

ISSN: 2317-3076 (on line)  
ISSN: 2317-3084 (print)

*Journal of Health and Biological Sciences*

# JHBS

*Revista de Saúde e Ciências Biológicas*

volume 7 - número 2 - abril/junho. 2019



# Journal of Health & Biological Sciences

---

JHBS

#### **Editor Geral**

Manoel Odorico de Moraes Filho, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

#### **Editor Executivo**

Luciano Pamplona de Goes Cavalcanti, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

#### **Editoras Especiais deste número**

Helláida V Chaves - Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus Sobral, CE, Brasil

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage - Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil

#### **Conselho Editorial**

Adriana Luchs, Instituto Adolfo Lutz

Albert Leyva, University of Missouri, Kansas City-Missouri, Estados Unidos

Andrea Caprara, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-Ce, Brasil

Antonio Carlos Barbosa da Silva, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Cesar Gomes Victora, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas-RS, Brasil

Cláudia Maria Costa de Oliveira, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Cristiane Vieira de Assis Pujol Luz, Universidade Católica de Brasília

Eliningaya J. Kweka, Tropical Pesticides Research Institute, Arusha, Tanzania

Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-Pe, Brasil

Eric Martínez Torres, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Havana, Cuba

Eric Sidebottom, University of Oxford, Oxford, Reino Unido

Fernando Mazzili Louzada, Universidade Federal do Paraná

Francisca Cléa Florenço de Sousa, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Francisco das Chagas Medeiros, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Francisco de Assis Aquino Gondim, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Gilda Maria Cabral Benaduce, Universidade Federal de Santa Maria

Jay McAuliffe, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, Estados Unidos

José Fernando Castanha Henriques. Universidade de São Paulo (USP), Bauru-SP, Brasil

José Wellington de Oliveira Lima, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-Ce, Brasil

Leticia Veras Costa Lotufo, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Luís Eduardo Coelho de Andrade, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil

Luís Varandas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Luiza Jane Eyre de Souza Vieira, Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza-Ce, Brasil

Maria da Glória Lima Cruz Teixeira, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador-Ba, Brasil

Maria Elisabete Amaral de Moraes, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Maria Helena Prado de Mello Jorge, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil

Martha Elisa Ferreira Almeida, Universidade Federal de Viçosa

Miguel Nasser Hissa, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Mitermayer Galvão dos Reis, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-Ba, Brasil

Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua-Pa, Brasil

Reinaldo Souza dos Santos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ, Brasil

Ricardo Reges Maia de Oliveira, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce, Brasil

Rivaldo Venâncio da Cunha, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande-MS, Brasil

Rodrigo de Aquino Castro, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo-SP, Brasil

Silvio Eder Dias da Silva, Faculdade de Enfermagem da UFPa

#### **Secretaria Editorial**

Dhanielle Sales Evangelista, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza-Ce, Brasil

#### **Normalização**

Dhanielle Sales Evangelista, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza-Ce, Brasil

Patrícia Vieira Costa, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza-Ce, Brasil

#### **Revisão**

Edson Alencar, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza-Ce, Brasil

Elzenir Coelho, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza-Ce, Brasil

Nilson Rodrigues, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza-Ce, Brasil

## Copyright

© 2018 by Centro Universitário Christus – Unichristus  
Journal of Health & Biological Sciences – JHBS  
ISSN (Impresso): 2317-3084 / ISSN (On-line): 2317-3076

**Tiragem / Printing:** 3.000 exemplares

**Journal of Health & Biological Sciences ISSN (Impresso): 2317-3084 / ISSN (On-line): 2317-3076, Brasil.**

O Centro Universitário Christus é responsável pela edição trimestral do JHBS, cujo objetivo é publicar trabalhos relacionados às Ciências da Saúde e Biológicas. É uma revista interdisciplinar e de acesso aberto, com periodicidade trimestral, disponível também na internet (<http://www.portalderevistas.fchristus.edu.br>).

O JHBS é distribuído gratuitamente para faculdades, hospitais, bibliotecas e para profissionais da área de saúde.

Seu título abreviado é J Health Biol Sci.

