amostras lavadas individualmente em 1ml de água deionizada

Figura 4.17 - Amostras imersas 1ml de saliva artificial

Uma vez findo o processo de imersão dos espécimes no meio salivar, os tubos foram levados a um banho de agitação a 37 graus em agitador acoplado à incubadora (Nova Ética, Incubadora Modelo 430 RDB, São Paulo Brasil) (Figura 4.18) (Figura 4.19). O meio de armazenamento foi removido a cada 24 horas, usando a mesma quantidade de 1ml. Ao final de 24 hs os espécimes eram lavados com 1ml de água

deionizada e inserido em um novo tubo contendo 1ml de saliva. Esse procedimento foi realizado durante 15 dias, totalizando 150 amostras de saliva imersas em ionômero e 10 amostras de saliva pura, que constituíam o grupo controle.

Figura 4.18 - Agitador acoplado à incubadora (Nova Ética, Incubadora Modelo 430 RDB, São Paulo Brasil)

Figura 4.19 - Representação esquemática espécimenes acoplados à incubadora

Na solução de armazenamento das amostras foi colocado 1ml de solução padrão TISAB em diferentes concentrações, com a finalidade de proceder às medições do flúor e obter uma curva da calibração. Para esse processo, utilizou-se um eletrodo seletivo para flúor (Mettler Toledo Modelo T50 perfectION Fluoride Combination) submetido a agitação magnética.

4.10 Forma de análise dos resultados

Todos os dados obtidos nos ensaios acima descritos foram quantitativos. Assim, cada um dos conjuntos de dados provenientes dos ensaios teve sua distribuição analisada individualmente. Sempre foi considerado apenas um fator de variação, a adição de 1% de teobromina.

Os dados provenientes dos ensaios de sorção e solubilidade, dureza, cor e resistência à flexão apresentaram distribuição normal e homogênea dos dados, tendo sido utilizada análise de variância (One way ANOVA) para detectar a diferença estatisticamente significativa, admitindo-se 5% de nível de significância. Para a comparação entre os grupos experimentais adotou-se o teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Para os conjuntos de dados provenientes dos ensaios de quantificação da formação de biofilme e de dosagem de flúor, foi utilizada ANOVA dois fatores, pois foram dados analisados ao longo do tempo para obtenção de curvas. Da mesma forma, os grupos experimentais foram comparados com o teste de Tukey, admitindo-se 5% de nível de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de sorção

Para avaliar o efeito da adição de teobromina ao cimento de ionômero de vidro sobre a sorção, as distribuições normais dos dados de sorção foram analisadas com o auxílio do teste de análise de variância (ANOVA um fator). Depois, para comparar os grupos experimentais entre si foi realizado o teste de Tukey, adotando-se 95% de nível de significância ($p < 0,05$).

A tabela 5.1 indica os valores resumo média, desvio-padrão, mínimo e máximo para apontar a variabilidade de sorção do cimento de ionômero de vidro puro (G1) e modificado com teobromina (G2). ANOVA não detectou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,99$) entre os grupos testados.

Tabela 5.1 – Média, desvio padrão valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de sorção, com valor ($p = 0,99$) ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$).

Grupos experimentais	N	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
ST	5	0,13 $\pm$ 0,01 A	0,10	0,16
CT	5	0,13 $\pm$ 0,03 A	0,10	0,16

5.2 Ensaio de solubilidade

Para avaliar o efeito da adição de teobromina ao cimento de ionômero de vidro sobre a solubilidade do material, a distribuição dos dados de solubilidade foi analisada com o auxílio do teste de análise de variância (ANOVA um fator). Posteriormente, para comparar os grupos experimentais entre si foi necessário o teste de Tukey, adotando-se 5% de nível de significância ($p < 0,05$).

A tabela 5.2 indica os valores resumo média, desvio-padrão, mínimo e máximo para apontar a variabilidade de solubilidade do cimento de ionômero de vidro sem teobromina (G1) e com teobromina (G2). O teste ANOVA evidenciou que não existe diferença estatisticamente significativa ($p=0,86$) entre os grupos testados.

Tabela 5.2 – Média, desvio padrão valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de solubilidade ($p=0,86$) ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$).

Grupos experimentais	N	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
ST	5	0,017 $\pm$ 0,00 A	0,02	0,00
CT	5	0,018 $\pm$ 0,01 A	0,03	0,00

5.3 Ensaio de microdureza

A distribuição normal dos dados de microdureza, identificada pelo teste de Bonferroni, possibilitou a realização de teste de análise de variância (one-way ANOVA), considerando a adição de teobromina como fator de variação. O teste de Tukey, com nível de significância de 5%, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais.

A tabela 5.3 mostra as medidas resumo média, desvio-padrão, valores mínimo e máximo, para apontar a variabilidade da microdureza dos grupos experimentais. O teste ANOVA revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,00$). Para identificação das diferenças entre os grupos foram realizadas comparações múltiplas, e verificou-se aumento da microdureza do cimento de ionômero de vidro quando acrescido de 1% de teobromina (G2), em comparação ao G1.

Tabela 5.3 – Média, desvio padrão, valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de microdureza, ($p=0,00$). (kgf/mm^2)

Grupos experimentais	N	Média* $\pm$ Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
ST	10	35,3 $\pm$ 3,9 A	31,89	38,77
CT	10	60,9 $\pm$ 6,1 B	57,53	64,40

* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

5.4 Avaliação da cor

A análise da distribuição dos dados relativos à cor revelou normalidade. Assim, foi aplicado o teste de análise de variância (um fator ANOVA) para avaliar o efeito da adição de teobromina ao cimento de ionômero de vidro. Posteriormente foi realizado o teste de Tukey para comparar os grupos experimentais ($p<0,05$).

A tabela 5.4 indica os valores resumo média e desvio-padrão para apontar a variabilidade da cor do cimento de ionômero de vidro, modificado com teobromina ou não. As coordenadas de cor analisadas foram: *L (luminosidade), *a (coordenada vermelho – verde), *b (coordenada amarelo – azul), C (saturação), h (ângulo de coloração), lidas sobre fundo preto ou branco. Destaque-se que cada uma das coordenadas avaliadas foi objeto de análise estatística específica.

