SORAIA MONIQUE FIORATI AGUIAR

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE PROPRIEDADES MECÂNICAS,
QUÍMICAS E ANTIMICROBIANAS DE UM SELANTE DE FOSSAS E
FISSURAS ISENTOS DE BISFENOL A**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Aguiar, Soraia Monique Fiorati

Avaliação *in vitro* de propriedades mecânicas, químicas e antimicrobianas de um selante de fossas e fissuras isento de bisfenol A. Ribeirão Preto, 2010.

120p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo

1. Selante de fossas e fissuras. 2. Resistência ao cisalhamento. 3. Microinfiltração. 4. Liberação de fluoreto. 5. Atividade antimicrobiana. 6. Dosagem de bisfenol A.

Folha de Aprovação

Aguiar SMF. **Avaliação *in vitro* de propriedades mecânicas, químicas e antimicrobianas de um selante de fossas e fissuras isento de bisfenol A.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

SORAIA MONIQUE FIORATI AGUIAR

DADOS CURRICULARES

NASCIMENTO	14 de outubro de 1968, Cajuru, São Paulo, Brasil
FILIAÇÃO	Wilson Fiorati e Laura Luíza Ferreira Fiorati
1987-1990	Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista – UNESP
1991-2006	Cirurgiã-Dentista da Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais de Batatais – APAE
1998-2010	Cirurgiã-Dentista exercendo atendimento odontológico em consultório particular
2001-2002	Mestrado em Ciências Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo Dissertação: “Microinfiltração marginal de restaurações de resina composta em cavidades preparadas com alta-rotação, laser Er:YAG e abrasão a ar em dentes decíduos. Avaliação <i>in vitro</i> ” Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto Bolsa: CAPES
2004-2010	Professora convidada do Programa de Pós-Graduação em Direito da UNESP, níveis de Mestrado e Doutorado, Campus de Franca, da disciplina “Bioética e Biodireito”
2006-2010:	Doutorado em Ciências Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo Tese: “Avaliação <i>in vitro</i> de propriedades mecânicas, químicas e antimicrobianas de um selante de fossas e fissuras isento de bisfenol A” Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho Bolsa: CAPES

Trabalho desenvolvido no *Laboratório de Dentística* do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, no *Laboratório de Bioquímica* do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, no *Laboratório de Microbiologia* do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e no *Laboratório de Química Orgânica* do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, com apoio financeiro da CAPES (bolsa).

AACREDITO QUE...

**"ALCANÇOU O SUCESSO, AQUELE QUE VIVEU INTENSAMENTE, SORRIU
SEMPRE E AMOU POR TODA A VIDA".**

Soraia Monique Fiorati Aguiar

“ADEUS”

“Eu pedi a Deus para retirar meus vícios;

Deus disse não; não sou eu quem deve retirá-los, mas você que deve desistir deles;

Eu pedi a Deus para completar meu corpo;

Deus disse não; seu espírito é completo, seu corpo é apenas temporário;

Eu pedi a Deus para me dar paciência;

Deus disse não; paciência é um produto das tribulações; não é dada, é aprendida;

Eu pedi a Deus para me dar felicidade;

Deus disse não; eu dou bênçãos, felicidade depende de você;

Eu pedi a Deus para me livrar da dor;

Deus disse não; sofrer afasta você do mundo e aproxima você de mim;

Eu pedi a Deus para elevar meu espírito;

Deus disse não; você deve buscar o seu crescimento continuamente e crescer por si próprio, mas eu o podarei para que dê frutos;

Eu pedi a Deus todas as coisas que me fariam apreciar a vida;

Deus disse não; eu te dei a vida para que você aprecie todas as coisas;

Eu pedi a Deus para me ajudar a amar os outros como ele me ama;

Deus disse: finalmente você entendeu a minha proposta...

Que Deus os abençoe!”

DEDICO ESTE TRABALHO,

Ao meu maior tesouro, meu anjinho, meu filho *Marcos Vinícius Fiorati Aguiar*: “Amar não é apoderar-se do outro para completar-se, mas se dar ao outro para completar”.

Ao meu marido e companheiro *Marco Antônio de Aguiar*: “As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem”.

Aos meus pais *Wilson Fiorati e Laura Luíza Ferreira Fiorati*: “Felicidade é a certeza de que somos amados, apesar de sermos como somos”.

Aos meus irmãos *Jete Jane Fiorati e Wilson Fiorati Júnior*: amigos de todas as horas, que me ensinaram que “existe um só caminho para a felicidade, o de viver a vida como desejamos”.

Aos meus sogros *Antônio Jorge de Aguiar e Maria Estela di Lello Aguiar*: agradeço por me ensinarem que “não possuir algumas das coisas que desejamos é parte indispensável na busca da felicidade que tanto procuramos”.

À minha segunda família, meu tio *Luís Henrique Ferreira (in memorian)*, minha tia *Mércia dos Santos Ferreira*, meus primos *Luís Henrique Ferreira Filho, Lucely Angélica Ferreira Casoni e Laísa Cristiane Ferreira*, minhas sobrinhas *Tais Ferreira Casoni e Beatriz Ferreira Casoni* e meu primo *Adilson Casoni*: “Bondade é amar as pessoas mais do que elas merecem”.

HOMENAGENS PÓSTUMAS,

Ao meu querido tio "*Luis Henrique Ferreira (Lique)*

À minha tia do "coração" *Aparecida de Souza Fiorati*

À minha tia (avó por consideração) *Idalina Ferreira Monteiro:*

"Tudo o que é bom dura o tempo necessário para que seja inesquecível, pois as folhas caem para que outras nasçam".

AAGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho: Meu orientador e exemplo como professor. Agradeço por me mostrar que “a exatidão é virtude de quem trabalha muito e a persistência é o caminho do êxito”.

À Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto: Minha orientadora no curso de Mestrado e mãe em termos científicos. Agradeço por me ensinar que, “a única maneira de ter amigos, é ser amigo”.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor *Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon* e do Vice-Diretor *Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros*.

“Não basta adquirir a sabedoria, é preciso praticá-la”.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da *Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva*.

“Uma geração constrói a estrada onde a próxima trafega”.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Profa. Dra. Sada Assed, Profa. Dra. Aldevina Campos Freitas, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiróz, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira e Prof. Dr. Adilson Thomazinho*, e a todos os professores da Pós-Graduação.

“Há duas fontes perenes de alegria pura: o bem realizado e o dever cumprido”.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moí Sacilotto*, pela cordialidade e atenção.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Fátima Jacinto Daniel, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Filomena Lelli Placciti, Nilza Letícia Magalhães, Marco Antônio dos Santos, Carmo Euripedes Terra Barreto, José Aparecido Neves do Nascimento, Benedita Viana Rodrigues, Vera Ribeiro do Nascimento e Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva* e aos funcionários do “Centro de Formação de Recursos Humanos no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais” da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Dra. Gisele*

Faria, Carolina Paes Torres Mantovani, Fátima Rizóli e Renata Aparecida Fernandes Rodrigues.

“Quem recebe um favor nunca deve esquecer e quem o faz nunca deve lembrar”.

Aos colegas de turma do curso de Doutorado da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Alexandra Mussolino de Queiróz, Raquel Assed Bezerra da Silva, Marta Estela Saravía, Sara Elisa Medina Mattar, Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira, Valéria Pontelli Navarro Tedeschi* e, em especial, ao meu amigo *Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva*.

“Só percebemos o valor da água quando a fonte seca”.

Aos *Pós-Graduandos* dos cursos de Mestrado e Doutorado da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela agradável convivência.

“Agradeço pelos erros que me emprestastes, pois com eles pude corrigir os meus”.

Às amigas e funcionárias do “Centro de Formação de Recursos Humanos no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais” da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, cirurgiãs-dentistas *Dra. Gisele Faria e Carolina Paes Torres Mantovani*, às pós-graduandas do curso de Doutorado da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Jaciara Miranda Gomes Silva e Marta Regina Contente* e à pós-graduanda do curso de Doutorado da Disciplina de Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Michele Alexandra Chinelatti*, pela amizade e pelo auxílio na condução dos experimentos de resistência ao cisalhamento e microinfiltração.

À *Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto* da disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio nos experimentos de resistência ao cisalhamento e microinfiltração.

Ao *Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro* e à bióloga *Ana Cristina Morseli Polizello* da Disciplina de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio no experimento de liberação de fluoreto.

À *Profa. Dra. Izabel Yoko Ito* da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e à pós-graduanda *Marta Estela Saravá* do curso de Doutorado da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio no experimento de avaliação da atividade antimicrobiana.

Ao *Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes* e ao químico *José Carlos Tomaz* da Disciplina de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo auxílio no experimento de dosagem de bisfenol A.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pelo suporte financeiro, por meio da concessão de bolsa de estudo.

À *todos* aqueles que participaram direta ou indiretamente para que este trabalho se tornasse realidade.

Muito obrigada a cada um de vocês e fiquem com Deus.

RESUMO

Aguiar SMF. **Avaliação *in vitro* de propriedades mecânicas, químicas e antimicrobianas de um selante de fossas e fissuras isento de bisfenol A.** [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2010.

Tendo em vista o importante papel desempenhado pelos selantes de fossas e fissuras na prevenção da cárie dental, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* propriedades mecânicas, químicas e antimicrobianas do selante isento de bisfenol A Embrace Wetbond™. Para os testes de resistência ao cisalhamento e microinfiltração foram selecionados 135 terceiros molares hígidos, extraídos de humanos, divididos aleatoriamente em 6 grupos: (I) selante Fluroshield® sem contaminação; (II) selante Embrace Wetbond™ sem contaminação; (III) selante Fluroshield® contaminado com saliva; (IV) selante Embrace Wetbond™ contaminado com saliva; (V) selante Fluroshield® contaminado com água; e (VI) selante Embrace Wetbond™ contaminado com água. No estudo de resistência ao cisalhamento os dentes foram seccionados no sentido vestibulo-lingual, a porção radicular removida e as superfícies mesiais e distais foram embebidas em resina de poliéster. Após o condicionamento do esmalte, foi aplicado o selante com o auxílio de uma matriz de Teflon®. Os espécimes foram termociclados e submetidos ao teste de resistência ao cisalhamento com uma velocidade de 0,5mm/min e célula de carga de 50kgf. Os resultados foram comparados empregando a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. No estudo de microinfiltração, após o condicionamento do esmalte foi aplicado o selante. Os dentes foram termociclados, selados na região da câmara pulpar com resina composta, isolados, imersos em solução de rodamina B a 0,2%, incluídos em resina acrílica, seccionados, lixados, montados em lâminas, identificados e analisados em microscópio óptico para quantificação da microinfiltração. Os resultados foram comparados empregando o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. No estudo de liberação de fluoreto por meio de água aquecida e saliva artificial foram selecionados dois selantes resinosos contendo fluoreto (Embrace Wetbond™ e Fluroshield®), uma resina composta micro-híbrida (Filtek™ Z-250) e um cimento de ionômero de vidro (Vidrión R). As determinações de fluoreto foram realizadas por potenciometria direta, utilizando o eletrodo seletivo combinado de fluoreto. Para o teste de liberação de fluoreto em saliva artificial foram confeccionados 8 corpos de prova de cada material, os quais foram armazenados em tubos plásticos contendo saliva artificial, substituída diariamente. Após 15 dias, foi avaliada a quantidade de fluoreto liberado nas soluções. Os valores obtidos em mV foram convertidos em ppm (µg/ml). Os resultados foram comparados empregando a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey. No estudo da atividade antimicrobiana, efetuado por meio do teste de difusão em ágar pelo método do poço, foram selecionados dois selantes resinosos contendo fluoreto (Embrace Wetbond™ e Fluroshield®), um cimento de ionômero de vidro (Vidrión R), solução de digluconato de clorexidina a 1% e soro fisiológico. Foram utilizadas cepas de *S. mutans* (ATCC 25175 e cepa de campo), na densidade de 1-2 da escala de McFarland. Após o período de incubação, a zona de inibição do crescimento microbiano foi mensurada. Os resultados foram comparados empregando a análise de variância ANOVA e o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância em todas as análises estatísticas foi de 5%. No estudo da dosagem de bisfenol A foram selecionados dois selantes resinosos (Embrace Wetbond™ e Fluroshield®), dispensados em recipientes contendo 3ml de metanol. Após homogeneização e filtragem, os extratos foram analisados utilizando um espectrômetro de massas por cromatografia gasosa. Foram realizados testes com as fórmulas moleculares do bisfenol A (C₁₅H₁₆O₂) e do Bis-GMA (C₂₉H₃₆O₈). Com base nos resultados obtidos pôde-se concluir que o selante Embrace Wetbond™ apresentou resistência ao cisalhamento próxima do mínimo aceitável e alta microinfiltração, quando utilizado de acordo com as indicações do fabricante, em condições de contaminação com umidade. Por outro lado, esse selante apresentou elevada liberação de fluoreto, tanto em água aquecida quanto em saliva artificial, apresentou elevada atividade antimicrobiana e não apresentou liberação de bisfenol A e de Bis-GMA.

Palavras-Chave: Selante de fossas e fissuras; resistência ao cisalhamento; microinfiltração; liberação de fluoreto; atividade antimicrobiana; dosagem de bisfenol A.

ABSTRACT

Aguiar SMF. ***In vitro* evaluation of mechanical, chemical and antimicrobial properties of a bisphenol A-free pit-and-fissure sealant** [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2010.

Considering the important role of pit-and-fissure sealants on the prevention of dental caries, the purpose of this study was to evaluate *in vitro* the mechanical, chemical and antimicrobial properties of the bisphenol A-free pit-and-fissure sealant Embrace Wetbond™. For the shear bond strength and microleakage tests, 135 sound human third molars were selected and randomly assigned to 6 groups: (I) Fluroshield® sealant without contamination; (II) sealant Embrace Wetbond™ without contamination; (III) Fluroshield® sealant contaminated with saliva; (IV) Embrace Wetbond™ sealant contaminated with saliva; (V) Fluroshield® sealant contaminated with water; and (VI) Embrace Wetbond™ sealant contaminated with water. For the shear bond strength test, the teeth were sectioned in a buccolingual direction, the root portion was removed and the mesial and distal surfaces were embedded in polyester resin. The sealant was applied to the acid-etched enamel with the aid of Teflon® matrix. The specimens were thermocycled and subjected to a shearing force at a crosshead speed of 0.5mm/min with a 50kgf load cell. Data were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test. For the microleakage assay, after acid etching of enamel, the teeth were thermocycled, the pulp chamber was sealed with composite resin, and the teeth were rendered waterproof, immersed in 0.2% B rhodamine solution, embedded in acrylic resin, sectioned, ground, mounted on glass slides, identified and analyzed with an optical microscope for quantification of microleakage. The results were compared by the Kruskal-Wallis and Dunn's post-test. Two fluoride-containing resin sealants (Embrace Wetbond™ and Fluroshield®), a microhybrid composite resin (Filtek™ Z-250) and a glass ionomer cement (Vidrion R) were selected for the fluoride release test in heated water and artificial saliva. Fluoride measurements were performed with a direct potentiometry using a fluoride ion selective electrode. For the test in saliva artificial, 8 specimens of each material were fabricated and stored in plastic tubes containing artificial saliva, which as daily renewed. The amount of fluoride released in the solutions after 15 days was analyzed, and the the values obtained in mV were converted into ppm (µg/mL). The results were compared by ANOVA and Tukey's post-test. Two fluoride-containing resin sealants (Embrace Wetbond™ and Fluroshield®), a glass ionomer cement (Vidrion R), 1% chlorhexidine digluconate solution and saline were selected for the analysis of the antimicrobial activity using the agar-well diffusion assay. Suspensions of *S. mutans* strains (ATCC 25175 and field strain) with density equivalent to the 1-2 McFarland scale were used. After incubation, the zones of microbial growth inhibition were measured. The results were compared by ANOVA and Bonferroni post-test. A significance level of 5% was set for all statistical analyses. For the analysis of bisphenol A dosage, two resin sealants (Embrace Wetbond™ and Fluroshield®) were delivered in receptacles containing 3ml of methanol. After homogenization and filtering, the extracts were analyzed under gas chromatography-mass spectroscopy and tests were performed with the molecular formulas of bisphenol A (C₁₅H₁₆O₂) and Bis-GMA (C₂₉H₃₆O₈). Based on the obtained results, it may be concluded that the sealant Embrace Wetbond™ presented shear bond strength near of the minimum acceptable and great microleakage when used according to the manufacturer's instructions under moisture contamination conditions. On the other hand, this sealant presented high fluoride release in both heated water and artificial saliva, showed high activity antimicrobial and did not present release of bisphenol A or Bis-GMA.

Key words: Pit-and-fissure sealant; shear bond strength; microleakage; fluoride release; antimicrobial activity; bisphenol A dosage.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	PROPOSIÇÃO.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
	3.1 RESISTÊNCIA AO CISALHAMENTO.....	35
	3.2 MICROINFILTRAÇÃO.....	44
	3.3 LIBERAÇÃO DE FLUORETO.....	53
	3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	63
	3.5 DOSAGEM DE BISFENOL A.....	69
4	RESULTADOS.....	71
5	DISCUSSÃO.....	93
	5.1 DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	96
	5.2 DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E ANTIMICROBIANAS.....	100
6	CONCLUSÕES.....	107
	REFERÊNCIAS.....	111

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A consulta à base de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) permite evidenciar que, até o momento, foram publicados aproximadamente 2500 trabalhos científicos referentes aos selantes de fossas e fissuras, refletindo o interesse na aplicação clínica desta técnica, que foi introduzida em 1967 por Cueto e Buonocore e reconhecida pela *American Dental Association*, em 1971.