**Journal of Health & Biological Sciences ISSN (Print): 2317-3084 / ISSN (Online): 2317-3076, Brazil.**

The University Center Christus is responsible for editing the quarterly JHBS, whose goal is to publish papers related to Biological and Health Sciences. It's an interdisciplinary journal and open access, quarterly, also available on the Internet (<http://www.portalderevistas.fchristus.edu.br>).

The JHBS is distributed free to schools, hospitals, libraries and health professionals.

His title is abbreviated according to Index Medicus: J Health Biol Sci.

## EDITORA

Centro Universitário Christus – Unichristus  
Rua Vereador Paulo Mamede, 130. Cocó. Fortaleza – Ceará. Brasil.  
Tel.: +55 (85) 3265.8100.

## CORRESPONDÊNCIA

Journal of Health & Biological Sciences  
Rua: Vereador Paulo Mamede, 130. Cocó. Fortaleza - Ceará. Brasil.  
CEP: 60.192-350.  
Tel.: +55 (85) 3265 8109

## COPYRIGHT E FOTOCÓPIA

Qualquer parte desta publicação pode ser reproduzida, desde que citada a fonte.

## ACESSO ONLINE

<http://portalderevistas.fchristus.edu.br>

## PUBLISHER

University Center Christus – Unichristus  
Vereador Paulo Mamede St., #130. Cocó. Fortaleza – Ceará. Brazil.  
Tel.: +55 (85) 3265.8100.

## CORRESPONDENCE

Journal of Health & Biological Sciences  
Vereador Paulo Mamede St., #130. Cocó. Fortaleza - Ceará. Brasil.  
Zip Code: 60.192-350.  
Tel.: +55 (85) 3265 8109

## COPYRIGHT AND PHOTOCOPYING

Any part of this publication may be reproduced as long as the source is mentioned.

## ONLINE ACCESS

<http://portalderevistas.fchristus.edu.br>



## CRÉDITO DA IMAGEM DA CAPA

**Imagem da capa:** INSTRUMENTOS odontológicos. 2016. 1 imagem, color, 1000 x 667 pixels, 96dpi, 149 KB, formato JPEG. Disponível em: <http://www.apcd.org.br/index.php/noticias/352/21-11-2016/forp-usp-recebe-doacao-de-instrumentos-odontologicos>. Acesso em: 10 abr. 2019.