Para as coordenadas *a fundo preto ($p=0,65$), *a fundo branco ($p=0,97$), C fundo preto ($p=0,69$), C fundo branco ($p=0,78$) e h fundo preto ($p=0,31$), h fundo branco ($p=0,12$), L fundo branco ($p=0,19$), *b fundo preto ($p=0,66$) não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com e sem teobromina (Tabela 5.4).

Contudo, para as coordenadas *L fundo preto ($p=0,00$) e *b fundo branco ($p=0,04$) foram detectadas diferenças estatisticamente significantes. Para a coordenada *L, quando o fundo era preto, o grupo cimento de ionômero de vidro com teobromina (G2) ($78,6\pm0,5$) apresentou maior luminosidade do que o do grupo sem teobromina (G1) ($77,5\pm0,6$). Na coordenada *b com fundo branco, G1($19,0\pm0,6$) teve maiores valores do que G2($18,5\pm0,3$).

A diferença em coordenadas absolutas de cor (ΔE) entre os cimentos de ionômero de vidro com e sem teobromina foi de $1,38 \pm 0,22$.

Tabela 5.4 – Média e desvio padrão dos grupos experimentais quando realizado ensaio de cor, ($p=0,00$); ($p=0,04$). referente a fundo preto e fundo branco respectivamente

GRUPOS	L		A		B	
	P	B	P	B	P	B
ST	$77,5 \pm 0,6$ A	$85,1 \pm 0,9$ C	$1,3 \pm 0,2$ D	$4,7 \pm 0,6$ E	$10,6 \pm 0,7$ F	$19,0 \pm 0,6$ G
CT	$78,6 \pm 0,5$ B	$85,5 \pm 0,3$ C	$1,3 \pm 0,1$ D	$4,7 \pm 0,2$ E	$10,5 \pm 0,3$ F	$18,5 \pm 0,3$ H

Dados avaliados em colunas.

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

5.5 Ensaio de resistência flexural

Também os dados de resistência flexural, após a análise de sua distribuição, revelaram normalidade. Assim, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA um fator) para avaliar o efeito da adição de teobromina ao cimento de ionômero de vidro sobre a resistência à flexão. Posteriormente, foi realizado o teste de Tukey para comparar os grupos experimentais entre si, adotando-se 5% de nível de significância ($p < 0,05$).

A tabela 5.5 indica os valores resumo média, desvio-padrão, mínimo e máximo para apontar a variabilidade da resistência flexural do cimento de ionômero de vidro, modificado com teobromina ou não. ANOVA detectou diferença estatisticamente significativa ($p=0,00$) entre os grupos testados, com maior resistência para o grupo G1 do que para o grupo G2.

Tabela 5.5 – Média, desvio padrão, valores mínimo e máximo dos grupos experimentais quando realizado ensaio de resistência flexural, (Mpa) ($p=0,00$)

Grupos experimentais	N	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
ST	30	54,34 $\pm$ 4,76 A	43,70	61,62
CT	30	47,40 $\pm$ 4,96 B	36,36	57,47

* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

5.6 Quantificação da formação de biofilme por *S. mutans*

A distribuição normal dos dados de formação de biofilme por *Streptococcus mutans*, identificada pelo teste de Bonferroni, possibilitou a realização de teste de análise de variância (two-way ANOVA), considerando o tipo de CIV (sem teobromina [G1] e com teobromina [G2]) e o tempo de contato com inóculo bacteriano para formação de biofilme (24, 48, 72 e 96 horas) como fatores de variação. O teste de Tukey, com nível de significância de 5%, foi utilizado para a comparação entre os grupos experimentais.

O teste ANOVA revelou diferença estatisticamente significativa para o fator tempo de contato com inóculo bacteriano ($p=0,00$) e para o fator CIV modificado por teobromina ($p=0,005$). Contudo, a interação entre os fatores testados não foi estatisticamente significativa ($p=0,152$).

As comparações múltiplas revelaram menor quantidade de biofilme nos espécimes nos quais o CIV continha 1% de teobromina (G2). Adicionalmente, a menor quantidade de biomassa foi depositada após 24 horas, enquanto não pode ser detectada diferença estatisticamente significativa entre os tempos 48 e 72 horas. A maior quantidade de biomassa foi depositada após 96 horas do contato dos espécimes com o inóculo bacteriano.

5.7 Avaliação da dosagem de flúor

A distribuição normal dos dados, identificada pelo teste de Bonferroni, possibilitou a realização de teste de Análise de Variância (ANOVA dois fatores), considerando como fatores de variação a adição de teobromina (G1 – sem teobromina e G2 – com teobromina) e o tempo (1 a 15 dias). O teste de Tukey foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais, adotando nível de significância de 5%.

A ANOVA demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas para o fator tempo, em dias ($p=0,00$). Contudo, para o fator adição de teobromina ($p=0,52$) e a interação ($p=0,28$) não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes.

O gráfico 5.1 demonstra claramente a queda de concentração de flúor liberado com o mesmo padrão, independentemente de ser um CIV com ou sem teobromina. A concentração é fortemente influenciada pelo fator tempo, havendo uma redução drástica já na leitura do dia 2, que permanece caindo de forma significativa até o dia 5. Deste dia em diante, até o dia 15, as concentrações permanecem estáveis.

Gráfico 5.1 – Concentração de flúor liberado em saliva artificial dos grupos experimentais (µg F/cm²)

6 DISCUSSÃO

Em virtude dos efeitos antibacterianos decorrentes de sua capacidade de liberação de flúor, o CIV tem sido considerado um bom material terapêutico para uso dentário ao longo dos anos. Contudo, seu uso é restrito a indicações precisas, devido a algumas características menos favoráveis, tais como, baixa resistência aos esforços mastigatórios e menor resistência ao desgaste, além de pouca estética. Apesar das tentativas de solucionar essas propriedades limitantes, não houve resultados satisfatórios até a atualidade ⁽²³⁾.

Nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo de avaliar algumas propriedades do CIV - como microdureza, alteração de cor, flexão, sorção, solubilidade, capacidade antimicrobiana e liberação do flúor – mediante a adição de um princípio ativo. O princípio ativo utilizado é um alcalóide componente do cacau conhecido como teobromina, cuja aplicação já foi avaliada em outras áreas das ciências médicas, incluindo a odontologia, com resultados satisfatórios ^(58,65,66,67,68,14,13).

No presente estudo, a incorporação de 1% de teobromina ao pó de ionômero de vidro (ISO 4049) não interferiu nas propriedades de sorção e solubilidade do CIV, pois não se constataram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. Este pode ser considerado um resultado muito interessante. Se não há alteração na sorção do CIV modificado com teobromina, significa que o material permanece com a mesma capacidade de absorver líquidos que o material convencional. Em relação à solubilidade, quando diminuída, pode significar dissolução do material ao longo do tempo, comprometendo sua durabilidade. E quando aumentada pode comprometer suas propriedades de liberação de fluoretos.

Autores que modificaram CIVs com 1% de própolis natural e 2% liofilizada verificaram que a incorporação dessa substância natural ao CIV produz maior sorção e, dependendo da condição, pode alterar a solubilidade do material ⁽⁹⁵⁾, sendo este um resultado desfavorável, pois uma maior sorção causa enfraquecimento do material. Outros autores modificaram o CIV com partículas de sílica em três concentrações (0,06, 0,08 e 0,1% de peso) e observaram aumento na sorção de água e diminuição na solubilidade deste material modificado, havendo comprometimento

das propriedades do material ⁽⁹⁶⁾. Por outro lado, estudos ⁽³⁸⁾ revelaram maiores valores de sorção e menores valores de solubilidade para o CIV modificado por resina.

Assim, uma vez que não houve alteração destas propriedades do material modificado, considera-se seu uso como seguro neste quesito.

No que concerne à microdureza, há relato de diminuição considerável em amostras circulares de CIV previamente imersas em meio tampão e depois submetidas à análise de dureza Vickers com leituras de carga de 50 gramas por 20 segundos em três endentações aleatórias, em comparação a um ionômero de fotoativação e uma resina ⁽⁹¹⁾.

Já quando da adição de um composto ativo – prolina - ao ionômero convencional, verificou-se aumento significativo da dureza ⁽⁹²⁾. Tal achado assemelha-se àquilo que se observou neste estudo, no qual a adição de 1% (0,05 gramas) de teobromina ao CIV promoveu aumento significativo de dureza.

Já a incorporação de N-vinylcaprolactama a ionômeros de vidro convencionais não apresentou aumento de dureza estatisticamente significativo entre os grupos experimental e controle ⁽⁹³⁾. No entanto, é importante ressaltar que o princípio ativo utilizado na presente pesquisa – a teobromina - não tem relação com o N-vinilprocalactama, o que dificulta a comparação entre os dois estudos.

Contrariamente ao que se verificou nesta investigação, de aumento significativo da dureza do CIV depois de 24 horas da incorporação de teobromina, a adição de monômeros adesivos ou *nanofillers* ao CIV convencional e de fotoativação promoveu diminuição significativa da dureza 24 horas depois da preparação do espécime. E, a despeito do aumento moderado de dureza e da maior predisposição à resistência constatados entre a quarta e a oitava semanas, os autores não relatam significância estatística para tais achados ⁽⁹⁴⁾.

O aumento da dureza de um material odontológico pode lhe conferir aumento da sua resistência aos esforços mastigatórios. Assim, consideramos que a adição de teobromina ao CIV foi benéfica neste sentido.

Na presente investigação, a incorporação de 1% de teobromina ao pó do cimento de ionômero de vidro convencional não alterou a cor do grupo CT em relação ao grupo ST.

Para verificar se a incorporação de clorexidina a 1,25 e 2,5% ao CIV altera a estabilidade da cor e a liberação de flúor às 24 horas, 7 e 30 dias, realizou-se um estudo em que 0,22 e 0,44 gramas de pó de diacetato de clorexidina foram adicionados a 0,15 gramas de CIV convencional e CIV modificado por resina. Os autores não observaram mudanças significativas na estabilidade da cor de ambos os CIV testados ⁽⁹⁷⁾, estando este resultado de acordo com os observados nesta pesquisa.

Não foram localizados na literatura outros estudos que alterassem a composição do CIV com outras substâncias e avaliassem cor. Contudo, autores detectaram que CIVs convencionais podem ter sua cor afetada por diferentes enxaguatórios bucais ⁽⁹⁸⁾ e bebidas de uso habitual ⁽⁹⁹⁾ em estudos de imersão de espécimes, sendo este tipo de metodologia diferente da realizada neste trabalho.

Neste trabalho foi utilizados duas cores de fundo para as leituras de cor, no que se refere a luminosidade houve diferença significativa apenas entre os grupos ST e CT quando utilizado o fundo preto, contudo, este resultado não compromete a estética de restaurações que possam a vir ser confeccionadas com este material, já que o CIV convencional não é comumente utilizado em restaurações estéticas em dentes anteriores.

Neste estudo, quando o ionômero de vidro foi adicionado de 1% de teobromina, observou-se diminuição da resistência à flexão biaxial. Contudo, como este material está mais indicado para restaurações provisórias, a alteração desta propriedade não chega a comprometer a tentativa de inovação ao adicionar a teobromina ao CIV.

A fim de comparar a resistência e desgaste de três ionômeros de vidro convencionais, em comparação com um ionômero modificado com resina, os resultados verificaram que todos os cimentos tiveram um bom comportamento em relação à resistência biaxial quando foram imersos na solução neutra, no entanto, os ionômeros de vidro convencionais mostraram maior desgaste nos sucros cítricos, o oposto com o CIV modificado por resina que não foi afetado pelo desgaste, mas diminuiu em resistência.⁽¹⁰⁰⁾

Para estudar as propriedades mecânicas de três ionômeros de vidro convencionais e um ionômero reforçado com partículas de zinco, foram utilizadas amostras de discos que receberam uma fina camada de resina como revestimento de

superfície. O estudo revelou melhoria na flexão biaxial do ionômero modificado com zinco. No entanto, todos os ionômeros que foram revestidos com a resina de superfície obtiveram melhoria considerável na resistência à flexão ⁽¹⁰¹⁾. Desta forma, sugere-se que muito cuidado deve ser tomado quando da adição de princípios ativos, pois eles podem alterar a resistência à flexão biaxial do material, comprometendo seu desempenho em áreas de esforço mastigatório aumentado.