Em função do elevado risco à cárie dental da região de fossas e fissuras (Wilson, 1985; Hyatt, 1923; Bödecker, 1929; Klein e Knutson, 1942; Buonocore, 1955; Newbrun, 1992; Waggoner e Siegal, 1996; dos Santos et al., 2008), materiais capazes de atuar como barreira física contra o acúmulo de substratos cariogênicos e de biofilme bacteriano nessa região têm sido introduzidos no comércio especializado facilitando, assim, a autolimpeza e a higienização. Dentre esses materiais encontram-se os selantes de fossas e fissuras resinosos auto e fotopolimerizáveis (Simonsen, 2002; Borsatto e Assed, 2005; Jodkowska, 2008; Beauchamp et al., 2009), os sistemas adesivos (Bonifácio et al., 2009; Carvalho et al., 2009; Marks et al., 2009), os compômeros (Alonso et al., 2005; Bürgers et al., 2009; Trachtenberg et al., 2009), os materiais ionoméricos (Alonso et al., 2005; dos Santos et al., 2008; Bürgers et al., 2009) e as resinas compostas fluidas (Duangthip e Lussi, 2004; Francescut e Lussi, 2006; Dukic et al., 2009). Os selantes resinosos têm sido os materiais mais preconizados, pois apresentam adequada viscosidade, retenção, resistência ao desgaste, vedamento marginal, longevidade e estética (Borsatto e Assed, 2005; Berger et al., 2009; Kolavic Gray et al., 2009).

Diferentes métodos têm sido propostos para a avaliação das propriedades mecânicas *in vitro* dos selantes. A resistência à tração (Dhar e Tandon, 1999; Borsatto et al., 2007), a resistência ao cisalhamento (Al-Sarheed, 2006a; Al-Sarheed, 2006b; Wadenya et al., 2009), a microinfiltração (Asselin et al., 2008; Yamada et al. 2008; Burcak Cehreli et al., 2009), a microtração (Perdigão et al., 2005; Ramires-Romito et al., 2007) e a microdureza (de Alexandre et al., 2006; Yue et al., 2009) estão entre os testes mais empregados.

O teste de resistência ao cisalhamento consiste na aplicação de uma força paralela à superfície do dente, com o objetivo de romper a união existente entre o material restaurador e a superfície dental. Apresenta como vantagens a facilidade de execução, a reprodutibilidade dos resultados, a confiabilidade e a grande aceitabilidade pelos meios científicos (Low et al., 1975).

Estudos *in vitro* avaliando a resistência ao cisalhamento de selantes ao esmalte condicionado, contaminado pela saliva ou umidade, têm evidenciado uma significativa diminuição nesta resistência (Hormati et al., 1980; Evans e Silverstone, 1981; O'Brien et al., 1987; Tulunoglu et al., 1999; Barroso et al., 2005; Torres et al., 2005; Gomes-Silva et al., 2008; Lepri et al., 2008).

Sabe-se que a resistência ao cisalhamento e a microinfiltração possuem uma relação inversa (Tulunoglu et al., 1999; Knobloch et al., 2005). Resistência ao cisalhamento baixa e alta microinfiltração estão associadas com retenção e adesão inadequadas e a presença de fendas entre o dente e o material, as quais permitem a infiltração bacteriana. Estas, por sua vez, estão também associadas a diferenças no coeficiente de expansão térmica entre o material e a estrutura dental, que levam à contração, expansão e perda de adaptação, após a fotopolimerização (Knobloch et al., 2005; Torres et al., 2005; Gomes-Silva et al., 2008; Burcak-Cehreli et al., 2009). O coeficiente de expansão térmica do selante é muito maior que o do dente, sendo este, por si só, um fator crítico que pode causar microinfiltração (Borem e Feigal, 1994; Hebling e Feigal, 2000).

Apesar do desenvolvimento das técnicas de condicionamento do esmalte e dos materiais resinosos utilizados como selantes, ainda não foi possível eliminar a microinfiltração, a qual é considerada uma das principais causas de falhas dos selantes, favorecendo a descoloração marginal, o aparecimento de lesões de cárie na interface dente/material selador e o deslocamento total ou parcial do selante (Vijayaraghavan et al., 1995; Selecman et al., 2007).

A microinfiltração pode ser definida como a passagem, clinicamente não detectável, de bactérias, fluidos, substâncias químicas, moléculas e íons pelas fendas na interface dente/restauração ou dente/selante (Salama, 1998). Muitas técnicas têm sido utilizadas para a avaliação da microinfiltração, destacando-se os traçadores químicos e radioativos, a infiltração bacteriana, a indução de lesão de cárie artificial, a pressão de ar, a análise de ativação de nêutrons e a Microscopia Eletrônica de Varredura, entre outras. Entretanto, a técnica mais frequentemente empregada com essa finalidade é a que utiliza a penetração de corantes (Kidd, 1976; Taylor e Linch, 1992; Yamada et al., 2008; Hevinga et al., 2008).

Pesquisas *in vitro*, avaliando a penetração do corante na interface selante/esmalte condicionado, contaminado pela saliva ou umidade, também evidenciaram um significativo aumento na microinfiltração (Borem e Feigal, 1994; Grande et al., 1999; Hebling e Feigal, 2000; Duangthip e Lussi, 2003; Borsatto et al., 2004; Owens e Johnson, 2006; Hevinga et al., 2007; Askarizadeh et al., 2008).

Quanto à composição, os selantes podem ou não apresentar fluoreto como uma alternativa viável para prevenir a ocorrência de lesões de cárie em fossas e fissuras pela inibição potencial da desmineralização, em decorrência da liberação de fluoreto para o esmalte (Rock et al., 1996; Morphis et al., 2000; Salar et al., 2007; Trachtenberg et al., 2009). Os selantes com fluoreto apresentam, também, propriedade remineralizadora e atividade bactericida e bacteriostática (Forsten, 1990; Borsatto e Assed, 2005; Kozai et al., 2005; Salar et al., 2007; Bürgers et al., 2009; Griffin et al., 2009).

As propriedades químicas de selantes resinosos, incluindo a liberação de fluoretos (Forsten, 1990; Rock et al., 1996; Garcia-Godoy et al., 1997; Rajtboriraks et al., 2004; Lobo et al., 2005; Kantovitz et al., 2006; Kavaloglu Cildir e Sandalli, 2007; Salar et al., 2007; Shen et al., 2007) e as propriedades antimicrobianas (Loyola-Rodrigues e Garcia-Godoy, 1996; Kozai et al., 2000; Matalon et al., 2003; Menon Preetha et al., 2007; Amim, 2008; Carvalho et al., 2009) têm sido avaliadas na literatura específica.

Do ponto de vista histórico, as primeiras resinas à base de metacrilato foram desenvolvidas em meados de 1950 pelos alemães, como polímeros de cianoacrilato, conhecidos pelo nome de Eastman 910 que, assim como os poliuretanos, apresentavam comportamento adequado em nível laboratorial, porém deslocavam-se facilmente quando empregados clinicamente, devido à contração de polimerização e evaporação do monômero. Esses materiais foram substituídos pelas resinas epóxi-acrílicas que são dimetacrilatos resultantes do produto da reação do éter do bisfenol A com o glicidil metacrilato (Bis-GMA), sendo esta a base da maioria dos selantes resinosos atualmente comercializados. Estes materiais receberam a adição de partículas de carga para a redução da contração de polimerização e resina epóxica Bis-GMA para melhorar a resistência e adesividade (Sölderholm e Mariotti, 1999; Borsatto e Assed, 2005).

O bisfenol A (2,2'-bis[4-hidroxifenil]propano) é produzido por uma reação de catalização ácida do fenol e da acetona. O bisfenol A é um plástico utilizado como matéria-prima para a produção de resina epóxica e plásticos policarbonatados, sendo empregado na fabricação de vários produtos, incluindo garrafas e embalagens de alimentos, mamadeiras, brinquedos, detergentes, pesticidas, automóveis e materiais odontológicos resinosos, como resinas compostas e selantes de fossas e fissuras. Devido ao aumento no número de produtos à base de resinas epóxicas e plásticos policarbonatados, a exposição humana ao bisfenol A tem aumentado rapidamente (Kang et al., 2006; Lang et al., 2008).

A matriz resinosa fluida contendo monômero é polimerizada e convertida em um polímero rígido por meio de reação química ou fotopolimerização. O bisfenol A não polimerizado pode ser removido do selante ou da resina por meio do desgaste promovido pela mastigação ou degradado quimicamente ou mecanicamente, podendo ser absorvido sistematicamente pelo paciente (Völkel et al., 2002; Joskow et al., 2006; Kang et al., 2006; Azarpazhooh e Main, 2008).

A exposição do organismo ao bisfenol A resulta em alguns efeitos adversos, principalmente por sua ação estrogênica e pelo seu potencial tóxico agudo para os organismos aquáticos. Devido ao aumento dos produtos à base de resinas e plásticos, a exposição humana ao bisfenol A tem aumentado. O meio ambiente, por meio da água, ar e solo, pode ser uma fonte de exposição ao bisfenol A, porém a fonte primária de exposição humana são os alimentos. O consumo humano diário de bisfenol A é menor que 1 µg/kg (micrograma por quilograma), o que pode levar a efeitos destrutivos adversos no sistema endócrino, especialmente no desenvolvimento de fetal (Kang et al., 2006).

A ação estrogênica dos polímeros ocorre devido a uma ligação competitiva das moléculas poliméricas semelhantes ao estrógeno, tal como o bisfenol A, aos receptores hormonais naturais. O bisfenol A envolve inúmeros fenômenos biológicos, podendo induzir mudanças em níveis muito baixos e, em estudos com animais, está implicado em diversos mecanismos e processos fisiológicos, dentre os quais puberdade precoce em fêmeas e feminilização em machos (Timms et al., 2005), alto risco de câncer de mama em fêmeas e de próstata em machos (Sasco, 2001), indução do influxo de cálcio, o qual leva a liberação de prolactina (Palanza et al., 2002), desenvolvimento de hiperglicemia, tolerância à insulina e diabetes (Alonso-Magdalena et al., 2006), doença cardiovascular (Lang et al., 2008), concentração anormal de enzimas do fígado (Bindhumol et al., 2003), interrupção da função das células β-pancreáticas (Roper et al., 2008), disfunção na produção do hormônio da tireóide (Moriyama et al., 2002), elevação de espécies de oxigênio reativo (Ooe et al., 2005) implicadas no mecanismo de estresse oxidativo e super-regulação do fator de ligação do elemento cAMP-resposta, o qual inibe a apoptose (Quesada et al., 2002).

Apesar de inúmeros trabalhos da área médica enfatizarem os efeitos adversos do uso de materiais que liberam bisfenol A no organismo (Yoo et al., 2000; Rubin et al., 2001; Takai et al., 2001; Al-Hiyasat e Darmani, 2006; Della Seta et al., 2006; Lang et al., 2008), poucos estudos têm sido realizados, na Odontologia, a esse respeito. Em

detrimento da grande aceitação e difusão do uso de materiais resinosos na atualidade, alguns autores avaliaram a presença de bisfenol A na saliva, na urina e no sangue de pacientes, após a aplicação de selantes na cavidade bucal (Völkel et al., 2002; Joskow et al., 2006). Esses autores salientaram que, embora o bisfenol A seja conjugado e excretado rápida e eficientemente pelo organismo humano, e a quantidade de bisfenol A presente nos selantes resulte em baixos níveis de exposição, a dose mínima necessária para produzir efeitos adversos no ser humano ainda não foi estabelecida.

Recentemente, foi introduzido no comércio especializado pela Pulpdent Corporation, um selante denominado Embrace Wetbond™. De acordo com o fabricante, este selante é isento de bisfenol A, apresenta fluoreto em sua composição química e adere quimicamente e micromecanicamente à superfície de esmalte ligeiramente úmida, promovendo um excepcional selamento contra a microinfiltração.

Na literatura, o selante Embrace Wetbond™ foi avaliado com relação à adesividade de *Streptococcus mutans* sobre sua superfície (Bürgers et al., 2009) e a sua penetração e adaptação nas fossas e fissuras (Kane et al., 2009), evidenciando resultados satisfatórios.

Segundo Kane et al. (2009), o selante Embrace incorpora monômeros acrilatos di, tri e multi-funcionais em uma rede ácida integrada que é ativada pela umidade. Por essa razão é recomendado o seu uso em superfícies dentais levemente úmidas. Quando ativado, o material é ácido e quando polimerizado não é afetado pela água. Apresenta pH neutro e baixa solubilidade em água. Devido à ausência de bisfenol A, o selante pode apresentar menor contração de polimerização.

Em estudos internos da Empresa, esse selante foi empregado clinicamente, demonstrando eficácia (O'Donnell, 2008; Hoffman, 2009). No entanto, há escassez de trabalhos publicados enfocando as propriedades mecânicas, químicas e antimicrobianas do selante Embrace Wetbond™, a fim de fornecer subsídios para a sua aplicação clínica.

2. PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Pelo exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, as seguintes propriedades do selante de fossas e fissuras Embrace Wetbond™:

1. Propriedades mecânicas, avaliadas por meio do teste de resistência ao cisalhamento e do teste de microinfiltração, empregando terceiros molares extraídos de humanos.
2. Propriedades químicas, avaliadas por meio da liberação de fluoreto por potenciometria direta e dosagem de bisfenol A, por espectrometria de massas.
3. Propriedades antimicrobianas, avaliadas por meio do teste de difusão em ágar, sobre cepas de *Streptococcus mutans* (cepa padrão ATCC 25175 e cepa de campo, originária da cavidade bucal).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa relativo à avaliação da resistência ao cisalhamento e à microinfiltração foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 2009.1.1411.58.6), tendo sido aprovado.

O quadro 1 evidencia as características dos materiais utilizados nos experimentos.

Quadro 1 – Apresentação dos materiais utilizados nos experimentos

Nome comercial	Descrição	Composição	Fabricante
Embrace Wetbond™	Selante de fossas e fissuras fotopolimerizável isento de bisfenol A	Monômeros Éster-acrilatos não-polimerizados, Sílica amorfa, Partículas de vidro e Fluoreto de Sódio.	Pulpdent Corporation – USA
Fluroshield®	Selante de fossas e fissuras resinoso fotopolimerizável	Bis-GMA Uretano modificado, Trietileno Glicol Di-Metacrilato, Borossilicato de Alumínio e Bário, Éster Tetracrílico Ácido Fosfórico, Fluoreto de Sódio, N-Metil Dietanolamina e Canforoquinona.	Dentsply – USA
Filtek™ Z-250	Resina composta micro-híbrida fotopolimerizável	Parte Orgânica: Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA e Canforoquinona. Parte Inorgânica: Zircônia e Sílica.	3M ESPE – USA
Vidrion R	Cimento de Ionômero de vidro para restauração	Pó: Fluorsilicato de Sódio, Cálcio e Alumínio, Sulfato de Bário, Ácido Poliacrílico e Pigmentos. Líquido: Ácido Tartárico e Água Destilada.	S. S. White – Brasil
Digluconato de Clorexidina a 1%	Solução Antimicrobiana	Digluconato de Clorexidina a 1% e Veículo qsp 100ml	Farmácia Doce Erva – Ribeirão Preto – Brasil
Soro fisiológico	-	-	-

3.1 RESISTÊNCIA AO CISALHAMENTO

Seleção dos dentes

Foram obtidos junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 45 terceiros molares hígidos, extraídos de humanos e armazenados em solução de azida de sódio a 0,4%, após a extração. Todos os dentes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água e escova Robinson, seguida do exame visual sob lupa estereoscópica, com aumento de 10X (Carl Zeiss, Jena, Germany) e exame tátil com o auxílio de sonda exploradora, descartando-se aqueles com trincas, fraturas, lesões de cárie ou anomalias de estrutura.

Materiais utilizados

Para o condicionamento do esmalte, em todos os grupos, foi utilizado o gel de ácido fosfórico a 37% (Gel Etchant - Kerr Corporation, Orange, USA). Para os grupos experimentais foi utilizado o selante Embrace Wetbond™ (Pulpdent Corporation, Watertown, USA) e para os controles o selante Fluroshield® (Dentsply Caulk, Milfor, USA).

Preparo dos dentes para o teste de resistência ao cisalhamento

A avaliação da resistência ao cisalhamento dos materiais estudados foi realizada no Laboratório de Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A figura 1 ilustra a sequência da metodologia empregada no preparo dos dentes para realização desse teste. A porção radicular de cada dente foi removida com um disco diamantado montado em máquina de corte (Minitom - Struers A/S, Copenhagen, Denmark), 2 milímetros (mm) além da junção amelocementária (Figuras 1-A e 1-B). Os dentes foram seccionados no sentido vestíbulo-lingual (Figura 1-C) e as porções mais convexas das superfícies mesiais e distais foram posicionadas em uma lâmina de cera rosa 7 (Wilson – Polidental, Cotia, Brasil) colocadas no interior de tubos de PVC de ¾ de polegada com 2 centímetros (cm) de altura x 2,5cm de diâmetro (Figura 1-D). Em seguida, os tubos foram preenchidos com resina acrílica quimicamente ativada (JET – Clássico, Campo Limpo Paulista, Brasil) (Figura 1-E).