## SUMÁRIO / TABLE OF CONTENTS

### Artigo Original Original Article

- Antimicrobial action, pH, and tissue dissolution capacity of 2.5% sodium hypochlorite gel and solution.....121**  
Ação antimicrobiana, pH, e capacidade de dissolução tecidual de gel e solução de hipoclorito de sódio 2,5%  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2327.p121-125.2019  
Luciana Batista Luz, Ruth Santana, Amanda Prates, Julia Froehlich, Tiago André Fontoura de Melo, Francisco Montagner, Simone Bonato Luisi
- Gastric toxicity of Alendronate and Methotrexate in Walker 256 carcinosarcoma jaw model.....132**  
Toxicidade gástrica de Alendronato e Metotrexato em modelo de carcinossarcoma de Walker 256 em mandíbula  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2336.p126-132.2019  
Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Maria Elisa Quezado Lima Verde, Paulo Goberlânio de Barros Silva, Fabrício Bitu Sousa, Mário Rogério Lima Mota, Cláudia do Ó Pessoa, Letícia Veras Costa Lotufo, Manoel Odorico de Moraes-Filho
- Saliva contamination effects at different application steps on bond strength of total etch two-step adhesive .....133**  
Efeitos da contaminação por saliva em diferentes etapas de aplicação do sistema adesivo convencional de dois passos na resistência de união de restaurações adesivas  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2333.p133-138.2019  
Lidiane Costa de Souza, Nara Sousa Rodrigues, Elizeu Ytalo Pereira Aquino, Mary Anne Sampaio Melo, Diana Araújo Cunha, Vicente de Paulo Aragão Saboia
- Different Concentrations of Ethanol as Dentin Pre-treatment to Bonding of an Etch-and-rinse Adhesive.....139**  
Diferentes Concentrações de Etanol como Pré-Tratamento da Dentina na adesão de um Adesivo Convencional  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2326.p139-144.2019  
Francisco Cláudio Fernandes Alves e Silva, Vicente de Paulo Aragão Saboia
- Extraction and purification of RNA from human carious dentine: an approach to enable bacterial gene expression studies.....145**  
Extração e purificação de RNA proveniente de dentina humana cariada: uma abordagem para viabilizar estudos de expressão gênica  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2562.p145-151.2019  
Daniela da Silva Bezerra, Beatriz Gonçalves Neves, Sarah Florindo de Figueiredo Guedes, Wanessa Fernandes Matias Regis, Rafael Nóbrega Stipp, Lidiany Karla Azevedo Rodrigues
- Cárie dentária na América do Sul: realidade entre escolares do Brasil e Argentina.....152**  
Dental caries in South America: reality among schoolchildren from Brazil and Argentina  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2570.p152-158.2019  
Viviane Elisângela Gomes, Raquel Conceição Ferreira, Morgana Almeida Souza de Moraes, Loliza Luiz Figueiredo Houry Chalub, Marcela Inés Bella, Lila Susana Cornejo, Pablo Cristian Gigena, Patricia Verduci, Patrícia Maria de Araújo Pereira Zarzar, Isabela Almeida Pordeus, Andrea Maria Duarte Vargas, Efigênia Ferreira e Ferreira
- Avaliação da formação de smear layer no preparo químico mecânico realizado com solução ou gel de hipoclorito de sódio a 2,5%.....159**  
Evaluation of smear layer formation in mechanical chemical preparation performed with 2.5% sodium hypochlorite solution or gel  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7ix.2328.p159-165.2019  
Luciana Batista Luz, Ruth Marlene Campomanes Santana, Amanda Prates, Julia Froehlich, Tiago André Fontoura de Melo, Francisco Montagner, Simone Bonato Luisi
- Avaliação do conhecimento das famílias sobre a higienização bucal e o uso domiciliar de fluoretos em crianças de uma faculdade particular do Espírito Santo.....166**  
Evaluation of household knowledge about oral hygiene and home use of fluoride in children of a Private College in Espírito Santo  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2503.p166-171.2019  
Ive Barteli Camatta, Carolina Steiner-Oliveira
- Avaliação clínica, radiográfica e tomográfica de fraturas radiculares: série de casos.....172**  
Clinical, radiographic and tomographic evaluation of root fractures: case series  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2332.p172-176.2019  
Roberta Basañez Aleluia Costa, Ivson Wasley Fernandes Coelho, Fabíola Bastos de Carvalho, Iêda Crusóé-Rebello, Frederico Sampaio Neves
- Eficácia de diferentes processos de desinfecção em turbinas de alta rotação.....177**  
Effectiveness of different disinfection processes in high speed turbines  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2511.p177-181.2019  
Igor Alcântara, Renato Daniel de Freitas, Ludimila Gomes Pinheiro, Andrine Tavares Pereira Felipe, Pedro Diniz Rebouças, Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santo