Em relação à quantificação da formação de biofilme por *S. mutans*, as propriedades antibacterianas e fisicoquímicas de um CIV convencional foram analisadas, às quais 0,1% de epigallocatequina-3-galato (EGCG) foram adicionados como um grupo experimental e, como controle positivo, a clorexidina, em várias concentrações. A flexão de três pontos foi realizada seguindo os padrões ISO, a microdureza com três indentações e o flúor utilizando um teste cromatográfico. Os resultados determinaram que o EGCG a 1% incorporado no CIV melhorou as propriedades mecânicas e antibacterianas do ionômero sem influenciar a liberação de íons fluoreto ⁽¹⁰²⁾.

Resultado similar obtido no presente estudo em que, ao quantificar o biofilme formado em um período entre 24-96 horas, foi capaz de estabelecer uma diminuição considerável do biofilme nos discos de ionômeros que continham 1% de teobromina.

A capacidade antibacteriana de 4 ionômeros de vidro convencionais no tratamento restaurador atraumático foi avaliada utilizando o teste de difusão de placa em agar e respeitando as características fisiológicas de cada microrganismo: *S. Mutans*, *S. Sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces viscosus*. Os resultados revelaram que todos os materiais estudados tinham atividade antibacteriana com melhor contribuição dos ionômeros convencionais ⁽¹⁰³⁾. Resultado semelhante obtido nesta investigação em que o uso do ionômero convencional em uma cepa de *S. Mutans* revelou ter ação antibacteriana.

No entanto, uma das propostas desta pesquisa foi melhorar o material, então, quando adicionado (teobromina 1%), foi encontrada uma melhor ação contra o microrganismo *S. Mutans*, uma vez que foi detectada uma menor quantidade de biofilme depositado sobre o espécime de CIV modificado.

A capacidade antibacteriana e as propriedades mecânicas (flexão e dureza superficial) de um ionômero de vidro convencional comparado com um ionômero de vidro modificado com resina foram avaliadas. Estes CIVs foram modificados de formas diferentes (controle, caseína, 5% de fluoreto de sódio, 0,12% de clorhexidina, 0,05% de cetilpiridínio). Os resultados permitiram estabelecer um melhor comportamento dos ionômeros modificados com 5% de fluoreto de sódio, uma vez que melhoraram suas propriedades mecânicas e houve também uma maior inibição no crescimento de *S. Mutans* ⁽¹⁰⁴⁾. Como neste trabalho experimental que permitiu determinar uma melhor capacidade antimicrobiana ao *S. Mutans* quando o ionômero foi modificado com 1% de teobromina, sem produzir alterações significativas em suas propriedades mecânicas, mas melhorando algumas delas.

Para determinar o efeito bacteriostático das sementes de cacau em *S. mutans*, realizou-se um estudo no qual foi utilizado extrato de cacau entre 0%, 0,01% acima 17,5%, o teste revelou uma considerável inibição no crescimento e formação da cepa estudada na concentração de extrato de cacau de 12,5% ⁽⁷⁾.

Neste estudo, no qual adicionou-se 1% de teobromina ao CIV observou-se diminuição no crescimento de *S. mutans*, que pode ter sido estimulada pelo CIV. Além disso, no estudo acima mencionado foi utilizado extrato de cacau que, além da teobromina, tem componentes como polifenóis e flavonóides, entre outros, que também podem estar relacionados à ação antibacteriana encontrada.

Os benefícios dos componentes do cacau em odontologia são apontados em um artigo de revisão da literatura. De acordo com esse artigo, a teobromina, os polifenóis e os flavonóides têm ação antiglicosiltransferas e antibacteriana. Assim sendo, já estão disponíveis no mercado produtos baseados em *Theobroma cacao*, como pastas de dentes ou enxaguatórios bucais, cuja ação limita a adesão bacteriana à superfície do dente e, por consequência, diminui o crescimento bacteriano ⁽¹⁰⁵⁾. Semelhante a este experimento em que o alcalóide foi adicionado ao CIV, é verificou-se diminuição da quantidade de biofilme depositado.

A capacidade antimicrobiana dos componentes do cacau, referem a ação antiglicosiltransferase contra bactérias cariogênicas, e especialmente a ação de polifenóis que reduzem a formação de biofilme e a produção de ácidos de *S. mutans* ⁽⁵⁵⁾. Tais postulações encontram eco em experimentos realizados *in vivo* em saliva e hidroxiapatita, segundo os quais os ácidos gordurosos e outros elementos - como

catequinas, epicatequinas, alcalóides, flavonóides e polifenóis seriam responsáveis pela diminuição de certas cepas bacterianas ⁽⁵⁸⁾.

Assim, consideramos que a adição da teobromina ao CIV foi benéfica, pois reduziu a quantidade de biofilme depositado sobre os espécimes de CIV modificado.

No que concerne à ação do flúor combinado com outras substâncias, foi realizada uma investigação na qual se avaliou a atuação de flúor, estrôncio e teobromina combinados entre si – (flúor + estrôncio; flúor + teobromina; teobromina + estrôncio; teobromina + fluoreto + estrôncio). De acordo com os resultados, as combinações de teobromina não apresentaram melhores efeitos anticariogênicos que o fluoreto ou o estrôncio ⁽¹⁴⁾. Na presente pesquisa, constatou-se que a adição de um alcalóide a compostos fluorados, como o ionômero de vidro, não altera a capacidade destes de liberar flúor, o que favoreceria uma ação anticariogênica.

Para determinar a capacidade de liberação de flúor de CIV convencional e modificado com resina, foram utilizadas 30 amostras divididas em grupos homogêneos e analisadas em um eletrodo seletivo para fluoretos. Ao final, constatou-se que ambos os ionômeros liberaram fluoreto, com pico mais alto nas primeiras 24 horas e estabilização subsequente da curva de calibração ⁽²⁴⁾. Nesta investigação, com o auxílio do mesmo processo, foi possível verificar que tanto o CIV puro quanto o CIV modificado com 1% de teobromina tinham a capacidade de liberar flúor.