Após a polimerização da resina, os tubos de PVC foram removidos e os cilindros de resina com os dentes incluídos foram levados à Politriz DP-9U2 (Struers A/S, Copenhagen, Denmark) e submetidos ao desgaste com lixas d'água de granulação 180 a 400 (Figura 1-F), sob refrigeração, empregadas em ordem decrescente de abrasividade, até a obtenção de uma superfície de esmalte plana com a extensão de, no mínimo, 3mm de diâmetro (Figura 1-G). A *smear layer* foi padronizada com lixa d'água 600 durante 30 segundos (s). Os espécimes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água e escova Robinson (Figura 1-H), lavados em água corrente e mantidos em água destilada, a 4°C, em refrigerador, durante 24 horas (h), para reumidificar os tecidos dentais. Decorrido esse período, os espécimes foram mantidos à temperatura ambiente durante 2h.

Em seguida, a superfície do esmalte foi delimitada com o auxílio de uma fita isolante com um orifício central de 3mm de diâmetro obtido, por meio de um perfurador (Figuras 1-I e 1-J). Essa delimitação foi realizada com as seguintes finalidades: definir a área de teste numa dimensão constante, para que os cálculos de resistência adesiva fossem efetuados apenas em relação à área avaliada; evitar que o excesso de selante na superfície de esmalte interferisse na distribuição das tensões durante o teste e comprometesse sua validade; e assegurar que o material fosse inserido apenas na superfície desejada, pois após a colocação da matriz, a visualização da área exata a ser avaliada ficaria prejudicada (Figura 1-K).

Figura 1 – Sequência da metodologia empregada – Teste de resistência ao cisalhamento.

- A. Secção da porção radicular em máquina de corte.
- B. Superfície oclusal da coroa dental de um terceiro molar.
- C. Secção da coroa no sentido vestibulo-lingual, para obtenção de 2 hemi-coroas (mesial e distal).
- D. Hemi-coroa posicionada em uma lâmina de cera no interior do anel de PVC.
- E. Inclusão da hemi-coroa em resina acrílica, com a face externa voltada para baixo.
- F. Politriz.
- G. Hemi-coroa incluída em resina acrílica, após desgaste com lixa para obtenção de uma superfície plana.
- H. Profilaxia da superfície de esmalte polida com escova Robinson, pedra-pomes e água.
- I. Perfuração da tira de fita isolante.
- J. Fita delimitadora perfurada.
- K. Corpo de prova com a fita delimitadora posicionada.
- L. Mesa metálica.
- M. Matriz de Teflon bi-partida.
- N. Mesa metálica com a matriz e o cilindro preenchido com o selante.
- O. Aparelho fotopolimerizador.
- P. Matriz totalmente preenchida com o selante.
- Q. Separação da matriz.
- R. Remoção da fita isolante delimitadora.
- S. Cilindro de selante aderido à superfície do esmalte.
- T. Estufa.
- U. Máquina de termociclagem.
- V. Máquina de Ensaio Universal – Lâmina e dispositivo de prensão do corpo de prova.

Divisão dos grupos

Os dentes foram divididos aleatoriamente em 6 grupos de 15 hemi-coroas cada, seguindo a especificação da ISO TR-11405 (ISO, 1994) relativa ao número de dentes preconizados para a realização de testes de resistência ao cisalhamento. Os dentes de cada grupo foram submetidos aos procedimentos descritos a seguir.

GRUPO I (Controle)

A superfície do esmalte foi condicionada com gel de ácido fosfórico a 37% por 15s, lavada com água por 20s e seca com jato de ar isento de partículas oleosas por 10s, até a obtenção de uma superfície esbranquiçada com aspecto de giz. Em seguida, foi aplicado o selante Fluroshield®.

GRUPO II (Experimental)

A superfície do esmalte foi condicionada com gel de ácido fosfórico a 37% por 15s, lavada com água por 20s e seca com jato de ar isento de partículas oleosas por 10s, até a obtenção de uma superfície esbranquiçada com aspecto de giz. Em seguida, foi aplicado o selante Embrace Wetbond™.

GRUPO III (Controle)

Após o condicionamento ácido da superfície do esmalte, foram efetuadas a lavagem e secagem, da mesma forma descrita para o grupo anterior. Em seguida, os espécimes foram contaminados com 0,01 mililitros (ml) de saliva humana fresca, durante 20s e secos com jato de ar isento de partículas oleosas, por 5s. A seguir, foi aplicado o selante Fluroshield®.

GRUPO IV (Experimental)

A superfície do esmalte foi condicionada, lavada e seca da mesma forma que a descrita para os grupos anteriores. Em seguida, os espécimes foram contaminados com 0,01ml de saliva humana fresca, durante 20s e secos com jato de ar isento de partículas oleosas, por 5s. A seguir, foi aplicado o selante Embrace Wetbond™.

GRUPO V (Controle)

Após o condicionamento ácido da superfície do esmalte, foram efetuadas a lavagem e secagem, de forma semelhante aos demais grupos. Em seguida, os espécimes foram lavados com água da seringa tríplice durante 5s e o excesso de umidade foi

removido com papel absorvente, deixando a superfície do esmalte levemente úmida. A seguir, foi aplicado o selante Fluroshield®.

GRUPO VI (Experimental)

Após a realização do condicionamento ácido da superfície do esmalte, foram efetuadas a lavagem e secagem, de forma semelhante aos demais grupos. Em seguida, os espécimes foram lavados com água da seringa tríplice, durante 5s e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente, deixando a superfície do esmalte levemente úmida. A seguir, foi aplicado o selante Embrace Wetbond™.

Aplicação dos selantes

Os corpos de prova foram acoplados a uma mesa metálica (Figura 1-L), desenvolvida no "Houston Biomaterial Research Center", a qual permite pressionar a superfície de esmalte plana de encontro a uma matriz de Teflon® bipartida, com um orifício central formando uma cavidade cilíndrica de 4mm de altura e 3mm de diâmetro (Figura 1-M), na área de contato com o esmalte.

Com o bloco em posição e devidamente fixado, os selantes Fluroshield® e Embrace Wetbond™ foram aplicados nos diferentes grupos, por meio do orifício da matriz (Figura 1-N) e fotopolimerizados por 40s (Figura 1-O) empregando uma unidade fotopolimerizadora com densidade de energia de 450 miliWatts por centímetro quadrado (mW/cm^2) (XL 3000 - 3M Dental Products, St Paul, USA), calibrado por meio da mensuração da quantidade de emissão de luz, utilizando um radiômetro (Demetron – Kerr Corporation, Orange, USA).

Em seguida, os corpos de prova foram retirados da mesa metálica (Figura 1-P) e a matriz separada (Figura 1-Q) e removida (Figura 1-R) obtendo-se, desta forma, um cilindro de selante aderido à superfície do esmalte (Figura 1-S). Os espécimes foram armazenados em água destilada a 37°C, em estufa (Olidef CZ – Ribeirão Preto, Brasil) durante 48h (Figura 1-T) e, a seguir, foram submetidos a um regime de termociclagem em máquina para termociclagem (Ética Equipamentos Científicos S/A, São Paulo, Brasil) de 500 ciclos, com variação de temperatura entre 5 e 55°C, com 30s de imersão em cada banho, e tempo de 3s entre os banhos (Figura 1-U). Após a termociclagem, os dentes foram novamente imersos em água destilada e mantidos em estufa a 37°C, durante 14h, conforme previamente descrito por Barroso et al. (2005), Torres et al. (2005), Gomes-Silva et al. (2008) e Lepri et al. (2008).

Ao final deste período, os espécimes foram secos com jatos de ar, levados à máquina de ensaios universal (MEM 2000 - EMIC Ltda., São José dos Pinhais, Brasil) e submetidos ao teste de resistência ao cisalhamento, com uma velocidade de 0,5 milímetro por minuto (mm/min) e célula de carga de 50 quilogramas força (Kgf) (Figura 1-V). Os valores obtidos em quilograma força por centímetro quadrado (Kgf/cm²) foram anotados e, então, convertidos e expressos em valores de carga/área Mega Pascal (MPa), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{MPa} = \frac{(\text{Resistência ao cisalhamento em Kgf/cm}^2) \times (9,8\text{N})}{\text{Área adesiva em mm}^2}$$

$$1\text{Kgf} = 9,8 \text{ Newton (N)}$$

$$\text{Área} = \pi r^2 \text{ (mm}^2\text{)}$$

Após o teste de resistência ao cisalhamento, as superfícies de esmalte foram analisadas em lupa estereoscópica (Nikon 88286, Honshu, Japan), com aumento de 40x, para a determinação do tipo de fratura ocorrido, considerando-se:

- Fratura adesiva: quando a fratura ocorreu exatamente na interface dente/selante.
- Fratura coesiva: quando a fratura ocorreu no corpo do material ou no substrato dental, mantendo a interface intacta.
- Fratura mista: quando houve na mesma área rompimento de parte da união adesiva, como também fratura no corpo do material ou no substrato dental.

Análise estatística

Os resultados da resistência ao cisalhamento dos diferentes grupos foram comparados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism[®] 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA), por meio da análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.2 MICROINFILTRAÇÃO

Seleção dos dentes

Foram obtidos junto ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 90 terceiros molares hígidos, extraídos de humanos e armazenados em solução de azida de sódio a 0,4%, após a extração. Todos os dentes foram submetidos à profilaxia com pasta de pedra-pomes e água e escova Robinson, seguida do exame visual sob lupa estereoscópica, com aumento de 10X Carl Zeiss e exame tátil com o auxílio de sonda exploradora, descartando-se aqueles com trincas, fraturas, lesões de cárie ou anomalias de estrutura.

Materiais utilizados

Para o condicionamento do esmalte, em todos os grupos, foi utilizado o gel de ácido fosfórico a 37% (Gel Etchant). Para os grupos experimentais foi utilizado o selante Embrace Wetbond™ e para os controles o selante Fluroshield®.

Divisão dos grupos

Os dentes foram divididos aleatoriamente em 6 grupos de 15 dentes cada (n=15), seguindo a especificação da ISO TR-11405 (ISO, 1994) relativa ao número de dentes preconizados para a realização de testes de microinfiltração. A avaliação da microinfiltração dos materiais estudados foi realizada no Laboratório de Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A porção radicular de cada dente foi removida com um disco flexível diamantado montado em máquina de corte (Minitom), 2mm além da junção amelocementária. Os dentes de cada grupo foram submetidos aos procedimentos descritos a seguir.

GRUPO I (Controle)

A superfície do esmalte oclusal foi condicionada com gel de ácido fosfórico a 37% por 15s, lavada com água por 20s e seca com jato de ar isento de partículas oleosas por 10s, até a obtenção de uma superfície esbranquiçada com aspecto de giz. Em seguida, foi aplicado o selante Fluroshield®.

GRUPO II (Experimental)

A superfície do esmalte oclusal foi condicionada com gel de ácido fosfórico a 37% por 15s, lavada com água por 20s e seca com jato de ar isento de partículas oleosas por 10s, até a obtenção de uma superfície esbranquiçada com aspecto de giz. Em seguida, foi aplicado o selante Embrace Wetbond™.

GRUPO III (Controle)

Após o condicionamento ácido da superfície do esmalte oclusal, foram efetuadas a lavagem e secagem, da mesma forma descrita para o grupo anterior. Em seguida, os espécimes foram contaminados com 0,01ml de saliva humana fresca, durante 20s e secos com jato de ar isento de partículas oleosas, por 5s. A seguir, foi aplicado o selante Fluroshield®.

GRUPO IV (Experimental)

A superfície do esmalte oclusal foi condicionada, lavada e seca da mesma forma que a descrita para os grupos anteriores. Em seguida, os espécimes foram contaminados com 0,01ml de saliva humana fresca, durante 20s e secos com jato de ar isento de partículas oleosas, por 5s. A seguir, foi aplicado o selante Embrace Wetbond™.

GRUPO V (Controle)

Após o condicionamento ácido da superfície do esmalte oclusal, foram efetuadas a lavagem e secagem, de forma semelhante aos demais grupos. Em seguida, os espécimes foram lavados com água da seringa tríplice durante 5s e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente, deixando a superfície do esmalte levemente úmida. A seguir, foi aplicado o selante Fluroshield®.

GRUPO VI (Experimental)

Após a realização do condicionamento ácido da superfície do esmalte oclusal, foram efetuadas a lavagem e secagem, de forma semelhante aos demais grupos. Em seguida, os espécimes foram lavados com água da seringa tríplice durante 5s e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente, deixando a superfície do esmalte levemente úmida. A seguir, foi aplicado o selante Embrace Wetbond™.

Técnica de Aplicação do selante

O selante foi aplicado na superfície oclusal com um pincel, iniciando pelo centro da fissura e estendendo para as vertentes das cúspides evitando a inclusão de bolhas. A seguir, foi realizada a fotopolimerização utilizando uma unidade fotopolimerizadora XL 3000 com densidade de energia de $450\text{mW}/\text{cm}^2$, calibrada por meio da mensuração da quantidade de emissão de luz, utilizando um radiômetro (Demetron).

A sondagem da superfície oclusal com sonda exploradora foi efetuada para verificar a adaptação marginal do selante e a presença de bolhas, bem como na tentativa de remoção do selante, para verificar a sua retenção.

Preparo dos dentes para o teste de microinfiltração

Após a fotopolimerização do selante, os dentes foram armazenados em água destilada em estufa a 37°C , durante 7 dias. A figura 2 ilustra a sequência da metodologia empregada no preparo dos espécimes para a realização do teste de microinfiltração.

Os dentes foram termociclados automaticamente, por meio de banhos de água alternados às temperaturas de 5 e 55°C , com 30s de imersão em cada banho, e 3s de tempo de transferência entre os banhos, perfazendo um total de 500 ciclos (Figura 2-A).

A seguir, os dentes foram secos à temperatura ambiente e o selamento da região correspondente à câmara pulpar foi realizado com resina composta (Filtek™ Z-250 - 3M Dental Products, St. Paul, USA) recoberta por uma camada de impermeabilizante de presa rápida (Resina Epóxica Araldite® - Brascola Ltda., São Bernardo do Campo, Brasil), e por duas camadas de esmalte cosmético (Colorama, São Paulo, Brasil) em toda a superfície dentária, exceto numa faixa de 2mm ao redor das margens do selante (Figuras 2-B e 2-C).

Após a secagem do esmalte cosmético, os dentes foram armazenados em água destilada por 2h, à temperatura ambiente e, posteriormente, imersos em solução aquosa de Rodamina B a 0,2% (Figura 2-D), durante 24h, lavados e escovados com escovas manuais em água corrente durante 10 minutos (min) para a remoção do corante superficialmente aderido ao esmalte cosmético, e mantidos à temperatura ambiente durante 6h para secagem e fixação do corante nas estruturas dentárias. Após este período, as camadas de Araldite® e de esmalte cosmético foram removidas utilizando-se um instrumento afiado (Figura 2-E).

Os dentes foram incluídos em uma matriz de silicone (Figura 2-F) preenchida com resina acrílica quimicamente ativada JET (Figura 2-G). Após a polimerização da resina

(Figuras 2-H e 2-I), os dentes foram seccionados no sentido vestibulo-lingual com um disco diamantado refrigerado a água em uma máquina de secção de tecidos mineralizados Minitom (Figura 2-J) obtendo-se 4 secções de 1mm de espessura por dente, as quais foram lixadas manualmente com lixas de granulação 400 e 600, finalizando com granulações de 1000 a 1200, para obtenção de uma superfície lisa com espessura final de aproximadamente 0,25mm, aferida com paquímetro (Contenco Indústria e Comércio Ltda., Belo Horizonte, Brasil).

As secções de cada elemento dental foram fixadas em lâminas com éster de cianoacrilato (Super Bonder® – Henkel Loctite Adesivo Ltda., Itapevi, Brasil), num total de 4 secções por lâmina (Figura 2-K). As lâminas foram devidamente identificadas de acordo com o grupo ao qual pertenciam e analisadas para detectar e medir a profundidade da infiltração marginal em microscopia óptica com 2,5X de aumento (Axio Scope – Carl Zeiss, New York, USA) (Figura 2-L). O microscópio encontrava-se conectado a uma câmera de vídeo (TK-1270 – JVC, Tokyo, Japan), por meio de um anel com 10X de aumento, para ampliação e envio da imagem para um computador, onde foi digitalizada e analisada empregando o programa KS 300 - v 2.0 (Kontron Elektronik, Dusseldorf, Germany) o qual permitiu a padronização das avaliações e a mensuração quantitativa da microinfiltração, em mm.

Inicialmente, com o auxílio do programa KS 300, mensurou-se linearmente a extensão do selante na altura das cúspides vestibulares e linguais/palatinas até o fundo da fissura, em mm. Em seguida, mensurou-se nas mesmas regiões, a penetração do corante ao longo da interface dente/selante, também em mm. A porcentagem da microinfiltração foi calculada a partir dos dados da penetração do corante em relação à extensão do selante. Para cada lâmina foi calculada a média da microinfiltração nos 4 cortes, o que permitiu, posteriormente, a obtenção da média para os respectivos grupos.

Figura 2 - Sequência da metodologia empregada - Teste de microinfiltração.

- A. Máquina de termociclagem.
- B. Dente isolado com resina composta, resina epóxica e esmalte cosmético (vista oclusal).
- C. Dente isolado com resina composta, resina epóxica e esmalte cosmético (vista lateral).
- D. Imersão do dente isolado no corante Rodamina B a 0,2%.
- E. Aspecto do dente após imersão no corante Rodamina B a 0,2%.
- F. Dente posicionado na matriz de silicone para a confecção do corpo de prova.
- G. Inclusão do dente e preenchimento da matriz de silicone com resina acrílica quimicamente ativada.
- H. Polimerização da resina acrílica quimicamente ativada.
- I. Corpo de prova confeccionado.
- J. Máquina de secção de tecidos mineralizados com o corpo de prova posicionado.
- K. Lâmina com quatro secções correspondentes a um dente selado.
- L. Microscópio óptico conectado ao computador.