## SUMÁRIO / TABLE OF CONTENTS

Artigo Original  
Original Article

- Ácido tânico como agente biomodificador de dentina.....182  
Tanic acid as biomodificator of collagen dentin  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2389.p182-186.2019  
Talita Arrais Daniel Mendes, Samuel Chillavert Dias Pascoal, Marcelo Victor Sidou Lemos, Sérgio Lima Santiago, Juliano Sartori Mendonça
- Influência de soluções irrigadoras e de materiais obturadores na infiltração apical – análise pelo método de filtração de fluidos.....187  
Influence of irrigating solutions and of root filling materials on apical leakage  
– Fluid filtration method analysis  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2342.p187-191.2019  
George Tácio de Miranda Candeiro, Horst Frischkorn , Maria Caroline de Abreu Timbó, Yhara Carvalho de Sousa, Danna Mota Moreira, Phillipe Nogueira Barbosa Alencar, Mônica Sampaio do Vale
- Ação do laser infravermelho em suspensões de Streptococcus mutans.....192  
Infrared laser action on Streptococcus mutans suspensions  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2341.p192-196.2019  
Smyrna Luiza Ximenes de Souza, Stéffani Vasconcelos Santos, Fernanda Freitas Sousa, Ana Larissa Ximenes Batista, Laís Aragão Lima, Ramille Araújo Lima
- Avaliação do efeito de técnicas de acabamento e polimento na rugosidade superficial de resinas compostas.....197  
Evaluation of the effect of finishing and polishing techniques on surface roughness of composite resins  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2390.p197-203.2019  
Renato Queiroz Nogueira Lira, Marcelo Victor Sidou Lemos, Talita Arrais Daniel Mendes, Giovanna Rabelo Neri, Juliano Sartori Mendonça, Sérgio Lima Santiago
- Diagnóstico e tratamento de lesões não cariosas: a visão do cirurgião-dentista do sistema público de saúde.....204  
Diagnosis and treatment of non-cariou lesions: the vision of the dentist of the public health system  
doi:10.12662/2317-3076jhbs.v7i2.2324.p204-2140.2019  
Vanessa Savastano de Cerqueira Rêgo Ribeiro, Emanuel Lima de Almeida, Isabelly de Carvalho Leal, Davi Oliveira Bizerril, Maria Vieira de Lima Saintrain, Regina Gláucia Lucena Aguiar Ferreira, Vanara Florêncio Passos

# Antimicrobial action, pH, and tissue dissolution capacity of 2.5% sodium hypochlorite gel and solution

## Ação antimicrobiana, pH, e capacidade de dissolução tecidual de gel e solução de hipoclorito de sódio 2,5%

Luciana Batista Luz<sup>1</sup> , Ruth Santana<sup>2</sup> , Amanda Prates<sup>4</sup> , Julia Froehlich<sup>4</sup> , Tiago André Fontoura de Melo<sup>3</sup> , Francisco Montagner<sup>3</sup> , Simone Bonato Luisi 

1. Doutoranda do Programa de Pós-graduação da em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. 2. Docente do Departamento de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. 3. Docente do departamento de Odontologia Conservadora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. 4. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

### Abstract

**Objective:** to evaluate antimicrobial action, pH, and tissue dissolution capacity of 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) gel and solution. **Methods:** The 2.5% NaOCl gel was produced from a colloidal base. The test groups included 2.5% NaOCl gel and solution and the control groups included gel base and distilled water. The antimicrobial activity was evaluated by the broth dilution technique against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) at 15 and 30 seconds and at 1, 5, and 10 minutes. To evaluate tissue dissolution capacity, 30 pulp fragments of bovine incisors were weighed, 10 for each test group and 5 for each control group before and after exposure to the chemical auxiliaries. The final mass percentage of each fragment was calculated. The pH of the substances was measured in triplicate through a digital pH meter. **Results:** pH levels of 13.08 and 9.75 were observed for 2.5% NaOCl solution and gel, respectively. The antimicrobial action of 2.5% NaOCl was the same for both solution and gel, for all tested times. The 2.5% NaOCl solution group showed higher tissue dissolution capacity (Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls tests  $P < 0.0001$ ). **Conclusions:** The type of medium, either solution or gel, containing 2.5% NaOCl did not influence the antimicrobial action at any of the tested times. However, 2.5% NaOCl gel did not present tissue dissolution capacity.

**Keywords:** Dental pulp. *Enterococcus faecalis*. Hydrogen-ion concentration. Sodium hypochlorite. Dissolution. Bacterial Sensitivity Tests