Outros dois estudos voltados ao acompanhamento do padrão de liberação de flúor de diferentes materiais de uso odontológico foram realizados, com base na norma ISO 7489 ^(90,106).

No primeiro estudo, no qual foram utilizados um CIV convencional, um CIV modificado por resina, um compômero e uma resina composta, observou-se melhor comportamento do CIV convencional, seguido por aquele modificado por resina, e valores mais baixos para o compômero, enquanto a resina obteve valores menores para liberação do fluoretos ⁽⁹⁰⁾.

No segundo estudo, que contemplou um ionômero convencional, dois ionômeros modificados por resina e uma resina modificada por poliácidos, foram avaliadas a eliminação de flúor e a eliminação do íon de alumínio. A análise dos resultados revelou que o ionômero modificado por resina teve melhor comportamento na liberação dos íons de flúor e alumínio em relação aos outros materiais ⁽¹⁰⁶⁾.

Já no presente estudo, que utilizou como base o mesmo padrão dos estudos acima mencionados, constatou-se que o ionômero modificado com 1% de teobromina manteve a mesma capacidade de liberação de flúor e não altera essa propriedade, que é fundamental para todos os ionômeros de vidro.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos observou-se que a adição de teobromina ao CIV interfere de forma positiva em duas das propriedades testadas: aumenta a dureza do cimento e reduz a quantidade de biofilme formado sobre o material. Adicionalmente, a adição da teobromina não interfere na sorção e solubilidade; na cor do material; nem compromete a quantidade de flúor liberado pelo CIV para a saliva. Assim, podemos concluir que a adição de 1% de Teobromina ao cimento de ionômero de vidro pode ser considerada uma alternativa válida para melhorar o desempenho do CIV.

REFERÊNCIAS¹

1. Gil García S, Mosquera Arenas S, Hoyos Arias LA, Domínguez Jiménez T, Arango LM, Gallego CL. Cambios en la resistencia compresiva del ionómero de vidrio al ser grabado con ácido ortofosfórico. *Rev Nac Odontol.* 2013 Enero-Jun;9(16):67-73 [citado 23 fev. 2018]. Disponível em: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/od/article/view/12/271>.
2. Mallmann A, Ataíde JC, Amoedo R, Rocha PV, Jacques LB. Compressive strength of glass ionomer cements using different specimen dimensions. *Braz Oral Res.* 2007 Jul-Sep;21(3):204-8.
3. Kleverlaan CJ, van Duinen RN, Feilzer AJ. Mechanical properties of glass ionomer cements affected by curing methods. *Dent Mater.* 2004 Jan;20(1):45-50.
4. de la Paz T, Garcia Alguasil CD, Ureña Espinosa M. Ionómero de vidrio: el cemento dental de este siglo. *Rev Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta.* 2016;41(7) [citado 19 fev. 2018]. Disponível em: <http://revzoilomarinello.sld.cu/index.php/zmv/article/view/724>.
5. Tascón J. Restauración atraumática para el control de la caries dental: historia, características y aportes de la técnica. *Rev Panam Salud Pública.* 2005;17(2):110-5 [citado 25 fev. 2018]. Disponível em: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892005000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
6. Cedillo Valencia JJ. Ionómeros de vidrio remineralizantes: una alternativa de tratamiento preventivo o terapéutico. *Rev ADM.* 2011 Sept-Oct;68(5):258-65 [citado 27 fev. 2018]. Disponível em: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDREVISTA=7&CnIDARTICULO=32166&CnIDPUBLICACION=3481>.
7. Mariani MJ, Jaimes GN, Fernandez da Silva R. Efecto bacteriostático del extracto de semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* in vitro. *Odous Cient.* 2010 Enero-Jun;11(1):15-22.
8. Lee KW, Hwang ES, Kang NJ, Kim KH, Lee HJ. Extraction and chromatographic separation of anticarcinogenic fractions from cacao bean husk. *Biofactors.* 2005;23(3):141-50.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Strålfors A. Inhibition of hamster caries by substances in chocolate. Arch Oral Biol. 1967 Aug;12(8):959-62.
10. Strålfors A. Effect on hamster caries by purine derivatives vanillin and some tannin-containing materials. Caries in relation to food consumption and animal growth. Arch Oral Biol. 1967 Mar;12(3):321-32.
11. Strålfors A. Effect on hamster caries by dialysed, detanned or carbon-treated water-extract of cocoa. Arch Oral Biol. 1966 Jun;11(6):609-15.
12. Amaechi BT, Porteous N, Ramalingam K, Mensinkai PK, Ccahuana Vasquez RA, Sadeghpour A, et al. Remineralization of artificial enamel lesions by theobromine. Caries Res. 2013;47(5):399-405. doi: 10.1159/000348589.
13. Kargul B, Özcan M, Peker S, Nakamoto T, Simmons WB, Falster AU. Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: a pilot study. Oral Health Prev Dent. 2012;10(3):275-82.
14. Lippert F. The effects of fluoride, strontium, theobromine and their combinations on caries lesion rehardening and fluoridation. Arch Oral Biol. 2017 Aug;80:217-21. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.022.
15. Amaechi BT, Mathews SM, Mensinkai PK. Effect of theobromine-containing toothpaste on dentin tubule occlusion in situ. Clin Oral Investig. 2015 Jan;19(1):109-16. doi: 10.1007/s00784-014-1226-1.
16. Cuéllar G O, Guerrero A G. Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, Theobroma cacao L. Rev MVZ Córdoba. 2012;17(3):3176-83.
17. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumoto M. Cariostatic activity of cacao mass extract. Arch Oral Biol. 2000 Sep;45(9):805-8.
18. Silva FDSCM, Duarte RM, Sampaio FC. Liberação e recarga de flúor por cimentos de ionômero de vidro. RGO. 2010 Out/Dez;58(4):437-43.
19. Sidhu SK. Glass-ionomer cement restorative materials: a sticky subject? Aust Dent J. 2011 Jun;56 Suppl 1:23-30. doi: 10.1111/j.1834-7819.2010.01293.x.