Análise estatística

Os resultados da microinfiltração dos diferentes grupos foram comparados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism® 4, por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.3 LIBERAÇÃO DE FLUORETO

A determinação do conteúdo de fluoreto foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Para a realização deste trabalho foi empregado o método do eletrodo seletivo de fluoreto, preconizado por Frank e Ross Jr. (1967). O método baseia-se na medida da diferença de potencial do eletrodo em contato com a amostra. As determinações de fluoreto nas diferentes amostras foram realizadas por potenciometria direta, utilizando o eletrodo seletivo combinado de fluoreto (Orion - modelo 2008 - Thermo Electron Corporation, Orion Products, Beverly, USA) acoplado a um aparelho analisador digital de pH (pHmetro Micronal B315, São Paulo, Brasil). Como ajuste de força iônica e de pH foi utilizado o tampão citrato 0,5 mol por litro (mol/l), pH 5,5, na proporção de 1:1 amostra tampão (Spadaro, 1986). A concentração de fluoreto nas amostras (x), foi determinada pelo valor do respectivo potencial obtido (y) e empregando a equação da reta $Y=a+b \log x$, obtida por regressão linear de leituras em triplicatas de soluções diluídas convenientemente, a partir de uma solução-padrão de fluoreto, sendo “a”, o coeficiente linear da reta (*slope*) e “b”, o coeficiente angular.

Testes realizados

Inicialmente foi realizado o teste de liberação do fluoreto por meio de água aquecida, para verificar se o selante Embrace Wetbond™ apresentava fluoreto em sua composição. Como o selante apresentou fluoreto, foi realizado o teste de liberação de fluoreto em saliva artificial, para quantificar a liberação de fluoreto em função do tempo.

Materiais utilizados

Foram selecionados dois selantes resinosos contendo fluoreto em sua composição química: o Embrace Wetbond™ (experimental) e o Fluroshield® (controle). Foi utilizada a resina composta micro-híbrida fotopolimerizável Filtek™ Z-250 como controle negativo, e o cimento de ionômero de vidro convencional Vidrion R (S. S. White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) como controle positivo.

a) Liberação de fluoreto em água

Este estudo foi realizado com a finalidade de verificar se os materiais estudados apresentavam fluoreto em sua composição. Em estudo piloto prévio evidenciou-se que a liberação do fluoreto por meio de água aquecida apresentava resultados significativamente maiores que a liberação em água à temperatura ambiente. Com relação à liberação do fluoreto total, o estudo piloto permitiu constatar também que a liberação do fluoreto por meio de ácido apresentava resultados similares à liberação por meio de água aquecida comprovando, desta forma, que o fluoreto provavelmente não se encontrava covalentemente ligado. Por esta razão, foi realizada a liberação em água aquecida. As amostras para cada condição experimental foram efetuadas em triplicata.

Curva de calibração da liberação de fluoreto em água

Para a obtenção dos resultados, inicialmente foi obtida a curva de calibração do fluoreto, apresentada na figura 3.

Figura 3 - Curva de calibração da liberação de fluoreto em água.

A curva de calibração foi obtida a partir de leituras em milivolt (mV) de soluções-padrão de fluoreto de sódio. A temperatura foi mantida constante, pois diferenças de 1°C na temperatura das soluções podem implicar em erros de até 2%. As concentrações de fluoreto variaram entre 1 e 200 microgramas (μg). Estas soluções foram acondicionadas em frascos plásticos e mantidas em refrigerador por, no máximo, 30 dias. No momento da determinação da concentração de fluoreto pipetou-se 0,5ml da solução-padrão (diluída e mantida em geladeira) e 0,5ml de tampão citrato 0,5mol/l, pH 5,5, sendo o mesmo procedimento realizado nas avaliações de todas as amostras (proporção amostra/tampão de 1:1). Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 10% para todos os padrões foram aceitas.

Procedimentos laboratoriais do estudo da liberação de fluoreto em água

Após obtenção das curvas de calibração, foi efetuada a análise da liberação de fluoreto em água do Embrace Wetbond™, Fluroshield® e Filtek™ Z-250, retirados diretamente da embalagem original e sem fotopolimerização. O Vidrion R foi manipulado de acordo com as instruções do fabricante e imediatamente diluído em água. Para o estudo da liberação do fluoreto total por meio da água foram colocados, em béqueres de 25ml, 250 miligramas (mg) de cada material, pesados em balança eletrônica de precisão ($\pm 0,01\text{mg}$) (BG 4000 - Gehaka Ltda, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram adicionados 4,5ml de água MilliQ e 0,5ml de HCl 1:1, seguido de aquecimento até o aparecimento das primeiras bolhas em ebulição, porém sem ferver, e colocados em agitação por 10min em um agitador magnético. A solução foi, então, transferida para uma proveta de 12,5ml, onde foram adicionadas de 3 a 4 gotas do indicador azul de bromotimol. Em seguida, foram adicionados amoníaco 1:1 até o aparecimento da cor azul e turvação da solução e ácido cítrico 7% até viragem do azul para coloração amarela. A seguir, o volume foi completado para 25ml com água MilliQ. Após homogeneização da solução, foram pipetados 500 microlitros (μl) da mesma, e adicionados 500 μl da solução tampão citrato 0,5mol/l, pH 5,5. A solução foi homogeneizada novamente, sendo efetuada a leitura, em mV, em eletrodo seletivo combinado para fluoreto. Finalmente, a concentração foi calculada a partir da equação da reta, obtendo-se a quantidade de fluoreto liberada, em μg , que foi convertida em ppm. A figura 4 apresenta o eletrodo seletivo combinado de fluoreto utilizado para a determinação da concentração de fluoreto dos materiais.

Figura 4 - Eletrodo seletivo combinado para fluoreto utilizado para a determinação da concentração de fluoreto dos materiais.

b) Liberação de fluoreto em saliva artificial

A saliva artificial foi utilizada na tentativa de reproduzir o ambiente bucal, já que esta apresenta a mesma composição da saliva humana.

Curva de calibração da liberação de fluoreto em saliva artificial

Para a obtenção dos resultados, inicialmente foi obtida a curva de calibração do fluoreto, apresentada abaixo (Figura 5), da mesma forma descrita anteriormente.

Figura 5 - Curva de calibração da liberação de fluoreto em saliva artificial.

Procedimentos laboratoriais para o estudo da liberação de fluoreto em saliva artificial

A figura 6 ilustra a metodologia empregada para a realização do teste de liberação de fluoreto em saliva artificial. Para este estudo, foram confeccionados corpos de prova para cada material a ser estudado: Embrace Wetbond™, Fluroshield®, Filtek™ Z-250 e Vidrion R (Figura 6-A). Os diferentes materiais foram introduzidos em matrizes de Teflon com dimensões padronizadas de 3mm de altura por 5mm de diâmetro, construídas na Oficina de Precisão do Campus da USP de Ribeirão Preto e polimerizados de acordo com as especificações dos fabricantes (Figura 6-B). Foram confeccionados 8 corpos para prova de cada material (Figura 6-C). Por meio de balança de precisão eletrônica BG 4000 foi pesada a massa média aproximada de cada grupo de materiais obtendo-se os seguintes valores: Embrace Wetbond™ – 0,1059 gramas (g); Fluroshield® – 0,1027g; Vidrion R – 0,1144g; Resina composta Filtek™ Z-250 – 0,1402g. Em seguida, os corpos de prova de cada material foram armazenados individualmente em tubos plásticos (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) contendo 1ml de saliva artificial (Figura 6-D). Diariamente, durante um período de 15 dias, cada corpo de prova foi colocado em um novo tubo plástico contendo 1ml da saliva artificial, sendo a liberação de fluoreto mensurada na solução resultante (Figura 6-E). Após 15 dias, foi efetuada a leitura, em mV, nos 15 frascos obtidos para cada corpo de prova em eletrodo para fluoreto. Para realizar-se a leitura foram pipetados 0,5ml da saliva artificial de cada tubo de ensaio onde estava armazenado o corpo de prova e 0,5ml da solução tampão citrato 0,5mol/l, pH 5,5 (Figura 6-F), que foi homogeneizada antes da leitura em eletrodo para fluoreto. Após cada leitura, o eletrodo do aparelho foi devidamente lavado e seco e a solução desprezada. Desse modo, foi obtida a liberação diária de fluoretos dos materiais estudados e pôde-se calcular a concentração de fluoreto presente na saliva artificial por meio da equação da reta.

Figura 6 - Sequência da metodologia empregada – Teste de liberação de fluoreto em saliva artificial.

- A. Materiais empregados.
- B. Confeção dos corpos de prova na matriz de Teflon.
- C. Corpo de prova com 3mm de altura e 5mm de diâmetro.
- D. Corpo de prova colocado individualmente no tubo plástico, contendo 1ml de saliva artificial, onde foi mantido por 1 dia.
- E. Bandeja com tubos plásticos, na qual foram efetuadas as trocas dos corpos de prova a cada dia, por um período de 15 dias.
- F. Tampão citrato 0,5mol/l, pH 5,5 na proporção de 1:1 amostra/tampão, empregado para ajuste da força iônica e pH.

Análise estatística

Os resultados da liberação de fluoreto dos diferentes materiais foram comparados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism[®] 4, por meio da análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* foram utilizados dois selantes resinosos com fluoreto em sua composição química: (Embrace Wetbond[™] e Fluroshield[®]), um cimento de ionômero de vidro convencional (Vidrion R), solução de digluconato de clorexidina a 1% (Farmácia Doce Erva, Ribeirão Preto, S.P., Brasil) como controle positivo e soro fisiológico como controle negativo.

Cepas microbianas utilizadas

Foram utilizadas duas cepas de *Streptococcus mutans*: cepa padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) 25175 e cepa de campo, originária da cavidade bucal.

Procedimentos microbiológicos

A figura 7 ilustra a sequência da metodologia empregada para a obtenção dos inóculos, formação das camadas e halos de inibição para a avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em ágar. Os inóculos foram obtidos por meio da diluição em salina das cepas cultivadas em TSb (Tryptic Soy Broth - Difco[™], Detroit, USA) na densidade de 1-2 da escala de McFarland (Figuras de 7-A a 7-C). Para o teste de difusão em ágar foi empregado o método do poço, utilizando o meio de cultura TSA (Tryptic-Soy-Agar - Difco[™], Detroit, USA).

No fluxo laminar, a camada base (*base layer*) foi obtida vertendo-se 12ml de meio de cultura TSA, a 50°C, em placas de Petri de 20X100mm, esterilizadas (Figura 7-D). Após solidificação da camada base, adicionou-se a camada *seed* (*seed layer*), composta

de 8ml de meio de cultura TSA, a 50°C, com 10^6 ufc por ml do inóculo original (escala 1-2 de McFarland) (Figura 7-E).

Após solidificação, foram realizadas 7 perfurações (poços) equidistantes na superfície do meio de cultura, com 5mm de diâmetro utilizando uma guia para a marcação dessas perfurações (Figuras 7-F e 7-G). Cada poço foi preenchido com um dos materiais a serem testados. O Vidrion R foi manipulado de acordo com as especificações do fabricante e colocado nos poços até o seu preenchimento total, imediatamente após sua manipulação (Figura 7-H). Após o preenchimento dos poços, os selantes resinosos foram fotopolimerizados por 40s por meio de uma unidade fotopolimerizadora XL 3000 com densidade de energia de 450mW/cm^2 nos dois lados do poço ficando, assim, o material completamente polimerizado (Figura 7-I).

O teste foi efetuado em cinco repetições para cada material testado. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas, para que ocorresse a pré-difusão dos materiais. A seguir, as placas foram incubadas em microaerofilia (sistema de chama de vela), a 37°C por 24h.

Mensuração dos halos de inibição

O efeito inibitório dos materiais sobre *Streptococcus mutans* foi avaliado por meio da formação dos halos de inibição, após o período de incubação, mensurados em milímetros, com uma régua, sob luz refletida (Figura 7-J).

Figura 7 - Sequência da metodologia empregada – Teste de difusão em ágar.

- A. Diluição em salina das cepas cultivadas em TSb.
- B. Inóculos identificados.
- C. Inóculos armazenados em estantes.
- D. Camada base.
- E. Camada *seed*.
- F. Guia para a marcação das sete perfurações (poços) equidistantes na superfície do meio de cultura, com 5mm de diâmetro.
- G. Perfuração dos poços na superfície do meio de cultura.
- H. Preenchimento completo dos poços com os materiais.
- I. Materiais polimerizados.
- J. Halo de inibição formado pelo efeito inibitório do material.

Análise estatística

Os resultados da atividade antimicrobiana dos diferentes materiais foram comparados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism® 4 por meio da análise de variância ANOVA e pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.5 DOSAGEM DE BISFENOL A

A determinação do conteúdo de bisfenol A nos selantes foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, por meio do método de análise por espectrometria de massas.

Materiais utilizados

Foram empregados dois selantes resinosos: o Embrace Wetbond™, isento de bisfenol A segundo o fabricante, e o Fluroshield®, à base de Bis-GMA.

Obtenção e processamento das amostras

Foi dispensada uma gota de cada selante em um recipiente numerado contendo 3ml de metanol, o qual é um solvente utilizado para espectrometria de massas de íons positivos com baixos valores de pH. Foram realizados testes com as fórmulas moleculares do bisfenol A ($C_{15}H_{16}O_2$) e do Bis-GMA ($C_{29}H_{36}O_8$) (Moraes e Lago, 2003; Crotti et al., 2006).

Processamento das amostras

A solução foi colocada em um agitador de tubos (AP56 – Phoenix, Viçosa, Brasil) durante um minuto para homogeneização e solubilização do selante no metanol. Logo após, foram coletados 1ml da solução e 1ml de metanol com uma seringa descartável e realizada nova homogeneização na seringa. A seguir, a solução foi filtrada por uma unidade filtrante descartável de 0,45 µm e 13mm diâmetro (MILLEX HV - Millipore Lote BGKN61236, São Paulo, Brasil).

Quantificação do bisfenol A

Após filtragem, os extratos foram analisados utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução por cromatografia gasosa (UltrOTOF_Q ESI-TOF Mass Spectrometer - Bruker Daltonics, Billerica, EUA) a uma resolução estabelecida de 0 a 1.000 para o peso molecular (Figura 8). Como o aparelho é de alta resolução, antes da realização dos testes, foi necessária a sua calibração interna e externa. Para a calibração interna foi utilizada uma solução de NA-TFA a 10mg/ml e para a externa uma solução de Formiato de Sódio a 10mM.

Figura 8 - Espectrômetro de massas de alta resolução por cromatografia gasosa (UltratOFQ ESI-TOF Mass Spectrometer).

O experimento foi realizado por meio de uma bomba de infusão com fluxo de 100 microlitros por hora ($\mu\text{l/h}$), em fase móvel para a solubilização: MeOH. O modo de detecção foi o positivo, indicado para substâncias básicas, devido à facilidade de serem protonadas. O aparelho foi calibrado com as seguintes especificações: energia de 4000 volts, capilar de 4500 volts, saída do capilar de 300 volts, lente 1 – 55 volts, lente 2 – 25 volts, transferência 60 microsegundos (μs) e saída de colisão $60\mu\text{s}$. Os íons monoisotópicos foram monitorados na razão massa para carga (m/z) 2281145 para quantificar e confirmar a presença de bisfenol A ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$) (Figura 9) e 512 para o Bis-GMA ($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$) (Figura 10). A quantificação foi obtida usando diluição calibrada dos isótopos com um limite de detecção de 0,1 nanograma por mililitro (ng/ml). Os testes foram realizados em triplicata com os dois selantes analisados.

Figura 9 – Estrutura molecular do bisfenol A ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$).

Figura 10 - Estrutura molecular do Bis-GMA ($\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_8$).

A análise dos resultados foi efetuada por meio da comparação da presença ou ausência de bisfenol A e de Bis-GMA nos materiais avaliados.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 RESISTÊNCIA AO CISALHAMENTO

Os resultados obtidos no teste de resistência ao cisalhamento estão apresentados na tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Valores de resistência ao cisalhamento, em MPa, observados nos diferentes grupos

Grupos						
Espécimes	Fluroshield	Embrace	Fluroshield+ Saliva	Embrace+ Saliva	Fluroshield+ Água	Embrace + Água
1	27,62	9,64	19,40	4,92	6,84	11,43
2	26,77	7,64	15,86	6,35	14,89	6,09
3	10,97	9,35	13,97	4,35	2,39	10,81
4	21,49	8,95	10,13	4,45	0	8,58
5	24,18	14,26	14,41	0	0	8,75
6	19,34	6,72	0	6,45	0	13,56
7	22,51	0	20,48	8,00	0	9,02
8	21,54	7,64	13,25	1,55	0	10,03
9	18,94	4,95	13,93	1,92	7,80	3,70
10	8,31	7,35	16,24	2,86	0	8,03
11	17,46	8,45	17,65	4,32	0	8,58
12	15,52	5,81	20,30	11,07	0	1,81
13	18,97	7,03	9,29	3,87	0	5,96
14	20,21	9,20	19,57	7,14	0	4,95
15	17,52	7,76	15,28	7,10	0	7,23

Tabela 2 – Média e desvio padrão da resistência ao cisalhamento observada nos diferentes grupos

	Fluroshield	Embrace	Fluroshield+ Saliva	Embrace+ Saliva	Fluroshield+ Água	Embrace+ Água
Média	20,93	7,730	16,19	4,520	1,216	7,902
Desvio Padrão	3,610	1,400	3,145	2,355	2,669	3,063

A análise dos resultados obtidos evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O resultado da comparação dos grupos dois a dois encontra-se apresentado na figura 11. Observou-se maior resistência ao cisalhamento para o selante Fluroshield®, estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do selante Fluroshield® contaminado com saliva, seguidos pelo selante Embrace Wetbond™ contaminado com água e pelo selante Embrace Wetbond™, que apresentaram similaridade estatística e foram estatisticamente superiores ao selante Embrace Wetbond™ contaminado com saliva. O selante Fluroshield® contaminado com água apresentou os piores resultados.