### Resumo

**Objetivo:** avaliar a ação antimicrobiana, pH e capacidade de dissolução tecidual promovida por hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, nas formas líquida e gel. **Métodos:** O gel de NaOCl 2,5% foi produzido a partir de base coloidal. Os grupos testes foram NaOCl 2,5% gel e solução e os grupos controle incluíram a base gel e água destilada. A ação antimicrobiana foi avaliada por meio de método de diluição em caldo, frente a *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) após 15 e 30 segundos, e também a 1, 5 e 10 minutos. Para o teste de diluição tecidual, 35 fragmentos de polpa bovina (sendo 10 para cada grupo teste e 5 para o grupo controle) foram pesadas antes e após a exposição aos auxiliares químicos. O percentual de massa final de cada fragmento foi calculada. O pH dos auxiliares químicos foi medido em pHmetro digital, em triplicata. **Resultados:** Valores de pH iguais a 13,08 e 9,75 foram observados para solução e para o gel de NaOCl, respectivamente. A ação antimicrobiana do NaOCl foi a mesma para o gel e a solução, em todos os períodos testados. Maior capacidade de dissolução tecidual foi obtida no grupo onde se utilizou a solução de NaOCl 2,5% (Testes de Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls,  $P < 0,0001$ ). **Conclusões:** A apresentação na forma de gel ou de líquido do NaOCl 2,5% não modificou a ação antimicrobiana em qualquer um dos períodos testados. Porém, o gel de NaOCl 2,5% não demonstrou capacidade de dissolução tecidual.

**Palavras-chave:** Polpa dental. *Enterococcus faecalis*. Concentração de Íons de Hidrogênio. Hipoclorito de sódio. Dissolução. Testes de Sensibilidade Microbiana.

### INTRODUCTION

Sodium hypochlorite (NaOCl) is the chemical auxiliary most widely used during chemomechanical root canal preparation because it associates antimicrobial activity and tissue dissolution capacity<sup>1</sup>. The chemical efficacy and/or the pulp tissue dissolution capacity of NaOCl are significantly influenced by several parameters such as concentration, exposure time, activation method (ultrasound or laser), temperature, and pH<sup>2</sup>. NaOCl concentration is directly proportional to its antimicrobial action and inversely proportional to its biological compatibility, increasing deleterious effects on periapical tissues<sup>3,4</sup>.

Nearly half of endodontists from the American Board of Endodontics have reported the occurrence of at least one accident with NaOCl during endodontic treatment<sup>5</sup>. The accidents reported in the literature were: extrusion into the maxillary sinus, facial bruising and edema<sup>6</sup>, limitation of mouth opening, mucosal ulceration<sup>6</sup>, severe pain<sup>3,6</sup>, ocular chemical burn<sup>3</sup>, and bleeding and rhinorrhea<sup>7</sup>. Extrusion of NaOCl into periapical tissues during endodontic treatment causes immediate, potentially serious, and speculative acute symptoms<sup>7,8</sup>.

**Correspondence:** Simone Bonato Luisi. Department of Conservative Dentistry, Dental School, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Ramiro Barcelos, 2492 – Bairro Santana. CEP 90035-003, Porto Alegre, RS – Brazil. E-mail: simone.luisi@ufrgs.br

**Conflict of interest:** There are no conflicts of interest in this research.

Received: 14 Setp2018; Revised: 14 Jan 2019; 7 Feb 2019; Accepted: 12 Feb 2019

Chemical auxiliaries in gel form for endodontics have been studied because they prevent accidental extrusion of irrigation solution during endodontic treatment, due to their high viscosity<sup>9</sup>. Chlorhexidine gel has essential properties, such as viscosity and low toxicity to periapical tissues, and keeps the active agent in greater contact with the root canal walls and dentinal tubules<sup>10</sup>. However, chlorhexidine has no ability to dissolve organic tissues. The literature presents studies on the antimicrobial action of NaOCl gel<sup>14</sup>; however, there are no reports of its tissue dissolution properties.

Some instrument manufacturers, particularly of nickel-titanium instruments, have been recommending the use of endodontic gels due to their higher lubrication capacity<sup>4</sup>. NaOCl gel can be a safe alternative as a chemical auxiliary in endodontic treatment because of its proven tissue dissolution capacity and maintenance of its antimicrobial activity. Thus, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity, pH, and pulp tissue dissolution capacity of 2.5% NaOCl gel.

## MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Dental School from the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brazil). The research protocol was also registered in the SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), process number AEA118B.