20. Anusavice KJ. Phillips materiais dentários. 12ª Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
21. Cabrera Villalobos Y, Álvarez Llanes M, Gómez Mariño M, Casanova Rivero Y. En busca del cemento adhesivo ideal: los ionómeros de vidrio. AMC. 2010;14(1) [citado 27 fev. 2018]. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/pdf/amc/v14n1/amc161410.pdf>.
22. Amaral MT, Guedes-Pinto AC, Chevitarese O. Effects of a glass-ionomer cement on the remineralization of occlusal caries--an in situ study. Braz Oral Res. 2006 Apr-Jun;20(2):91-6.
23. Vieira IM, Louro RL, Atta MT, Navarro MFL, Francisconi PAS. O cimento ionômero de vidro na Odontologia. Rev Saude.Com. 2006;2(1):75-84.
24. Delgado Muñoz CR, Ramírez Ortega JP, Yamamoto Nagano A. Liberación de fluoruro de dos cementos de ionómero de vidrio: estudio in vitro. Rev Odontol Mex. 2014 Abr-Jun;18(2):84-8 [citado 23 fev. 2018]. Disponível em: http://www.scielo.org.mx/pdf/rom/v18n2/en_v18n2a2.pdf.
25. Cildir SK, Sandalli N. Fluoride release/uptake of glass-ionomer cements and polyacid-modified composite resins. Dent Mater J. 2005 Mar;24(1):92-7.
26. De Moor RJ, Verbeeck RM, De Maeyer EA. Fluoride release profiles of restorative glass ionomer formulations. Dent Mater. 1996 Mar;12(2):88-95.
27. Bengtson AL, Pereira CC, dos Santos MA, Bengtson CRG, Bengtson NG, Tubel MDM. Avaliação da atividade antimicrobiana de três cimentos de ionômero de vidro. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2013 Jan/Mar;13(1):119-22.
28. Toledano M, Aguilera FS, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Osorio R. Efficacy and micro-characterization of pathophysiological events on caries-affected dentin treated with glass-ionomer cements. Int J Adhes Adhes. 2016 Sep;69:91-109. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.03.023>.
29. Nicholson JW. Adhesion of glass-ionomer cements to teeth: a review. Int J Adhes Adhes. 2016 Sep;69:33-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.03.012>.

30. Cheetham JJ, Palamara JE, Tyas MJ, Burrow MF. Evaluation of the interfacial work of fracture of glass-ionomer cements bonded to dentin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2014 Jan;29:427-37. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.09.020.
31. Pereira LC, Nunes MC, Dibb RG, Powers JM, Roulet JF, Navarro MF. Mechanical properties and bond strength of glass-ionomer cements. *J Adhes Dent.* 2002 Spring;4(1):73-80.
32. Cerdas-Valverde Y, Gallardo-Barquero C, Morales-Urbe S. Estudio comparativo de la microfiltración con tres materiales para base en piezas temporales. *Rev Cienc Odontol.* 2013 Jul-Dic;9(2):17-22.
33. Simmons JO, Meyers EJ, Lien W, Banfield RL, Roberts HW, Vandewalle KS. Effect of surface treatments on the mechanical properties and antimicrobial activity of desiccated glass ionomers. *Dent Mater.* 2016 Nov;32(11):1343-51. doi:10.1016/j.dental.2016.08.214.
34. Lopes CMC, Schubert EW, Reis A, Wambier DS. Análise da dureza de um novo material restaurador para ART: Glass Carbomer. *Rev Odontol UNESP.* 2016 MAr/Abr;45(2):65-70. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.10915>.
35. Aliping-McKenzie M, Linden RW, Nicholson JW. The effect of Coca-Cola and fruitjuices on the surface hardness of glass-ionomers and 'compomers'. *J Oral Rehabil.* 2004 Nov;31(11):1046-52.
36. Yap AU, Cheang PH, Chay PL. Mechanical properties of two restorative reinforced glass-ionomer cements. *J Oral Rehabil.* 2002 Jul;29(7):682-8.
37. Fabián Molina G, Cabral RJ, Mazzola I, Brain Lascano L, Frencken JE. Biaxial flexural strength of high-viscosity glass-ionomer cements heat-cured with an LED lamp during setting. *Biomed Res Int.* 2013;2013:838460. doi: 10.1155/2013/838460.
38. Severino Lazo R. Sorción y solubilidad del cemento ionómero de vidrio y el cemento ionómero de vidrio con resina. *Theorêma* 2015;2(3): 95-103 [acesso em 18 jan. 2018]. Disponível em: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/Theo/article/view/11980/10725>.

39. Hajmiragha H, Nokar S, Alikhasi M, Nikzad S, Dorriz H. Solubility of three luting cements in dynamic artificial saliva. *J Dent Tehran Univ Med Sci*. 2008;5(3):95-8 [citado 23 jan. 2018]. Disponível em: <http://jdt.tums.ac.ir/index.php/jdt/article/view/154/154>.
40. Busato PMR, Oliveira ECS, Busato MCA, Mendonça MJ, Rodrigues NA, Vendrame TK, et al. Comparação das propriedades de sorção e solubilidade de cimentos submetidos a diferentes soluções e tempos de armazenagem. *Polímeros*. 2012;22(1):69-72. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282012005000008>.
41. Carrillo S C. Sensibilidad posoperatoria con cementos de ionómero de vidrio utilizados como agentes cementantes. *Rev ADM*. 2004 Nov-Dic;61(6):238-9 [citado 15 jan. 2018]. Disponível em: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2004/od046i.pdf>.
42. Barceló S FH, Sato MY, Sánchez J, Serrano CP, Guerrero I J. Estudio comparativo de ionómeros de vidrio y reforzados con metal. *Rev ADM*. 1999 Sep/Oct;44(5):177-81 [citado 15 jan. 2018]. Disponível em: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-1999/od995b.pdf>.
43. Mejare I, Mjör IA. Glass ionomer and resin-based fissure sealants: a clinical study. *Scand J Dent Res*. 1990 Aug;98(4):345-50.
44. GC Fuji IX GP - Radiopaque posterior glass ionomer restorative cement. 2015 [citado 10 fev. 2018]. Disponível em: <https://ua-dent.com/fuji-ix/>.
45. Souza PP, Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2006 Sep;22(9):838-44.
46. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater*. 2008 Dec;24(12):1702-8. doi: 10.1016/j.dental.2008.04.005.
47. Noorani TY, Luddin N, Rahman IA, Masudi SM. In vitro cytotoxicity evaluation of novel nano-hydroxyapatite-silica incorporated glass ionomer cement. *J Clin Diagn Res*. 2017 Apr;11(4):ZC105-ZC109. doi: 10.7860/JCDR/2017/24753.9739.