Figura 11 – Comparação dos valores de resistência ao cisalhamento nos espécimes dos diferentes grupos. Letras diferentes refletem diferença estatisticamente significativa.

As tabelas 3 e 4 apresentam a classificação e a média das porcentagens, respectivamente, dos diferentes tipos de fraturas observados nos grupos 1 a 6.

Tabela 3 – Classificação dos diferentes tipos de fraturas observados nos grupos 1 a 6

Grupos						
Espécimes	Fluroshield	Embrace	Fluroshield+ Saliva	Embrace+ Saliva	Fluroshield+ Água	Embrace+ Água
1	adesiva	adesiva	Adesiva	adesiva	adesiva	Adesiva
2	coesiva	mista	Mista	mista	mista	Adesiva
3	coesiva	mista	Adesiva	adesiva	adesiva	Coesiva
4	mista	adesiva	Adesiva	adesiva	adesiva	Mista
5	mista	adesiva	Mista	adesiva	adesiva	Adesiva
6	coesiva	adesiva	Adesiva	adesiva	adesiva	Mista
7	mista	adesiva	Mista	adesiva	adesiva	adesiva
8	mista	adesiva	Coesiva	adesiva	adesiva	mista
9	mista	adesiva	Mista	adesiva	adesiva	adesiva
10	mista	adesiva	Adesiva	adesiva	adesiva	mista
11	adesiva	adesiva	Coesiva	adesiva	adesiva	adesiva
12	mista	adesiva	Adesiva	mista	adesiva	adesiva
13	mista	adesiva	Adesiva	adesiva	adesiva	mista
14	mista	adesiva	Coesiva	adesiva	adesiva	mista
15	coesiva	adesiva	Mista	adesiva	adesiva	mista

As porcentagens dos tipos de fraturas por grupo estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – Média das porcentagens dos diferentes tipos de fraturas por grupo

Grupos						
Tipo de Fratura	Fluroshield	Embrace	Fluroshield+ Saliva	Embrace+ Saliva	Fluroshield+ Água	Embrace+ Água
Adesiva	13,33	86,66	46,66	86,66		46,66
Coesiva	26,66	0	20	0	0	6,66
Mista	60,01	13,34	33,34	13,34	6,67	46,68

Os espécimes onde foram aplicados o selante Fluroshield® apresentaram 13,33% de fraturas adesivas quando este foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante, 46,66% de fraturas adesivas quando contaminado com saliva e 93,33% de fraturas adesivas quando contaminado com água. Por outro lado, os espécimes onde foi aplicado o selante Embrace Wetbond™ apresentaram 46,66% de fraturas adesivas quando este foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante, ou seja, com presença de umidade. No entanto, as porcentagens de fraturas adesivas para este material foram de 86,66% quando aplicado em ausência de umidade ou em presença de contaminação com saliva.

4.2 MICROINFILTRAÇÃO

Os resultados obtidos no teste de microinfiltração estão apresentados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Valores de microinfiltração, em porcentagens, observados nos diferentes grupos

Grupos						
Espécimes	Fluroshield	Embrace	Fluroshield+ Saliva	Embrace+ Saliva	Fluroshield+ Água	Embrace+ Água
1	0	81,36	0	100,00	100,00	100,00
2	0	100,00	0	100,00	100,00	100,00
3	0	100,00	0	100,00	100,00	100,00
4	0	72,39	0	100,00	100,00	80,37
5	0	100,00	0	77,32	100,00	100,00
6	0	100,00	80,32	100,00	100,00	63,98
7	0	100,00	0	75,00	100,00	100,00
8	0	64,70	42,41	63,33	100,00	100,00
9	0	26,02	37,50	56,52	100,00	50,10
10	0	90,70	12,50	100,00	100,00	20,39
11	0	92,27	0	100,00	100,00	100,00
12	0	100,00	0	100,00	100,00	100,00
13	0	91,99	62,50	100,00	100,00	100,00
14	0	100,00	0	56,13	100,00	51,57
15	0	100,00	0	59,26	100,00	18,99

Tabela 6 – Média e desvio padrão da microinfiltração observada nos diferentes grupos

	Fluroshield	Embrace	Fluroshield+ Saliva	Embrace+ Saliva	Fluroshield+ Água	Embrace+ Água
Média	0,0	87,96	15,68	85,84	100,0	79,03
Desvio Padrão	0,0	19,77	25,86	18,17	0,0	29,24

A análise dos resultados obtidos evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O resultado da comparação dos grupos dois a dois encontra-se apresentado na figura 12. Observou-se menor microinfiltração nos espécimes onde foi utilizado o selante Fluroshield®, estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do selante Fluroshield® contaminado com saliva, seguidos pelos outros três grupos onde empregou-se o selante Embrace Wetbond™ (Embrace Wetbond™, Embrace Wetbond™ contaminado com saliva e Embrace Wetbond™ contaminado com água). O grupo onde empregou-se o selante Fluroshield® contaminado com água apresentou os maiores valores de microinfiltração ($p < 0,05$).

Figura 12 – Comparação dos valores de microinfiltração nos espécimes dos diferentes grupos. Letras diferentes refletem diferença estatisticamente significativa.

A figura 13 ilustra a microinfiltração observada nos diferentes grupos.

Figura 13 – Microinfiltração observada nos diferentes grupos.

- A. Grupo I – Fluroshield®.
- B. Grupo II – Embrace Wetbond™.
- C. Grupo III – Fluroshield® contaminado com saliva.
- D. Grupo IV – Embrace Wetbond™ contaminado com saliva.
- E. Grupo V – Fluroshield® contaminado com água.
- F. Grupo VI – Embrace Wetbond™ contaminado com água.

4.3 LIBERAÇÃO DE FLUORETO

As concentrações de fluoreto, em ppm, liberadas em água, nas amostras dos diferentes materiais, estão apresentadas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 – Concentrações de fluoreto (ppm) presentes na composição dos diferentes materiais, no estudo de liberação em água

Materiais	Amostras		
	1	2	3
Fluroshield	1444	1606	1524
Embrace	4476	4476	4580
Filtek	<0,1	<0,1	<0,1
Vidrion R	3664	3714	3564

Tabela 8 – Média e desvio padrão da liberação de fluoreto (ppm) em água, dos diferentes materiais

	Fluroshield	Vidrion R	Embrace	Filtek
Média	1.524.667	3.647.333	4.510.663	0.100
Desvio Padrão	81.002	76.376	60.044	0.000

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade que mostrou que a distribuição do erro amostral não foi normal. Procedeu-se à transformação dos dados para logaritmo, obtendo-se a distribuição normal. A análise de variância evidenciou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Observou-se maior liberação de fluoreto no selante Embrace Wetbond™, seguido pelo cimento Vidrion R, e, estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do selante Fluroshield®. A resina composta Filtek Z250™ apresentou quantidade insignificante de fluoreto liberada ($p > 0,05$) (Figura 14).

Figura 14 – Comparação das concentrações de fluoreto (ppm) em água, liberadas dos diferentes materiais. Letras diferentes refletem diferença estatisticamente significativa.

As concentrações de fluoreto, em ppm, liberadas em saliva, nas amostras dos diferentes materiais, estão apresentadas na tabelas 9, 10, 11 e 12.

Tabela 9 – Média e desvio padrão da liberação de fluoreto (ppm) em saliva artificial do selante Embrace Wetbond™ durante o período de 15 dias do experimento

Dias															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M	49,99	25,27	8,690	8,690	5,560	2,797	1,233	1,335	1,147	2,332	1,651	1,208	5,836	4,963	4,827
DP	1,989	0,7301	1,443	1,443	0,4874	0,3885	0,2791	0,1374	0,1233	0,6213	0,1696	0,1044	1,160	0,1275	0,1620

Tabela 10 – Média e desvio padrão da liberação de fluoreto (ppm) em saliva artificial do selante Fluroshield® durante o período de 15 dias do experimento

Dias															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M	40,49	2,267	1,352	0,7615	0,5951	0,5092	0,3321	0,4006	0,5616	0,8153	0,5084	0,3239	0,2265	0,2223	0,2272
DP	1,421	0,9683	0,6013	0,2895	0,3236	0,2040	0,1142	0,1920	0,2793	0,3754	0,2321	0,1723	0,03455	0,02653	0,03043

Tabela 11 – Média e desvio padrão da liberação de fluoreto (ppm) em saliva artificial do cimento de ionômero de vidro Vidrion R durante o período de 15 dias do experimento

Dias															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M	34,01	18,79	11,26	7,013	6,680	6,081	5,336	6,407	4,567	3,316	4,804	6,687	5,189	4,693	4,578
DP	5,793	3,999	1,816	1,857	0,5804	0,8175	0,4700	0,4768	1,402	0,3668	0,6078	0,6347	0,1622	0,1944	0,1376

Tabela 12 – Média e desvio padrão da liberação de fluoreto (ppm) em saliva artificial da resina composta Filtek™ Z-250 durante o período de 15 dias do experimento

Dias															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M	0,3440	0,2570	0,2243	0,1848	0,09124	0,08451	0,08806	0,07286	0,1175	0,06882	0,07874	0,09250	0,2518	0,2734	0,2734
DP	0,1710	0,1245	0,07296	0,04208	0,02898	0,01258	0,01315	0,00605	0,03740	0,02591	0,02166	0,02951	0,00594	0,00904	0,00904

Com relação ao estudo da liberação de fluoreto em saliva artificial, observou-se que embora tenha sido semelhante nos diferentes grupos, houve diferença significativa nos valores de liberação encontrados comparando-se os materiais.

Apenas o Vidrion R apresentou valores mensuráveis de liberação de fluoreto durante todo o período experimental, com considerável liberação nas primeiras 24 horas, sendo que a maior liberação ocorreu até o quarto dia. Durante todo o experimento, o Vidrion R liberou significativamente mais fluoreto que a resina Filtek™ Z250 e que o selante Fluroshield®. Além disso, verificou-se uma tendência de estabilização na liberação de fluoreto do Vidrion R. O selante Embrace Wetbond™ liberou nas primeiras 24 horas a maior concentração de fluoreto dentre todos os materiais avaliados. Com relação ao selante Fluroshield®, observou-se maiores valores de liberação nos três primeiros dias. As figuras 15, 16, 17 e 18 apresentam as liberações de fluoreto em saliva artificial observadas nos diferentes materiais.

Figura 15 - Liberação diária de fluoreto em saliva artificial nos corpos de prova do selante Embrace Wetbond™.

Figura 16 - Liberação diária de fluoreto em saliva artificial nos corpos de prova do selante Fluroshield.

Figura 17 - Liberação diária de fluoreto em saliva artificial nos corpos de prova do cimento Vidrion R.

Figura 18 - Liberação diária de fluoreto em saliva artificial nos corpos de prova da resina composta Filtek Z250™.

A análise estatística evidenciou que inicialmente, o selante Embrace Wetbond™ apresentou o maior valor de liberação de fluoreto ($p > 0,05$) seguido pelo Vidrion R. O selante Fluroshield® apresentou valores iniciais mais baixos de liberação de fluoreto quando comparado ao Embrace Wetbond™ e ao Vidrion R ($p < 0,05$), enquanto que a resina Filtek™ Z250 apresentou valores praticamente desprezíveis ($p < 0,05$).

Os resultados da comparação da liberação de fluoreto em saliva artificial observada nos corpos de prova dos diferentes materiais estão apresentados na figura 19.

Figura 19 - Comparação da liberação de fluoreto em saliva artificial observada nos corpos de prova dos diferentes materiais. Letras diferentes refletem diferença estatisticamente significativa.

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados obtidos no estudo da atividade antimicrobiana, por meio do teste de difusão em ágar, estão apresentados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Diâmetro (em mm) dos halos de inibição do crescimento microbiano ocasionados pelos diferentes materiais

Repetição	Materiais									
	Fluroshield		Embrace		Vidrion R		Soro Fisiológico		Clorexidina	
	Smp	Sm	Smp	Sm	Smp	Sm	Smp	Sm	Smp	Sm
1	0	0	10	10	7	6	0	0	20	21
2	0	0	10	9	11	6	0	0	21	21
3	4	0	9	10	8	6	0	0	21	20
4	0	0	9	10	6	5	0	0	21	21
5	0	0	9	11	6	6	0	0	20	21

Smp: *Streptococcus mutans*: cepa padrão ATCC 25175
Sm: *Streptococcus mutans*: cepa de campo.

Tabela 14 – Média e desvio padrão da atividade antimicrobiana dos diferentes materiais

	Materiais									
	Fluroshield		Embrace		Vidrion R		Soro Fisiológico		Clorexidina	
	Smp	Sm	Smp	Sm	Smp	Sm	Smp	Sm	Smp	Sm
Média	0,8	0	9,4	10	7,6	5,8	0	0	20,6	20,8
Desvio Padrão	1,788854	0	0,547723	0,707107	2,073644	0,447214	0	0	0,547723	0,447214

Smp: *Streptococcus mutans*: cepa padrão ATCC 25175

Sm: *Streptococcus mutans*: cepa de campo.

A figura 20 apresenta a comparação dos halos de inibição de crescimento microbiano, em mm, frente à 2 cepas de microrganismos (*Streptococcus mutans*: cepa padrão da ATCC 25175 e *Streptococcus mutans*: cepa de campo, originária da cavidade bucal), observados com os diferentes materiais (Embrace Wetbond™, Fluroshield®, Vidrion R, Digluconato de Clorexidina a 1% e soro fisiológico).

Figura 20 - Comparação dos halos de inibição, em mm, observados nos diferentes materiais, frente a 2 cepas de microrganismos. Letras diferentes refletem diferença estatisticamente significante.

Smp: *Streptococcus mutans*: cepa padrão da ATCC 25175

Sm: *Streptococcus mutans*: cepa de campo, originária da cavidade bucal.

Comparando-se os cinco materiais e as duas cepas bacterianas estudadas, observou-se maior atividade antimicrobiana para a clorexidina ($p < 0,05$). O Embrace Wetbond™ e o Vidrion R não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). No entanto, quando comparou-se esses materiais com o Fluroshield® e com o soro

fisiológico, observou-se diferença significativa ($p < 0.05$), os quais apresentaram os piores resultados e foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). O tipo de cepa bacteriana, padrão ou de campo, não influenciou a atividade antimicrobiana dos materiais avaliados.

4.5 DOSAGEM DE BISFENOL A

Pelo modo positivo, o íon pode ser encontrado isolado (pela dissociação em hidrogênio e hidroxila), como próton (protonado +1) ou associado ao sódio (+23) ou ao potássio (+39), ambos últimos conhecidos como modo “adulto”.

Pelas fórmulas moleculares, tanto o bisfenol A quanto o Bis-GMA, apresentam massas baixas. No selante Embrace Wetbond™ não foi detectada a presença de bisfenol A, nem de Bis-GMA. Em contrapartida, no selante Fluroshield® não foi detectado o bisfenol A, porém foi encontrado o Bis-GMA associado ao sódio (5352389), que contém bisfenol A.

As figuras 21, 22, 23, 24, 25 e 26 apresentam os espectros de dosagem do bisfenol A e do Bis-GMA observados nas amostras dos selantes Embrace Wetbond™ e Fluroshield®.

Figura 21 - Espectro do Embrace Wetbond™ na primeira repetição do experimento.

Figura 22 - Espectro do Embrace Wetbond™ na segunda repetição do experimento.

Figura 23 - Espectro do Embrace Wetbond™ na terceira repetição do experimento.

Figura 24 - Espectro do Fluroshield® na primeira repetição do experimento.

Figura 25 - Espectro do Fluroshield® na segunda repetição do experimento.