### Preparation of 2.5% NaOCl gel

The gel base was produced from a 10% gel matrix, with a viscosity of 450 centipoises, similar to that of 2% chlorhexidine gel (Essential Pharma, Itapetininga, São Paulo, Brazil), at 25.9 °C and 10 revolutions per minute (rpm). The base used is a water-soluble, biocompatible, biologically inert, non-mutagenic, and non-cytotoxic synthetic polymer with excellent transparency and without carcinogenic or antigenic activity.

2.5% NaOCl gel or solution was produced using the formula:  $C1.V1 = C2.V2$  (Concentration1 X Volume1 = Concentration2 X Volume2), starting from a concentrated solution of NaOCl, previously titrated (Mediquímica Indústria Ltda, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). The groups are shown on Table 1.

Table 1: Experimental and control groups according to substance and to presentation (gel or solution).

Group	Substance	Presentation
Control 1	Distilled water	Solution
Control 2	Gel base	Gel
Group 1	2.5% Sodium hypochlorite	Solution
Group 2	2.5% Sodium hypochlorite	Gel

### Antimicrobial activity

For the evaluation of antimicrobial activity, the broth dilution technique was employed in triplicate against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). This methodology was adapted from Vianna et al. (2004) (11). *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) was subcultured on BHI agar plates and incubated at 37° C for 18-24 hours. After growth in the solid medium, the isolated colonies were suspended in BHI broth. The suspension was adjusted on a spectrophotometer at 600 nm and at an absorbance of 0.036 to reach the concentration equivalent to the 0.5 McFarland standards (1.5 x 10<sup>8</sup> bacteria/mL). In the laminar flow chamber, 1 mL of BHI broth containing the viable microorganism was deposited into the well of a culture dish (TTP, Trasadingen Switzerland), in addition to 1 mL of 2.5% NaOCl gel and solution (test groups), gel base, or distilled water (control groups). In the other five wells, there was BHI broth containing the neutralizing agent (0.5% sodium thiosulfate, Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) and they represented each of the five evaluation times, except the first well. Aliquots of 200 µL were withdrawn from the wells with chemical auxiliaries and controls after 15 seconds, 30 seconds, 1 minute, 5 minutes, and 10 minutes, respectively, in the wells containing the neutralizing agent. All plates were incubated in a microbiological oven at 37 °C with 10% CO<sub>2</sub> for 24 hours. The results were analyzed according to the presence or absence of turbidity in the wells. To verify the presence of viable microorganisms, aliquots of 25 µL of each well (turbid or not) were plated in BHI agar medium. The plates were incubated in a microbiological oven at 37 °C with 10% CO<sub>2</sub> for 24 hours. After the incubation period, antimicrobial activity was confirmed when there was no bacterial growth in the BHI agar.

### pH evaluation

The pH of the NaOCl solution and gel (test groups) and distilled water and gel base (control groups) was evaluated in triplicate using Digital pH meter (Digimed DM 21, São Paulo, SP, Brazil).

### Pulp tissue dissolution capacity

To evaluate pulp tissue dissolution, a technique adapted from Cobankara et al. (2010) was used (12). Thirty bovine pulp fragments (standardized from 0.00439 g to 0.03487 g measuring approximately 10 mm in length) were used, 10 samples per test group (2.5% NaOCl gel and solution) and 5 samples per control group (water and gel base). The number of samples was based on similar studies (12,13). The pulp fragments were in contact with the auxiliary substance for 3 minutes, with 20 seconds of vortexing at each minute. To calculate the final mass percentage of the samples, the pulp fragments were weighed before and after exposure to 2.5% NaOCl solutions and gels and to controls (gel base and distilled water).

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed by Statistical Package for

the Social Sciences – SPSS version 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). The median values for the pH of the tested chemical auxiliaries were calculated (Excel, Ref). The normality of the data was assessed by the Shapiro-Wilk test ( $\alpha=5\%$ ). The null hypotheses were:

a) There is no statistical difference in antimicrobial effect among the tested chemical auxiliaries (Kruskal Wallis test and Student-Newman-Keuls post-hoc test);

b) There is no statistical difference between the initial and the final mass of the samples exposed to a specifically chemical auxiliary (T-test for paired samples);

c) There is no statistical difference in the percentage of pulp tissue dissolution promoted by the tested chemical auxiliaries (Kruskal Wallis test and Student-Newman-Keuls post-hoc test);