48. Azevedo MS, Vilas Boas D, Demarco FF, Romano AR. Where and how are Brazilian dental students using Glass Ionomer Cement? *Braz Oral Res.* 2010 Oct-Dec;24(4):482-7.
49. Raggio DP, Bonifácio CC, Bönecker M, Imparato JC, Gee AJ, Amerongen WE. Effect of insertion method on knoop hardness of high viscous glass ionomer cements. *Braz Dent J.* 2010;21(5):439-45.
50. Alves Filho AO, Rocha RDO, Mascaro MSB, Imparato JCPO, Raggio DP. Avaliação in vitro da rugosidade superficial de cimentos de ionómero de vidro utilizados no tratamento restaurador atraumático. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2009;9(2):229-33. doi: 10.4034/1519.0501.2009.0092.0016.
51. Dowling AH, Fleming GJ. Is encapsulation of posterior glass-ionomer restoratives the solution to clinically induced variability introduced on mixing? *Dent Mater.* 2008 Jul;24(7):957-66. doi: 10.1016/j.dental.2007.11.016.
52. Vázquez-Ovando A, Ovando-Medina I, Adriano-Anaya L, Betancur-Ancona D, Salvador-Figueroa M. Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Arch Latinoam Nutr.* 2016;66(3):239-54.
53. Dillinger TL, Barriga P, Escá S, Jimenez M, Lowe DS, Grivetti LE. Food of the Gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr.* 2000 Aug;130(8):2057S-72S. doi: <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2057S>.
54. Alfredo B, Maydata G. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. *Acta Farm Bonaer.* 2002;21(2):149-52.
55. Percival RS, Devine DA, Duggal MS, Chartron S, Marsh PD. The effect of cocoa polyphenols on the growth, metabolism, and biofilm formation by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci.* 2006 Aug;114(4):343-8.
56. Ito K, Nakamura Y, Tokunaga T, Iijima D, Fukushima K. Anti-cariogenic properties of a water-soluble extract from cacao. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003 Dec;67(12):2567-73.

57. Erika. Fichas sustancias indeseables alimentación animal. 2009 [citado 23 jan. 2018]. Disponible em: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento45/teobromina%20web.pdf.
58. Matsumoto M, Tsuji M, Okuda J, Sasaki H, Nakano K, Osawa K, et al. Inhibitory effects of cacao bean husk extract on plaque formation in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci*. 2004 Jun;112(3):249-52.
59. Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol*. 2002 Feb;13(1):41-9.
60. Geeraert E, Sandra P. Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase. Part II. The analysis of chocolate fats. *J Am Oil Chem Soc*. 1987 Jan;64(1):100-5.
61. Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M, Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. *J Dent Res*. 2001 Nov;80(11):2000-4.
62. Visioli F, Bernaert H, Corti R, Ferri C, Heptinstall S, Molinari E, et al. Chocolate, lifestyle, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Apr;49(4):299-312. doi: 10.1080/10408390802066805.
63. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Lüscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*. 2009 Mar 17;119(10):1433-41. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827022.
64. Baharum Z, Akim AM, Hin TY, Hamid RA, Kasran R. Theobroma cacao: Review of the Extraction, Isolation, and Bioassay of Its Potential Anti-cancer Compounds. *Trop Life Sci Res*. 2016 Feb;27(1):21-42.
65. Gazzani G, Daglia M, Papetti A. Food components with anticarcinogenic activity. *Curr Opin Biotechnol*. 2012 Apr;23(2):153-9. doi: 10.1016/j.copbio.2011.09.003.
66. Badiyani BK, Kumar A, Bhat PK, Sarkar S. Chocolate disinfectant : effectiveness of cocoa bean husk extract on streptococcus mutans in used toothbrushes. *IJOER*. 2013 Jul-Sep1(1):7-10.

67. Fernando J, Zumarán C, Armando A, Aguilar A. Prognosis method for risk assessment of dental caries induced by chocolate consumption método pronóstico de valoración de riesgo para caries dental. *Rev Odontol Mex*. 2015 Enero-Mar;19(1):27-32.
68. Aguirre AAA, Vargas ASS. Variación del pH salival por consumo de chocolate y su relación con el IHO en adolescentes. *Oral*. 2012;13(41):857-61.
69. Stavric B. Methylxanthines: toxicity to humans. 3. Theobromine, paraxanthine and the combined effects of methylxanthines. *Food Chem Toxicol*. 1988 Aug;26(8):725-33.
70. Franco R, Oñatibia-Astibia A, Martínez-Pinilla E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients*. 2013 Oct 18;5(10):4159-73. doi: 10.3390/nu5104159.
71. Gans JH. Dietary influences on theobromine-induced toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1982 Apr;63(2):312-20.
72. Shively CA, White DM, Tarka SM Jr. Diet-induced alterations in theobromine disposition and toxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986 Jul;84(3):593-8.
73. Wang Y, Waller DP, Hikim AP, Russell LD. Reproductive toxicity of theobromine and cocoa extract in male rats. *Reprod Toxicol*. 1992;6(4):347-53.
74. Basnet RM, Zizioli D, Guarienti M, Finazzi D, Memo M. Methylxanthines induce structural and functional alterations of the cardiac system in zebrafish embryos. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2017 Nov;18(1):72. doi: 10.1186/s40360-017-0179-9.
75. Bispo MS, Veloso MC, Pinheiro HL, De Oliveira RF, Reis JO, De Andrade JB. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*. 2002 Jan;40(1):45-8.
76. Lo Coco F, Lanuzza F, Micali G, Cappellano G. Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cupuacu and cacao seeds by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*. 2007 May-Jun;45(5):273-5.