Figura 26 - Espectro do Fluroshield® na terceira repetição do experimento.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento rápido e constante dos materiais odontológicos que vem ocorrendo nas últimas décadas, muitas vezes faz com que esses sejam introduzidos precocemente no comércio especializado, antes mesmo de serem avaliados em diferentes níveis de pesquisa. Embora inúmeros trabalhos tenham sido publicados, nos últimos anos, avaliando os selantes de fossas e fissuras (Low et al., 1975; O'Brien et al., 1987; Cooley et al., 1990; Forsten, 1990; Mejare e Mjor, 1990; Hatibovic-Kofman e Koch, 1991; Borem e Feigal, 1994; Botha et al., 1994; Vijayaraghavan et al., 1995; Loyola-Rodriguez e Garcia-Godoy et al., 1996; Rock et al., 1996; Waggoner e Siegal, 1996; Garcia-Godoy et al., 1997; Grande et al., 1998; Dhar e Tandon, 1999; Tulunoglu et al., 1999; Hebling e Feigal, 2000; Kozai et al., 2000; Morphis et al., 2000; Pulgar et al., 2000; Brock et al., 2001; Fuks et al., 2002; Simonsen, 2002; Duangthip e Lussi, 2003; Matalon et al., 2003; Borsatto et al., 2004; Duangthip e Lussi, 2004; Rajtboriraks et al., 2004; Zuanon, 2004; Alonso et al., 2005; Barroso et al., 2005; Eminkahyagil et al., 2005; Knobloch et al., 2005; Lobo et al., 2005; Perdigão et al., 2005; Torres et al., 2005; Al-Hiyasat e Darmani, 2006; Al-Sarheed, 2006a; Al-Sarheed, 2006b; de Alexandre et al., 2006; Francescut e Lussi, 2006; Joskow et al., 2006; Kantovitz et al., 2006; Owens e Johnson, 2006; Ashwin e Arathi, 2007; Borsatto et al., 2007; Celiberti e Lussi, 2007; Hevinga et al., 2007; Kavaloglu Cildir e Sandalli, 2007; Menon Preetha et al., 2007; Ramires-Romito et al., 2007; Salar et al., 2007; Selecman et al., 2007; Shah et al., 2007; Shen et al., 2007; Amim, 2008; Asselin et al., 2008; Azarpazhooh e Main, 2008; Askarizadeh et al., 2008; dos Santos et al., 2008; Gomes-Silva et al., 2008; Hevinga et al., 2008; Jodkowska et al., 2008; Lepri et al., 2008; O'Donnell, 2008; Yamada et al., 2008; Beauchamp et al., 2009; Berger et al., 2009; Bonifácio et al., 2009; Burcak Cehreli et al., 2009; Dukic et al., 2009; Griffin et al., 2009; Hoffman, 2009; Kolavic Gray et al., 2009; Marks et al., 2009; Wadenya et al., 2009; Yue et al., 2009), o selante Embrace Wetbond™, lançado recentemente, foi avaliado em um número reduzido de estudos (Bürgers et al., 2009; Kane et al., 2009) .

Esses poucos estudos publicados sobre o selante Embrace Wetbond™ enfocaram *in vitro* propriedades como adesão microbiana sobre sua superfície (Bürgers et al., 2009) e a sua adaptação e penetração nas fossas e fissuras (Kane et al., 2009). Em função desse pequeno número de trabalhos publicados sobre o Embrace Wetbond™ a comparação com os resultados obtidos no presente estudo torna-se impossibilitada.

5.1 DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS

Os resultados do teste de resistência ao cisalhamento, observados no selante Fluroshield® (média de 20,93 MPa), em ausência de contaminação por umidade, estão de acordo com Alonso et al. (2005), que compararam diferentes selantes de fossas e fissuras e materiais restauradores, empregados na Odontologia minimamente invasiva, no esmalte dental humano e encontraram os maiores valores de resistência ao cisalhamento para o selante Fluroshield® ($25,92 \pm 8,83$ MPa).

Os resultados de resistência ao cisalhamento do presente estudo também concordam com os achados de Barroso et al. (2005) onde, na ausência de contaminação salivar, o selante Fluroshield® apresentou alta resistência ao cisalhamento ($12,39 \pm 4,34$ MPa), estatisticamente significante quando comparada ao Clinpro.

A retenção do selante é dependente da qualidade da sua adesão ao esmalte condicionado. Essa retenção é frequentemente avaliada em nível laboratorial pelo teste de resistência ao cisalhamento (Fuks et al., 2002), que é considerado confiável e eficiente na realização de estudos comparativos para a determinação da adesividade dos materiais à estrutura dental (Vijayaraghavan et al., 1995; Alonso et al., 2005).

As forças na interface entre o material e a estrutura dental não são uniformes e são altamente dependentes da configuração da carga aplicada e dos parâmetros empregados no teste de resistência ao cisalhamento (Knobloch et al., 2005). Neste estudo, todos os espécimes foram submetidos aos testes de resistência ao cisalhamento, com uma velocidade de 0,5 mm/min e célula de carga de 50 Kgf, valores estes, empregados na maioria dos trabalhos e compatíveis com a estrutura dental e com os materiais utilizados (Alonso et al., 2005; Barroso et al., 2005; knobloch et al., 2005; Torres et al., 2005; Al-Sarheed, 2006; Gomes-Silva et al., 2008; Lepri et al., 2008).

Estudos têm mostrado que a resistência ao cisalhamento entre o selante e a superfície do esmalte contaminada com umidade ou saliva humana diminui drasticamente (Tulunoglu et al., 1999; Barroso et al., 2005; Torres et al., 2005; Gomes-Silva et al., 2008; Lepri et al., 2008). Esses resultados estão de acordo com o presente estudo, em que a adesão ao esmalte contaminado com saliva (média de 16,19 MPa) e umidade (média de 1,216 MPa) foi marcadamente inferior à registrada sob condições de não contaminação para o selante Fluroshield® (média de 20,93 MPa). Estes dados são coerentes, visto que o selante Fluroshield® é um material resinoso, de natureza hidrofóbica e que apresenta comportamento insatisfatório em presença de umidade. Tal

situação pode ser explicada pelo fato de que a retenção dos selantes é um processo micromecânico estabelecido pela infiltração e polimerização do selante na rede de microporosidades criada pelo condicionamento ácido da superfície do esmalte. Devido à alta reatividade do esmalte, induzida pelo condicionamento ácido, mesmo exposições de um segundo a saliva são consideradas suficientes para criar uma película que oclui os microporos. Isso leva a uma alteração ultraestrutural na morfologia do esmalte condicionado que impede a formação adequada dos *tags* ou prolongamentos do selante responsáveis pela adesão mecânica. Consequentemente, quando a formação dos *tags* é afetada pelo contato inadvertido com saliva ou umidade durante o procedimento de selamento, pobre adesão e falhas no selante devem ser esperadas (Barroso et al., 2005; Borsatto e Assed, 2005; Palma-Dibb et al., 2005; Torres et al., 2005).

No presente estudo, foram avaliadas duas condições de contaminação com umidade: saliva e água. A saliva foi escolhida para simular uma situação clínica de contaminação no ambiente da cavidade bucal, que poderia ocorrer na impossibilidade do uso de isolamento absoluto. Nessa situação, após a contaminação com saliva foi efetuada a secagem de elemento dental com jato de ar, até a obtenção de aspecto branco opaco, previamente à aplicação do selante.

Por outro lado, a água foi escolhida tendo em vista que o fabricante do selante Embrace Wetbond™ preconiza que, após o condicionamento ácido, o material seja aplicado sobre a superfície dental ligeiramente úmida. Esse fato pode explicar a observação de valores inferiores de resistência ao cisalhamento após contaminação com água (média de 1,216 MPa) no selante Fluroshield® pois, do ponto de vista clínico, quando emprega-se esse material não é indicada a manutenção de umidade na superfície dental.

Já o selante Embrace Wetbond™ apresentou resultados semelhantes quando aplicado convencionalmente (superfície dental seca) (média de 7,730 MPa) e em condições de contaminação com água (média de 7,902 MPa), o que está de acordo com o fabricante, que preconiza a utilização deste material em condições de umidade, alegando ser este um composto hidrofílico. Apesar do selante Embrace Wetbond™ ter apresentado valores de resistência ao cisalhamento inferiores após contaminação com água (média de 7,902 MPa), esse valor foi relativamente próximo ao mínimo aceitável para que um selante se comporte bem do ponto de vista clínico (8 a 10 MPa) (Grandhi et al., 2001; Tortamano et al., 2002; Cacciafesta et al., 2003).

Segundo Kane et al. (2009) o selante Embrace incorpora monômeros acrilatos di, tri e multi-funcionais em uma rede ácida integrada, que é ativada pela umidade. Por essa razão é recomendado o seu uso em superfícies dentais levemente úmidas. Quando ativado, o material é ácido e quando polimerizado não é afetado pela água. Apresenta pH neutro e baixa solubilidade em água. Devido à ausência de bisfenol A, o selante pode apresentar menor contração de polimerização.

Em relação à contaminação por saliva, o selante Embrace Wetbond™ apresentou resultados inferiores à aplicação convencional e em condições de contaminação com água (média de 4,520 MPa), o que pode ser explicado pela composição química da saliva, a qual pode ter interferido com a adesão desse selante à superfície do esmalte. Estudos adicionais são necessários para esclarecer as razões dessas diferenças.

Os materiais odontológicos utilizados como selantes de fossas de fissuras devem preencher uma série de requisitos para que possam ser aplicados clinicamente. Uma das propriedades destes materiais que devem ser avaliadas é o vedamento marginal. Apesar do grande desenvolvimento dos materiais odontológicos, nem mesmo os selantes mais modernos conseguiram eliminar a microinfiltração.

Para a avaliação da microinfiltração no presente estudo, foi utilizado o método de coloração pela solução aquosa de Rodamina B a 0,2%, a qual é capaz de detectar a microinfiltração ao redor dos selantes, pois apresenta como vantagens a sensibilidade à luz ultravioleta, facilidade de fotografar, promoção de resultados reprodutíveis, baixo custo, contraste instantâneo com a fluorescência natural do dente, necessidade de pequenos períodos de imersão e observação direta da margem total da interface durante a avaliação e mensuração da microinfiltração marginal (Borsatto et al., 2004; Yamada et al., 2008).

Por outro lado, a confiabilidade dos testes de microinfiltração pela técnica de penetração do corante tem sido questionada. Segundo Shah et al. (2007), a penetração do corante sugere incapacidade do selante no adequado selamento na interface dente/selante, o que poderia ser considerada uma falha desse material. No entanto, a microinfiltração ocorre na maioria dos dentes selados, porém os selantes exibem altos índices e longos períodos de retenção, o que leva ao questionamento se a avaliação da microinfiltração pode ser considerada um método apropriado para avaliar a efetividade do material. (Shah et al., 2007).

Segundo Borem e Feigal (1994) existe diferença entre a microinfiltração e a infiltração do corante pela qual a microinfiltração é mensurada. A microinfiltração

propriamente dita refere-se à penetração de bactérias, íons, fluidos e substâncias que tenham um diâmetro de até 5 µm. Como os corantes usados para avaliar a microinfiltração possuem diâmetro muito menor, consequentemente a penetração do corante tende a ser um teste confiável para a avaliação da microinfiltração.

No presente estudo, o selante Fluroshield® não apresentou microinfiltração, quando aplicado em ausência de umidade, como preconizado pelo fabricante. Esses resultados são concordantes com o trabalho de Borsatto et al. (2004), que observaram microinfiltração nula após a utilização do Fluroshield® em condições secas.

No entanto, o selante Embrace Wetbond™, quando aplicado em condições secas, ou seja, não respeitando as instruções do fabricante, apresentou resultados insatisfatórios com relação à microinfiltração (média de 87,96%). Assim, verifica-se que o referido selante não deve ser aplicado nessas condições.

No presente estudo, em condições de umidade, o selante Fluroshield® apresentou maior microinfiltração que em condições secas, o que está de acordo com a literatura (Grande et al., 1999; Borsatto et al., 2004).

Por outro lado, o selante Embrace Wetbond™ apresentou microinfiltração elevada em todas as condições experimentais (condições secas e após contaminação com saliva e água). Apesar desse selante ter sido desenvolvido para ser utilizado em presença de umidade, com relação à microinfiltração esse material apresentou resultados desfavoráveis, também nessas condições.

Os resultados apresentados por diversos estudos têm mostrado que a microinfiltração na interface selante/esmalte contaminado com umidade, plasma humano ou saliva humana aumenta significativamente (Borem e Feigal, 1994; Grande et al., 1998; Tulunoglu et al., 1999; Hebling e Feigal, 2000; Duangthip e Lussi, 2003; Borsatto et al., 2004; Duangthip e Lussi, 2004; Hevinga et al., 2007; Askarizadeh et al., 2008). Esses resultados estão de acordo com o presente estudo, em que a microinfiltração na interface selante/esmalte contaminado com saliva (média de 15,68%) e água (100%) foi significativamente superior à registrada sob condições de não contaminação para o selante Fluroshield®.

Vários fatores podem explicar a ocorrência da microinfiltração. Dentre esses fatores, observa-se que a pequena quantidade de partículas inorgânicas, presente nos selantes, leva a um aumento nas alterações térmicas dimensionais. A microinfiltração resulta da diferença entre o coeficiente de expansão térmica do dente e do material e da

contração promovida durante a polimerização, pois forças geradas durante o processo de contração tendem a provocar o deslocamento total ou parcial do selante (Hebling e Feigal, 2000). Segundo Marks et al. (2009) a microinfiltração ocorre, a curto prazo, pela conversão de um monômero de baixa viscosidade em uma matriz de polímero e, a longo prazo, pela contração de polimerização.

A localização e o ângulo de corte das secções dentais também podem influenciar a avaliação da microinfiltração (Asselin et al., 2008). Por essa razão, no presente estudo, foram obtidas quatro secções de cada espécime, para permitir a mensuração da microinfiltração em toda a sua extensão (Borsatto et al., 2004). Outra condição que pode interferir nos resultados é a alteração térmica sofrida pelos dentes durante a mastigação. Para controlar tal condição, no presente estudo foi realizada a termociclagem dos espécimes (Borsatto et al., 2004; Selecman et al., 2007; Bonifácio et al., 2009), para reproduzir as condições bucais.

Com relação à resistência ao cisalhamento e à microinfiltração, os resultados do presente estudo permitiram evidenciar que, de forma geral, o selante Embrace Wetbond™ apresentou pior desempenho, quando comparado ao selante Fluroshield®. Assim, verifica-se a necessidade de alterações na formulação do Embrace Wetbond™, a fim de melhorar suas propriedades mecânicas, principalmente a microinfiltração, tendo em vista que a resistência ao cisalhamento, apesar de baixa, foi próxima ao mínimo necessário para um adequado desempenho clínico.

5.2 DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E ANTIMICROBIANAS

Tendo em vista que o fluoreto é mundialmente reconhecido por sua atividade anticariogênica e remineralizadora (Loyola-Rodriguez e Garcia-Godoy, 1996; Garcia-Godoy et al., 1997), torna-se importante a sua incorporação em materiais odontológicos e o estudo de sua liberação *in vitro* e *in vivo*.

No presente estudo, a liberação de fluoreto foi efetuada *in vitro* de acordo com duas metodologias: liberação em água aquecida e liberação em saliva artificial. A liberação em água foi realizada com os materiais não polimerizados, a fim de verificar se esses apresentavam fluoreto, enquanto que a liberação em saliva foi efetuada após polimerização, a fim de verificar a cinética da liberação de fluoreto na saliva em função do tempo, simulando as condições da cavidade bucal.

Foi observada maior liberação de fluoreto em água e em saliva artificial no selante Embrace Wetbond™ quando comparado ao Fluroshield® ($p>0,05$).

Alguns estudos publicados na literatura específica avaliaram a liberação de fluoreto de selantes de fossas e fissuras (Forsten, 1990; Rock et al., 1996; Garcia-Godoy et al., 1997; Lobo et al., 2005; Kantovitz et al., 2006; Kavaloglu Cildir e Sandalli, 2007; Salar et al., 2007; Shen et al., 2007) e, particularmente, do selante Fluroshield® (Cooley et al., 1990; Rock et al., 1996; Garcia-Godoy et al., 1997; Kantovitz et al., 2006; Shen et al., 2007). Nesses estudos, o Fluroshield® apresentou pequena liberação de fluoreto em água ou em saliva, o que está de acordo com os resultados do presente estudo.

A resina composta apresentou quantidade insignificante de fluoreto liberado, o que está de acordo com diversos estudos (Forsten, 1990; Loyola-Rodriguez e Garcia-Godoy, 1996; Rock et al., 1996; Garcia-Godoy et al., 1997; Lobo et al., 2005; Kavaloglu Cildir e Sandalli, 2007; Carvalho et al., 2009). Tal fato pode ser explicado pela composição química da resina Filtek Z250™, a qual não apresenta a incorporação de fluoreto.

De acordo com os resultados obtidos no estudo de saliva artificial, pôde-se observar que todos os materiais avaliados, exceto a resina composta, apresentaram liberação de fluoreto, sendo esta marcadamente maior nas primeiras horas, decaindo acentuadamente e tendendo a uma estabilização a partir do terceiro dia. Esse padrão de liberação de fluoreto foi semelhante para todos os materiais e coerente com a literatura consultada (Cooley et al., 1990; Forsten, 1990; Rock et al., 1996; Garcia-Godoy et al., 1997).

Observou-se uma liberação inicial acentuada nas primeiras horas chamada "efeito explosão" (Cooley et al., 1990). Em seguida, para todos os materiais, verificou-se uma queda brusca nas taxas de liberação. Somente o Vidrion R liberou valores mensuráveis de fluoreto durante todo o período do experimento, concordando com Hatibovic-Kofman e Koch (1991), que evidenciaram aumento da concentração de fluoreto na saliva durante um ano, após a aplicação do ionômero de vidro.

Analisando-se o cimento de ionômero de vidro, verificou-se que a maior liberação nos períodos iniciais após a mistura pode ser explicada pelo fato de que a reação de endurecimento se processa de maneira gradual, sendo dividida em dois estágios. No primeiro estágio, a movimentação iônica na massa é grande, facilitando a liberação de elementos ionicamente ativos, entre os quais o fluoreto. Sabe-se que os íons que são liberados dos cimentos de ionômero de vidro durante a reação de endurecimento (incluindo o fluoreto) não são elementos formadores da matriz do cimento e, portanto, sua liberação não corresponde à degradação do material (Deschepper et al., 1991).