## RESULTS

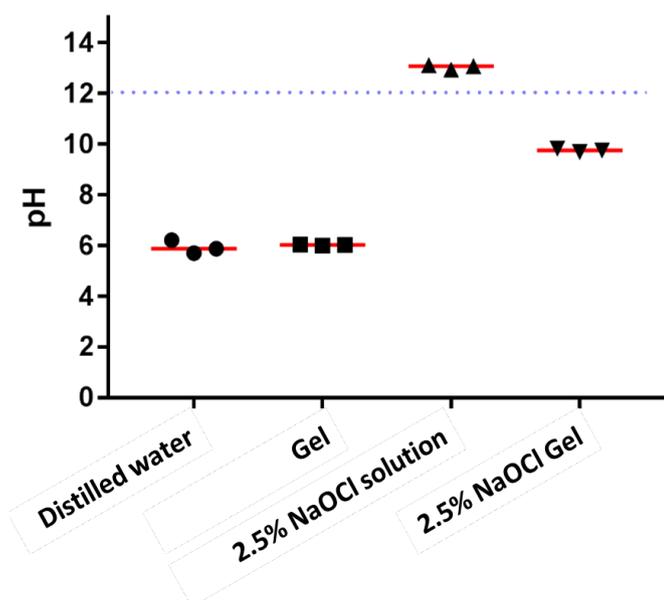
### Antimicrobial activity

Both NaOCl samples (solution and gel) showed antimicrobial activity at all tested times. The control groups (distilled water and gel base) did not show antimicrobial activity. When evaluating the viability of bacterial cells, there was growth only in the samples obtained from aliquots of the wells that presented turbidity, confirming the bactericidal effect of 2.5% NaOCl solution and gel.

### pH evaluation

The median pH values of NaOCl gel and solution were 9.75 and 13.08, respectively. The median values for test control substances were 5.87 for distilled water and 6.02 for the gel base, as shown in Figure 1.

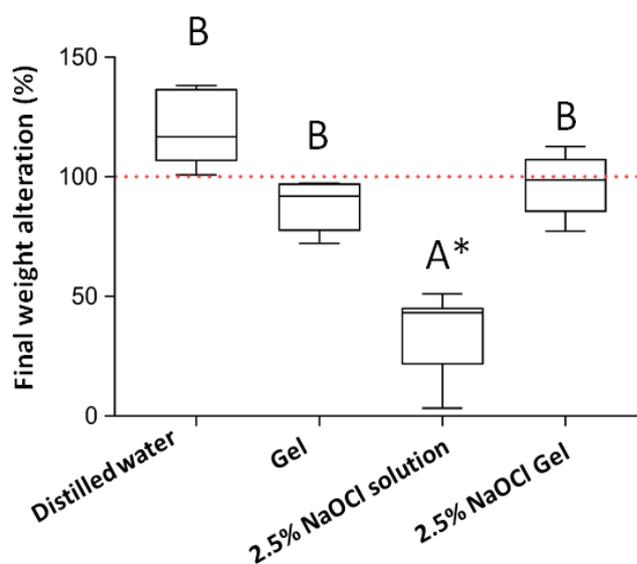
**Figure 1.** Median pH values obtained for test and control substances. Dashed line indicates extremely basic pH.



### Pulp tissue dissolution capacity

The median of the final mass change in the samples as compared to the initial mass was: 98.63% for 2.5% NaOCl gel; 43.18% for 2.5% NaOCl solution; 116.80% for distilled water; and 92.06% for the gel base. 2.5% NaOCl solution had a higher dissolution capacity than that of the other tested groups (Kruskal Wallis test and Student-Newman-Keuls post-hoc test;  $p<.05$ ). The results are also shown in Figure 2.

**Figure 2.** Median of the final mass percentage of samples after exposure to the test and control substances when compared to the initial mass. The dashed line indicates the initial mass of the sample. The asterisk (\*) indicates no statistically significant difference between the initial and final moments in the same group (Student's t test,  $P < 0.05$ ). Different letters show statistically significant differences between the groups (Kruskal-Wallis and Student-Newman-Keuls post-hoc tests,  $P < 0.05$ ).