77. Langer S, Marshall LJ, Day AJ, Morgan MR. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: a study of the correlation with nonfat cocoa solids. *J Agric Food Chem*. 2011 Aug 10;59(15):8435-41. doi: 10.1021/jf201398t.
78. Smit HJ, Gaffan EA, Rogers PJ. Methylxanthines are the psycho-pharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 Nov;176(3-4):412-9.
79. Gans JH, Korson R, Cater MR, Ackerly CC. Effects of short-term and long-term theobromine administration to male dogs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980 May;53(3):481-96.
80. Baggott MJ, Childs E, Hart AB, de Bruin E, Palmer AA, Wilkinson JE, et al. Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Jul;228(1):109-18. doi: 10.1007/s00213-013-3021-0.
81. International Organization for Standardization. ISO 4049: dentistry: polymer-based restorative materials. Switzerland; 2009
82. International Organization for Standardization. ISO 7491: dental materials: determination of colour stability. Switzerland; 2000.
83. Akinmade AO, Nicholson JW. Poisson's ratio of glass-polyalkenoate ('glass-ionomer') cements determined by an ultrasonic pulse method. *J Mater Sci Mater Med*. 1995;6(8):483-5.
84. Waterhouse JC, Russell RR. Dispensable genes and foreign DNA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology*. 2006 Jun;152(Pt 6):1777-88.
85. Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapirottanakul J, Nemoto H, Grönroos L, et al. Molecular and clinical analyses of the gene encoding the collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol*. 2009 Apr;58(Pt 4):469-75. doi: 10.1099/jmm.0.007559-0.
86. Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Münter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. *PLoS One*. 2010 Oct 1;5(10). pii: e13135. doi: 10.1371/journal.pone.0013135.

87. Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. Streptococcus gordonii biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J Bacteriol.* 2000 Mar;182(5):1374-82.
88. Carvalho AS, Cury JA. Fluoride release from some dental materials in different solutions. *Oper Dent.* 1999 Jan-Feb;24(1):14-9.
89. Hayacibara MF, Ambrozano GM, Cury JA. Simultaneous release of fluoride and aluminum from dental materials in various immersion media. *Oper Dent.* 2004 Jan-Feb;29(1):16-22.
90. G Nigam A, Jaiswal J, Murthy R, Pandey R. Estimation of fluoride release from various dental materials in different media-an in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2009 Jan;2(1):1-8. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1033.
91. Topaloglu-Ak A, Cogulu D, Ersin NK, Sen BH. Microhardness and surface roughness of glass ionomer cements after APF and TiF₄ applications. *J Clin Pediatr Dent.* 2012 Fall;37(1):45-51.
92. Ansari S, Moshaverinia M, Roohpour N, Chee WW, Schricker SR, Moshaverinia A. Properties of a proline-containing glass ionomer dental cement. *J Prosthet Dent.* 2013 Nov;110(5):408-13. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.04.009.
93. Moshaverinia A, Ansari S, Roohpour N, Reshad M, Schricker SR, Chee WW. Effects of N-vinylcaprolactam containing polyelectrolytes on hardness, fluoride release and water sorption of conventional glass ionomers. *J Prosthet Dent.* 2011 May;105(5):323-31. doi: 10.1016/S0022-3913(11)60062-0.
94. Bagheri R, Taha NA, Azar MR, Burrow MF. Effect of G-Coat Plus on the mechanical properties of glass-ionomer cements. *Aust Dent J.* 2013 Dec;58(4):448-53. doi: 10.1111/adj.12122.
95. Troca VB, Fernandes KB, Terrile AE, Marcucci MC, Andrade FB, Wang L. Effect of green propolis addition to physical mechanical properties of glass ionomer cements. *J Appl Oral Sci.* 2011 Apr;19(2):100-5.
96. Felemban NH, Ebrahim MI. Effects of adding silica particles on certain properties of resin-modified glass-ionomer cement. *Eur J Dent.* 2016 Apr-Jun;10(2):225-9. doi: 10.4103/1305-7456.178318.

97. Prabhakar A, Pattanshetti K, Sugandhan S. A comparative study of color stability and fluoride release from glass ionomer cements combined with chlorhexidine. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2013 Jan;6(1):26-9. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1181.
98. Razavi S, Ahmadizenouz G, Gholinia H. Evaluation of the effects of different mouthrinses on the color stability of one type of glass ionomer, compomer and giomer. 2016 Winter;5(1):36-42. doi: 10.22038/JDMT.2015.6250.
99. Adusumilli H, Avula JS, Kakarla P, Bandi S, Mallela GM, Vallabhaneni K. Color stability of esthetic restorative materials used in pediatric dentistry: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2016 Jul-Sep;34(3):233-7. doi: 10.4103/0970-4388.186740.
100. McKenzie MA, Linden RW, Nicholson JW. The physical properties of conventional and resin-modified glass-ionomer dental cements stored in saliva, proprietary acidic beverages, saline and water. *Biomaterials*. 2003 Oct;24(22):4063-9.
101. Zoergiebel J, Ilie N. Evaluation of a conventional glass ionomer cement with new zinc formulation: effect of coating, aging and storage agents. *Clin Oral Investig*. 2013 Mar;17(2):619-26. doi: 10.1007/s00784-012-0733-1.
102. Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Wang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J Dent*. 2013 Oct;41(10):927-34. doi: 10.1016/j.jdent.2013.07.014.
103. da Silva RC, Zuanon AC, Spolidorio DM, Campos JA. Antibacterial activity of four glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Sep;18(9):1859-62.
104. Zhao W, Xie Q, Bedran-Russo AK, Pan S, Ling J, Wu CD. The preventive effect of grape seed extract on artificial enamel caries progression in a microbial biofilm-induced caries model. *J Dent*. 2014 Aug;42(8):1010-8. doi: 10.1016/j.jdent.2014.05.006.
105. Sudharsana A, Srisakthi. Tooth friendly chocolate. *J Pharm Sci Res* 2015;7(1):49-50.
106. Yap AU, Saw TY, Cao T, Ng MM. Composite cure and pulp-cell cytotoxicity associated with LED curing lights. *Oper Dent*. 2004 Jan-Feb;29(1):92-9.