No presente estudo, observou-se *in vitro* a gradual liberação de fluoreto que ocorre nos cimentos à base de ionômero de vidro convencional, em solução. Pôde-se

observar que, no intervalo de tempo analisado, o cimento Vidrion R liberou significativamente mais fluoreto que a resina composta Filtek Z250TM e que o selante Fluroshield[®]. Esse padrão de liberação de fluoreto também foi encontrado na literatura consultada, incluindo os estudos que avaliaram a liberação do selante Fluroshield[®], nos quais pôde-se observar menor liberação de fluoreto neste selante, quando comparado com cimentos ionoméricos (Cooley et al., 1990; Rock et al., 1996; Garcia-Godoy et al., 1997; Kantovitz et al., 2006; Shen et al., 2007).

Garcia-Godoy et al. (1997) compararam a quantidade e o padrão da liberação de fluoreto dos selantes de fossas e fissuras com fluoreto em sua composição (Fluroshield[®], HeliOSEAL-F, Ultraseal XT, Baritone L3 e Teethmate-F), durante trinta dias consecutivos, verificando que todos os selantes liberaram fluoreto em maior quantidade nas primeiras 24 horas após a manipulação, reduzindo drasticamente no segundo dia e diminuindo lentamente nos demais dias. Esse padrão de liberação está de acordo com o observado no presente estudo.

Os selantes resinosos apresentam alta liberação de fluoreto nas primeiras horas após sua aplicação, sofrendo um declínio acentuado depois deste período, ao contrário dos materiais ionoméricos, que apresentam liberação lenta e contínua de fluoreto por períodos de até um ano após terem sido aplicados (Loyola-Rodriguez e Garcia-Godoy, 1996; Garcia-Godoy et al., 1997). Esse fato foi observado também no presente estudo.

A simples presença de fluoreto na composição de um material não indica a sua capacidade de interferir com o desenvolvimento de lesões de cárie no esmalte, porém a liberação do fluoreto é fundamental para garantir a capacidade remineralizadora do material. A difusão da água no material é necessária para a formação de íons hidrogênio que atacam as partículas e liberam fluoreto (Kantovitz et al., 2006). Essa difusão ocorre nos materiais ionoméricos, porém não está presente nos resinosos, que são hidrofóbicos. Por essa razão os selantes resinosos apresentam liberação alta nas primeiras horas e o ionômero de vidro apresenta liberação lenta e contínua por longos períodos.

Deve-se salientar que não há estudos publicados, até o momento, avaliando a liberação de fluoreto no selante Embrace WetbondTM. De acordo com os resultados do presente estudo, esse material liberou significativamente mais fluoreto em saliva artificial que o Fluroshield[®], sem diferenças quando comparado ao Vidrion R, o que poderia oferecer vantagens do ponto de vista clínico.

Apesar da superfície oclusal totalizar apenas 12,5% de toda a superfície dental, essa superfície desenvolve mais de 2/3 de todas as lesões de cárie em crianças (Matalon

et al., 2003; Menon Preetha et al., 2007). O diagnóstico clínico de lesões de cárie incipientes em dentes posteriores é difícil de ser realizado pela profundidade, largura e complexidade das fossas e fissuras. Consequentemente, essas lesões podem permanecer não detectáveis e serem inadvertidamente seladas. Assim, selantes com propriedades antimicrobianas podem proporcionar uma proteção adicional contra a colonização bacteriana, o desenvolvimento de lesões de cárie e a deterioração da adesão na interface dente/selante (Bürgers et al., 2009).

A atividade antibacteriana é vantajosa imediatamente após a aplicação do selante, uma vez que a eliminação completa dos microrganismos das fissuras não pode ser assegurada e, também, a longo prazo, pois pode prevenir lesões de cárie secundárias (Matalon et al., 2003).

Neste sentido, torna-se importante a avaliação da atividade antimicrobiana dos selantes de fossas e fissuras. Segundo Menon Preetha et al. (2007), a avaliação da atividade antimicrobiana de selantes pode ser realizada por meio do teste de difusão em ágar, pois o selante aplicado no dente pode exercer atividade antimicrobiana pelo contato direto com os microrganismos, por difusão.

No presente estudo, o selante Embrace Wetbond™ apresentou valores de atividade antimicrobiana estatisticamente superiores ao selante Fluroshield®, e semelhantes ao Vidrion R, o qual apresenta elevada atividade antimicrobiana (da Silva et al., 2007). Essa maior atividade antimicrobiana do selante Embrace Wetbond™, em comparação ao Fluroshield® pode estar associada aos valores superiores de liberação tanto aquosa quanto em saliva artificial de fluoreto ocorrida no Embrace Wetbond™.

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana, observados no selante Fluroshield® (média de 0,8 para *Streptococcus mutans* cepa padrão ATCC e 0 para cepa de campo), estão de acordo com Carvalho et al. (2009), que compararam o Fluroshield® com o Clearfil Protect Bond, associados ou não à irradiação gama e observaram que o selante Fluroshield® apresentou atividade antimicrobiana nula quando empregado sem a irradiação gama sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

No presente estudo, foi efetuada também a investigação da presença de bisfenol A nos selantes Fluroshield® e Embrace Wetbond™, por meio de espectrometria de massas. Não foi detectada a presença de bisfenol A, nem de Bis-GMA no selante Embrace Wetbond™. Em contrapartida, no selante Fluroshield® não foi detectado o bisfenol A, porém foi encontrado o Bis-GMA, o que está de acordo com as especificações dos fabricantes, em relação à composição química dos produtos estudados.

Diversas técnicas têm sido propostas para a detecção de íons moleculares em substâncias e materiais. Dentre as mais utilizadas está a espectrometria de massas por *electrospray*, uma alternativa bastante conveniente para estudos de geração de íons a partir de compostos pouco voláteis presentes em fase líquida, pois apresenta como vantagem a preservação dos íons originais. Essa técnica está presente na indústria farmacêutica, desde a pesquisa de novos medicamentos e formulações até o controle da qualidade (Moraes e Lago, 2003; Crotti et al., 2006).

As condições de polimerização, as variações do pH e a agressividade das soluções utilizadas exercem influência na liberação dos componentes dos materiais resinosos, inclusive do bisfenol A (Pulgar et al., 2000). A polimerização dos materiais resinosos nunca é completa. Monômeros residuais não polimerizados são liberados na biofase bucal e tornam-se disponíveis para serem metabolizados pelas esterases e outras enzimas. As doses de 25 e 100µg/Kg correspondem à metade e ao dobro da quantidade máxima de monômero liberada uma hora após a aplicação de um selante na cavidade bucal de uma criança, respectivamente. Ainda não está comprovado se os efeitos tóxicos são devido ao Bis-GMA, impurezas como o bisfenol A ou produtos de degradação, formados no ambiente biológico como o bishidroxipropoxifenilpropano (Al-Hiyasat e Darmani, 2006).

Os fetos, bebês e crianças são mais susceptíveis aos efeitos estrogênicos do bisfenol A devido ao tamanho reduzido do corpo e à capacidade limitada de metabolismo. Diversas substâncias químicas, entre elas o bisfenol A, podem provocar mudanças epigenéticas, que constituem as alterações que modificam a expressão de um gene sem alterar a sequência genética do DNA e explicam porque organismos expostos ao bisfenol A podem desenvolver problemas após longos períodos de tempo em que esta substância tenha sido eliminada. A exposição a agentes químicos com alteração na atividade do sistema endócrino durante os estágios críticos de diferenciação pode ter consequências permanentes à longo prazo (Takai et al., 2001).

A exposição sistêmica ao bisfenol A pode ocasionar vários fenômenos biológicos, pela ação estrogênica dos polímeros que ocorre devido a uma ligação competitiva das moléculas poliméricas semelhantes ao estrogênio, tal como o bisfenol A aos receptores hormonais naturais (Eliades et al., 2007).

O bisfenol A é usado como material bruto para a formação do Bis-GMA e sua ação estrogênica está confinada às moléculas com duplo anel benzóico. O complexo desgaste mecânico e químico que ocorre no ambiente intrabucal, por meio da ação de enzimas como as esterases, induz a degradação dos selantes e restaurações resinosas podendo o

bisfenol A ser absorvido sistematicamente pelo paciente, o que pode estar associado com uma evitável morbidade na população adulta (Rubin et al., 2001; Della Seta et al., 2006; Joskow et al., 2006; Kang et al., 2006; Eliades et al., 2007; Lang et al., 2008).

Entretanto, grande parte dos estudos têm sido realizada com ratos, cujos resultados podem não reproduzir o que ocorre em resposta ao bisfenol A em humanos. A circulação enterohepática do bisfenol A em ratos resulta num baixo nível de excreção, enquanto que o bisfenol A é rapidamente conjugado e excretado pelos humanos, devido à ausência da circulação enterohepática (Völkel et al., 2002). Além disso, as doses utilizadas nestes estudos costumam ser muito mais altas que a dose máxima aceitável ou dose referência, o que não permite que os resultados sejam extrapolados para os humanos (Yoo et al., 2000; Soeborg et al., 2007).

Outro fator que influencia na exposição sistêmica estimada de um composto é a sua via de administração. A administração oral, que ocorre quando da aplicação de selantes de fossas e fissuras, resulta em baixa exposição sistêmica devido à possível degradação no trato gastrointestinal. A eliminação completa do bisfenol A, administrado via oral, ocorre 24 horas após a sua administração. A atividade metabólica também ocorre na pele, mas em pequenas frações, devido à limitação na absorção do epitélio. Já a administração endovenosa, comumente utilizada em experimentos com ratos, resulta em alta e rápida absorção (Völkel et al., 2002; Soeborg et al., 2007).

Na área Odontológica, apenas três trabalhos se preocuparam em avaliar a quantidade de bisfenol A em materiais resinosos (Pulgar et al., 2000; Joskow et al., 2006; Eliades et al., 2007), incluindo os selantes de fossas e fissuras (Pulgar et al., 2000; Joskow et al., 2006). Esses autores verificaram que os selantes de fossas e fissuras apresentaram baixos níveis de liberação de bisfenol A, tanto por meio da liberação *in vitro* dos materiais estudados, quanto pela dosagem na saliva, na urina e no sangue de humanos.

Apesar da quantidade de bisfenol A liberada na saliva, na urina e no sangue, após utilização clínica de selantes contendo esse composto ser reduzida, Azarpazhooh e Main (2008) recomendaram a adoção de medidas preventivas pelos cirurgiões-dentistas com o objetivo de reduzir a ingestão de resíduos de selantes não polimerizados pelos pacientes. Dentre essas medidas estão a realização de profilaxia com pedra-pomes e taça de borracha, limpeza da superfície do selante com algodão, bochecho com água pelo paciente durante 30s ou lavagem da superfície do selante com a seringa tríplice por 30s e sucção dos fluidos e resíduos da cavidade bucal com sugador de alta potência.

Em função do número reduzido de estudos avaliando os possíveis malefícios do uso de materiais resinosos contendo bisfenol A em Odontologia, o uso do selante Embrace Wetbond™, que evidenciou no presente estudo ausência desse composto químico em sua composição, poderia ser desejável.

Finalizando, deve-se salientar que os resultados do presente estudo *in vitro* não podem ser completamente extrapolados para as condições clínicas. Desse modo, estudos adicionais devem ser efetuados com o selante Embrace Wetbond™, para avaliar seu comportamento do ponto de vista clínico.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Considerando as condições específicas deste trabalho, com base nos resultados obtidos nas diferentes metodologias *in vitro* empregadas, pôde-se concluir que o selante Embrace Wetbond™:

1. Apresentou resistência ao cisalhamento próxima do mínimo aceitável e alta microinfiltração, quando utilizado de acordo com as indicações do fabricante, em condições de contaminação com umidade.
2. Apresentou elevada liberação de fluoreto, tanto em água aquecida, quanto em saliva artificial.
3. Apresentou elevada atividade antimicrobiana sobre cepas de *Streptococcus mutans* (cepa padrão ATCC 25175 e cepa de campo, originária da cavidade bucal).
4. Não apresentou liberação de bisfenol A, nem de Bis-GMA, em ensaio de espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- Alani AH, Toh CG. Detection of microleakage around dental restorations: A review. *Oper Dent*. 1997 Jul-Aug;22(4):173-85.
- Al-Hiyasat A, Darmani H. *In vivo* effects of BIS-GMA-a component of dental composite-on male mouse reproduction and fertility. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul;78(1):66-72.
- Alonso RC, Correr GM, Borges AF, Kantovitz KR, Rontani RM. Minimally invasive dentistry: bond strength of different sealant and filling materials to enamel. *Oral Health Prev Dent*. 2005;3(2):87-95.
- Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Rípoli C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts the pancreatic β -cell function *in vivo* and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect*. 2006 Jan;114(1):106-12.
- Al-Sarheed M. Bond strength of 4 sealants using conventional etch and a self-etching primer. *J Dent Child*. 2006a Jan-Apr;73(1):37-41.
- Al-Sarheed M. Evaluation of shear bond strength and SEM observation of all-in-one self-etching primer used for bonding of fissure sealants. *J Contemp Dent Pract*. 2006b May 1;7(2):9-16.
- Amin HE. Clinical and antibacterial effectiveness of three different sealant materials. *J Dent Hyg*. 2008 Oct;82(5):1-10.
- Azarpazhooh A, Main PA. Is there a risk of harm or toxicity in the placement of pit and fissure sealant materials? A systematic review. *J Can Dent Assoc*. 2008 Mar;74(2):179-83.
- Ashwin R, Arathi R. Comparative evaluation for microleakage between Fuji-VII glass ionomer cement and light-cured unfilled resin: A combined *in vivo in vitro* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2007 Apr-Jun;25(2):86-7.
- Askarizadeh N, Norouzi N, Nemati S. The effect of bonding agents on the microleakage of sealant following contamination with saliva. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2008 Apr-Jun;26(2):64-6.
- Asselin ME, Fortin D, Sitbon Y, Rompré PH. Marginal microleakage of a sealant applied to permanent enamel: evaluation of 3 application protocols. *Pediatr Dent*. 2008 Jan-Feb;30(1):29-33.
- Barroso JM, Torres CP, Lessa FC, Pécora JD, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Shear bond strength of pit-and-fissure sealants to saliva-contaminated and noncontaminated enamel. *J Dent Child*. 2005 Sep-Dec;72(3):95-9.
- Beauchamp J, Caufield PW, Crall JJ, Donly KJ, Feigal R, Gooch B, Ismail A, Kohn W, Siegal M, Simonsen R. Evidence-based clinical recommendations for the use of pit-and-fissure sealants: a report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *Dent Clin North Am*. 2009 Jan;53(1):131-47,x.
- Berger S, Goddon I, Chen CM, Senkel H, Hickel R, Stösser L, Heinrich-Weltzien R, Kühnisch J. Are pit and fissure sealants needed in children with a higher caries risk? *Clin Oral Investig*. 2009 Oct 2.

¹ Normas internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP (2009), de acordo com o International Committee of Medical Journals Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Medical Journal, 1997. Disponível em: <http://www.mja.com.au/public/information/uniform.html>. Acesso em setembro de 2009.

Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*. 2003 Jun 30;188(2-3):117-24.

Bodecker CF. The eradication of enamel fissures. *Dent Items*. 1929;51:859-66.

Bonifacio CC, Navarro RS, Sandenberg F, Imparato JC, de Carvalho RC, Raggio DP. Microleakage of an adhesive system used as a fissure sealant. *J Contemp Dent Pract*. 2009 Mar 1;10(2):26-33.

Borem LM, Feigal RJ. Reducing microleakage of sealants under salivary contamination: digital-image analysis evaluation. *Quintessence Int*. 1994 Apr;25(4):283-9.

Borsatto MC, Corona SAM, Alves APG, Chimello DT, Catirse ABE, Palma-Dibb RG. Influence of salivary contamination on marginal microleakage of pit and fissure sealants. *Am J Dent*. 2004 Oct;17(5):365-7.

Borsatto MC, Assed S. Selantes de fossas e fissuras. In: _____ Odontopediatria – Bases científicas para a prática clínica. São Paulo: Artes Médicas, 2005. cap.13, p.483-507.

Borsatto MC, Corona SA, de Araújo FP, de Souza-Gabriel AE, Pécora JD, Palma Dibb RG. Effect of Er:YAG laser on tensile bond strength of sealants in primary teeth. *J Dent Child (Chic)*. 2007 May-Aug;74(2):104-8.

Botha HF, Exner HV, Ferreira MR. Shear bond strength of a composite resin after delayed bonding to a polymerized dentine bonding system. *J Dent Assoc S Afr*. 1994 Jun;49(6):289-92.

Brock JW, Yoshimura Y, Barr JR. Measurement of bisphenol A levels in human urine. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2001;11:323-8.

Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of the male rats. *Toxicology*. 2003 Jun 30;188(2-3):117-24.

Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res*. 1955;34:849-53.

Burcak Cehreli S, Arikan S, Gulsahi K, Arhun N, Arman A, Sargon M. Effect of LED curing on marginal integrity of an ormocer-based sealant. *J Dent Child (Chic)*. 2009 Jan-Apr;76(1):53-7.

Bürgers R, Cariaga T, Müller R, Rosentritt M, Reischl U, Handel G, Hahnel S. Effects of aging on surface properties and adhesion of *Streptococcus mutans* on various fissure sealants. *Clin Oral Investig*. 2009 Dec;13(4):419-26.

Cacciafesta V, Sfondrini MF, Angelis M, Scribante A, Klersy C. Effect of water and saliva contamination on shear bond strength of brackets bonded with conventional, hydrophilic and self-etching primers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003 Jun;123(6):633-40.

Carvalho FG, Fucio SB, Pascon FM, Kantovitz KR, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. Effect of gamma irradiation on fluoride release and antibacterial activity of resin dental materials. *Braz Dent J*. 2009;20(2):122-6.

Celiberti P, Lussi A. Penetration ability and microleakage of a fissure sealant applied on artificial and natural enamel fissure caries. *J Dent*. 2007 Jan;35(1):59-67.

Cooley RL, McCourt JW, Huddleston AM, Casmedes HP. Evaluation of a fluoride-containing sealant by SEM, microleakage, and fluoride release. *Pediatr Dent*. 1990 Feb;12(1):38-42.

Council on Dental Materials and Devices. Council on Dental Therapeutics. Pit and fissure sealants. J Am Dent Assoc. 1971;82:1101-3.

Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Quím Nova. 2006 Mar/Abr;29(2):287-92.

Cueto EI, Buonocore MG. Sealing of pits and fissures with an adhesive resin: its use in caries prevention. J Am Dent Assoc. 1967;75(7):121-8.

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.

de Alexandre RS, Sundfeld RH, Briso AL, Bedran-Russo AK, Valentino TA, Sundfeld ML. Effect of 10% carbamide peroxide dental bleaching on microhardness of filled and unfilled sealant materials. J Esthet Restor Dent. 2006; 18(5):273-8; discussion 279.

Della Seta D, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. Horm Behav. 2006 Aug;50(2):301-7.

Deschepper EJ, Berr EA 3rd, Cailleteau JG, Tate WH. A comparative study of fluoride release from glass-ionomer cements. Quintessence Int. 1991 Mar;22(3):215-9.

Dhar V, Tandon S. Comparative analysis of tensile bond strength of two new fissure sealants using invasive and non-invasive techniques. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 1999 Jun;17(2):49-54.

dos Santos KT, Sundfeld RH, Garbin CA, de Alexandre RS, Sundfeld ML, Ceolim BN. Length of resin tags in pit-and-fissure sealants: all-in-one self-etching adhesive vs phosphoric acid etching. Compend Contin Educ Dent. 2008 Apr;29(3):186-92.

Duangthip D, Lussi A. Microleakage and penetration ability of resin sealant versus bonding system when applied following contamination. Pediatr Dent. 2003 Sep-Oct;25(5):505-11.

Duangthip D, Lussi A. Effects of application techniques and fissure types on the *in vitro* performance of two fissure sealants. Am J Dent. 2004 Apr;17(2):137-42.

Dukic W, Dukic OL, Milardovic S. The influence of healozone on microleakage and fissure penetration of different sealing materials. Coll Antropol. 2009 Mar;33(1):157-62.

Eliades T, Hiskia A, Eliades G, Athanasiou A. Assessment of bisphenol-A release from orthodontic adhesives. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2007 Jan;131(1):72-5.

Eminkahyagil N, Gokalp S, Korkmaz Y, Baseren M, Karabulut E. Sealant and composite bond strength to enamel with antibacterial/self-etching adhesives. Int J Paediatr Dent. 2005 Jul;15(4):274-81.

Evans T, Silverstone LM. The effect of salivary contamination *in vitro* on etched human enamel. J Dent Res 1981;60:621.

Forsten L. Short- and long-term fluoride release from glass ionomers and other fluoride-containing filling materials *in vitro*. Scand J Dent Res. 1990 Apr;98(2):179-85.

Francescut P, Lussi A. Performance of a conventional sealant and a flowable composite on minimally invasive prepared fissures. Operat Dent. 2006 Sep-Oct;31(5):543-50.

Frank MS, Ross Jr JW. Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science*. 1966;154(7):1553-5.

Fuks AB, Eidelman E, Lewinstein I. Shear strength of sealants placed with non-rinse conditioning compared to a conventional acid etch-rinse technique. *ASDC J Dent Child*. 2002 Sep-Dec;69(3):239-42.

Garcia-Godoy F, Abarzua I, De Goes MF, Chan DC. Fluoride release from fissure sealants. *J Clin Pediatr Dent*. 1997 Fall;22(1):45-9.

Gomes-Silva JM, Torres CP, Contente MM, Oliveira MA, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Bond strength of a pit-and-fissure sealant associated to etch-and-rinse and self-etching adhesive systems to saliva-contaminated enamel: individual vs simultaneous light curing. *Braz Dent J*. 2008;19(4):341-7.

Grande RH, Ballester R, Singer J da M, Santos JF. Microleakage of a universal adhesive used as a fissure sealant. *Am J Dent*. 1998 Jun;11(3):109-13.

Grandhi RK, Combe EC, Speidel TM. Shear bond strength of stainless steel orthodontic brackets with a moisture-insensitive primer. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001 Mar;119(3):251-5.

Griffin SO, Gray SK, Malvitz DM, Gooch BF. Caries risk in formerly sealed teeth. *J Am Dent Assoc*. 2009 Apr;140(4):415-23.

Hatibovic-Kofman S, Koch G. Fluoride release from glass ionomer cement *in vivo* and *in vitro*. *Swed Dent J*. 1991;15(6):253-8.

Hebling J, Feigal RJ. Use of one-bottle adhesive as an intermediate bonding layer to reduce sealant microleakage on saliva-contaminated enamel. *Am J Dent*. 2000 Aug;13(4):187-91.

Hevinga MA, Opdam NJM, Frencken JE, Bronkhorst EM, Truin GJ. Microleakage and sealant penetration in contaminated carious fissures. *J Dent*. 2007 Dec;35(12):909-14.

Hevinga MA, Opdam NJM, Frencken JE, Bronkhorst EM, Truin GJ. Can caries fissures be sealed as adequately as sound fissures? *J Dent Res*. 2008 May;87(5):495-8.

Hoffman I. A moisture tolerant, resin-based pit and fissure sealant. *Dental Tribune*. 2009 Dec:17A-8A

Hormati AA, Fuller JL, Denehy GE. Effects of contamination and mechanical disturbance on the quality of acid-etched enamel. *J Am Dent Assoc*. 1980;100:34-8.

Hyatt T P. Prophylactic odontotomy the cutting into the tooth for the prevention of disease. *Dent Cosmos*. 1923 Mar;65(3):234-41.

Jodkowska E. Efficacy of pit and fissure sealing – Long-term clinical observations. *Quintessence Int*. 2008 Jul-Aug;39(7):593-602.

Joskow R, Barr DB, Barr JR, Calafat AM, Needham LL, Rubin C. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc*. 2006 Mar;137(3):353-62.

Kane B, Karren J, Garcia-Godoy C, Garcia-Godoy F. Sealant adaptation and penetration into occlusal fissures. *Am J Dent*. 2009 Apr;22(2):89-91.

Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006 Sep 21;226(2-3):79-89.

Kantovitz KR, Pascon FM, Correr GM, Borges AF, Uchôa MN, Puppim-Rontani RM. Inhibition of mineral loss at the enamel/sealant interface of fissures sealed with fluoride- and non-fluoride containing dental materials *in vitro*. Acta Odontol Scand. 2006 Nov;64(6):376-83.

Kavaloglu Cildir S, Sandalli N. Compressive strength, surface roughness, fluoride release and recharge of four new fluoride-releasing fissure sealants. Dent Mater J. 2007 May;26(3):335-41.

Kidd EAM. Microleakage: a review. J Dent. 1976 Sep;4(5):199-206.

Klein H, Knutson NW. Studies on dental caries. XIII. Effect of ammoniacal silver nitrate on caries in the first permanent molar. J Am Dent Assoc. 1942 Aug;29(2):1420-6.

Knobloch LA, Meyer T, Kerby RE, Johnston W. Microleakage and bond strength of sealant to primary enamel comparing air abrasion and acid etch techniques. Pediatr Dent. 2005 Nov-Dec;27(6):463-9.

Kolavic Gray S, Griffin SO, Malvitz DM, Gooch BF. A comparison of the effects of toothbrushing and handpiece prophylaxis on retention of sealants. J Am Dent Assoc. 2009 Jan;140(1):38-46.

Kozai K, Susuki J, Okada M, Nagasaka N. *In vitro* study of antibacterial and antiadhesive activities of fluoride-containing light-cured fissure sealants and a glass ionomer liner/base against oral bacteria. ASDC J Dent Child. 2000 Mar-Apr;67(2):117-22.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. J Am Dent Assoc. 2008 Sep;300(11):1303-10.

Lepri TP, Souza-Gabriel AE, Atoui JA, Palma-Dibb RG, Pécora JD, Milori Corona SA. Shear bond strength of a sealant to contaminated-enamel surface: influence of erbium:yttrium-aluminum-garnet laser pretreatment. J Esthet Restor Dent. 2008; 20(6):386-92, discussion 394-4.

Lobo MM, Pecharki GD, Tengan C, da Silva DD, Tagliaferro EPS, Napimoga MH. Fluoride-releasing capacity and cariostatic effect provided by sealants. J Oral Sci. 2005 Mar;47(1):35-41.

Loyola-Rodriguez JP, Garcia-Godoy F. Antibacterial activity of fluoride release sealants on *mutans Streptococci*. J Clin Pediatr Dent. 1996 Winter;20(2):109-11.

Low T, Davies EH, von Fraunhofer JA. A method of determining the tensile bond strength of fissure sealant materials. J Oral Rehabil. 1975;2:341-47.

Marks D, Owens BM, Johnson WW. Effect of adhesive agent and fissure morphology on the *in vitro* microleakage and penetrability of pit and fissure sealants. Quintessence Int. 2009 Oct;40(9):763-72.

Matalon S, Slutzky H, Mazor Y, Weiss EI. Surface antibacterial properties of fissure sealants. Pediatr Dent. 2003 Jan-Feb;25(1):43-8.

Mejare I, Mjor IA. Glass ionomer cement and resin based fissure sealants: A clinical study. Scand J Dent Res. 1990 Aug;98(4):345-50.

Menon Preetha V, Shashikiran ND, Reddy VV. Comparison of antibacterial properties of two fluoride-releasing and a nonfluoride-releasing pit and fissure sealants. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2007 Jul-Sep;25(3):133-6.

Moraes MCB, Lago CL. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. Quím Nova. 2003 Jul/Ago;26(4):556-63.

Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov;87(11):5185-90.

Morphis TL, Toumba KJ, Lygidakis NA. Fluoride pit and fissure sealants: a review. *Int J Paediatr Dent.* 2000 Jun;10(2):90-8.

Newbrun E. Dental caries in the future: a global view. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88:155-61.

O'Brien JA 3rd, Retief DH, Bradley EL, Denys FR. Effects of saliva contamination and phosphoric acid composition on bond strength. *Dent Mater* 1987 Dec;3(6):296-302.

O'Donnell JP. A moisture tolerant, resin-based pit and fissure sealant: Research results. *Inside Dentistry* 2008 Jul/Aug:50-1.

Ooe H, Tkahiro T, Iguchi-Arigo SMM, Ariga H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A induced cell injury by DJ-I. *Toxicol Sci.* 2005 Nov;88(1):114-26.

Owens BM, Johnson WW. Effect of new generation surface sealants on the marginal permeability of class V resin composite restorations. *Operat Dent.* 2006 Jul-Aug;31(4):481-8.

Palanza P, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saad FS. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect.* 2002 Jun;110 Suppl 3:415-22.

Palma-Dibb RG, Borsatto MC, Ciccone JC. Dentística Operatória e Restauradora. In:_____Odontopediatria – Bases científicas para a prática clínica. São Paulo: Artes Médicas, 2005. cap.12, p.393-481.

Perdigão J, Fundingsland JW, Duarte S Jr, Lopes M. Microtensile adhesion of sealants to intact enamel. *Int J Paediatr Dent.* 2005 Sep;15(5):342-8.

Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N. Determination of Bisfenol A and related aromatic compounds released from Bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect.* 2000 Jan;108(1):21-7.

Quesada I, Fuentes E, Viso-León MC, Soria B, Rípoli C, Nadal A. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol A and the native hormone 17 β -estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J.* 2002 Oct;16(12):1671-3.

Rajtboriraks D, Nakornchai S, Bunditsing P, Surarit R, Iemjarern P. Plaque and saliva fluoride levels after placement of fluoride releasing pit and fissure sealants. *Pediatr Dent.* 2004 Jan-Feb;26(1):63-6.

Ramires-Romito AC, Reis A, Loguercio AD, Hipólito VD, de Goes MF, Singer JM, Grande RH. Microtensile bond strength of sealant and adhesive systems applied to occlusal primary enamel. *Am J Dent.* 2007 Apr;20(2):114-20.

Rock WP, Foulkes EE, Perry H, Smith AJ. A comparative study of fluoride-releasing composite resin and glass ionomer materials used as fissure sealants. *J Dent.* 1996 Jul;24(4):275-80.

Ropero AB, Alonso-Magdalena P, García-García E, Rípoli C, Fuentes E, Nadal A. Bisphenol A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl.* 2008 Apr;31(2):194-200.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect.* 2001 Jul;109(7):675-80.

Salama FS. Effect of laser pretreated enamel and dentin of primary teeth on microleakage of different restorative materials. *J Clin Pediatr Dent.* 1998 Summer;22(4):285-90.

Salar DV, Garcia-Godoy F, Flaitz CM, Hicks MJ. Potential inhibition of demineralization *in vitro* by fluoride-releasing sealants. *J Am Dent Assoc.* 2007 Apr;138(4):502-6.

Saskalauskaitė E, Tam LE, McComb D. Flexural strength, elastic modulus, and pH profile of self-etch resin luting cements. *J Prosthodont.* 2008 Jun;17(4):262-8.

Sasco AJ. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? *APMIS.* 2001;109(5):321-32.

Seleman JB, Owens BM, Johnson WW. Effect of preparation technique, fissure morphology, and material characteristics on the *in vitro* margin permeability and penetrability of pit and fissure sealants. *Pediatr Dent.* 2007 Jul-Aug;29(4):308-14.

Shah S, Roebuck EM, Nugent Z, Deery C. *In vitro* microleakage of a fissure sealant polymerized by either a quartz tungsten halogen curing light or a plasma arc curing light. *Int J Paediatr Dent.* 2007 Sep;17(5):371-7.

Shen C, Shokry TE, Anusavice KJ. Influence of pH and oxygen-inhibited layer on fluoride release properties of fluoride sealant. *J Dent.* 2007 Apr;35(4):275-81.

Simonsen RJ. Pit and fissure sealant: review of the literature. *Pediatr Dent.* 2002 Sep-Oct;24(5):393-414.

Söderholm KJ, Mariotti A. BIS-GMA-based resins in Dentistry: are they safe? *J Am Dent Assoc.* 1999 Feb;130(2):201-9.

Soeborg T, Basse LH, Halling-Sorensen B. Risk assessment of topically applied products. *Toxicology.* 2007 Jul 1;236(1-2):140-8.

Spadaro ACC. Estudo sobre a interferência de cátions e alguns compostos orgânicos na quantificação de fluoreto: aplicação em medicamentos de interesse odontológico. Ribeirão Preto, 1986, 99p, Tese de Livre-Docência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Takai Y, Tsutsumi O, Ikezaki Y, Kamei Y, Osuga Y, Yano T, Taketani Y. Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. *Reprod Toxicol.* 2001 Jan-Feb;15(1):71-4.

Taylor MJ, Lynch E. Microleakage. *J Dent.* 1992 Feb;20(1):3-10.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 May;102(19):7014-9.

Torres CP, Balbo P, Gomes-Silva JM, Ramos RP, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Effect of individual or simultaneous curing on sealant bond strength. *J Dent Child.* 2005 Jan-Apr;72(1):31-5.

Tortamano A, Vigorito JW, Nauff F, Garone GM, Santos RSC. Evaluation of the tensile strength of cementing agents of orthodontic brackets. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2002 Ago;56(4):259-63.

Trachtenberg F, Maserejian NN, Soncini JA, Hayes C, Tavares M. Does fluoride in compomers prevent future caries in children? J Dent Res. 2009 Mar;88(3):276-9.

Tulunoglu Ö, Bodur H, Üçtasli M, Alaçam A. The effect of bonding agents on the microleakage and bond strength of sealant in primary teeth. J Oral Rehabil. 1999 May;26(5):436-41.

Vijayaraghavan TV, Hsiao JY, Moss SJ. Evaluation of a no-rinse enamel conditioning prior to sealant application: an *in vitro* study of comparison to traditional etching technique. Pediatr Dent. 1995 Jul-Aug;17(4):301-4.

Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. Chem Res Toxicol. 2002 Oct;15(10):1281-7

Wadenya RO, Herrera M, Smith J, Mante F. Enamel bond strength of self-etch sealant with and without prior acid etching. N Y State Dent J. 2009 Mar;75(2):49-51.

Waggoner WF, Siegal M. Pit and fissure sealant application. Updating the technique. J Am Dent Assoc 1996 Mar;127(3):351-61

Wilson IP. Preventive Dentistry. Dental Diagnosis 1895;1:70-2.

Yamada Y, Hossain M, Shimizu Y, Kimura Y, Masuda Y, Nakamura Y, Matsumoto K. Analysis of surface roughness and microleakage of fissure sealants following organic debris removal with Carisolv. J Dent. 2008 Feb;36(2):130-7.

Yoo SD, Shin BS, Kwack SJ, Lee BM, Park KL, Han SY, Kim HS. Pharmacokinetic disposition and tissue distribution of bisphenol A in rats after intravenous administration. J Toxicol Environ Health A. 2000 Sep 29;61(2):131-9.

Yue C, Tantbirojn D, Grothe RL, Versluis A, Hodges JS, Feigal RJ. The depth of cure of clear versus opaque sealants as influenced by curing regimens. J Am Dent Assoc. 2009 Mar;140(3):331-8.

Zuanon ACC. Análise microscópica da penetração de um selante com carga em dentes decíduos em função do tempo de condicionamento ácido. Estudo *in vivo*. Rev Odontol UNESP. 1995;24(2):377-84.