## DISCUSSION

The literature presents studies on the antimicrobial activity of NaOCl gel (14); however, there are no reports of its tissue dissolution properties. NaOCl solutions with higher pH significantly dissolve more organic tissue than solutions at the same concentration, but with a lower pH (15). However, NaOCl acidification increases antimicrobial activity but decreases the ability to dissolve tissue (16, 17). Therefore, the pH of the solution determines the balance between free chlorine, hypochlorite ion ( $\text{OCl}^-$ ), and hypochlorous acid ( $\text{HClO}$ ). The balance influences the biological effect of NaOCl, which can be defined as antimicrobial capacity and tissue dissolution (18). Considering the scarcity of studies in the literature and the need to study irrigants that are safer for clinical use, it is essential to evaluate the antimicrobial properties, pH, and tissue dissolution capacity of NaOCl gel.

In the present study, both 2.5% NaOCl gel and solution presented

antimicrobial activity in all the time periods tested, and there was no difference between them. Conversely, Zand et al. (2016) reported that the antimicrobial activity of NaOCl gel was lower than that of the solution<sup>14</sup>. A similar behavior was observed by Vianna et al. (2004), who showed that chlorhexidine gel also took a longer period of time to exert antimicrobial activity than did the chlorhexidine solution<sup>11</sup>.

The samples exposed to 2.5% NaOCl solution had a large difference between the initial and final masses, in agreement with the literature findings<sup>13,19</sup>. Conversely, NaOCl gel showed no tissue dissolution capacity, and there was no difference between the initial and final mass values (98.63%). NaOCl gel (pH 9.75) showed lower pH than the solution (pH 13.08) at the same concentration, although both had alkaline values. In a study with swine muscle tissue, pH influenced the tissue dissolution capacity of NaOCl. In solutions with a pH lower than 9, there was a decrease in tissue dissolution capacity<sup>20</sup>.

In this experiment, for the evaluation of tissue dissolution capacity, the total exposure time of the specimens to the substances was 3 minutes, which may have been insufficient for the action of NaOCl gel at pH 9.75. The slightly alkaline pH of NaOCl gel may have influenced the tissue dissolution capacity when compared to NaOCl solution at the same concentration.

One hypothesis for NaOCl gel not presenting tissue dissolution capacity in the experimental period was attributed to the fact that it presented a median pH of 9.75, while NaOCl solution had a median pH of 13.08 at the same concentration. Jungbluth et al. (2011) stated that NaOCl solutions with higher pH dissolve significantly more organic tissue than do NaOCl solutions at the same concentration, but with a lower pH<sup>15</sup>. According to Siqueira et al. (2005), in a study with bovine dental pulps, pH influences the tissue dissolution capacity of NaOCl. NaOCl with pH values below 9 exhibits decreased tissue dissolution capacity. Also in Siqueira's study, total exposure time to the substances did not exceed 120 minutes (21). In the present study, exposure time to the chemical solutions was 3 minutes, which may have been insufficient for the action of NaOCl gel with a pH of 9.75.

Tartari et al. (2016) reported, in a study on tissue dissolution by different concentrations of NaOCl using bovine muscle tissue; that tissue dissolution was directly dependent on the time of immersion of the samples in auxiliary chemical substances, with longer immersion time leading to greater tissue dissolution<sup>22</sup>. These findings reinforce the hypothesis that the time of exposure of the samples to the auxiliary chemicals in the present study may have been insufficient for NaOCl gel to have tissue dissolution capacity.

In the test groups, the gel base showed no difference in mass values before and after the experiment and the median of the final mass percentage was 92.06%. For distilled water, there was no difference between the initial and final mass values, with a median of final mass of 116.80%. The specimens used in the present study were frozen and unfrozen prior to the experiment. According to Colla and Prentice-Hernandez (2003)<sup>23</sup>, while a

food is being unfrozen, strong exudation occurs, with loss of nutrients, especially in the intracellular environment. Exudation and loss of nutrients after the tissue is unfrozen tend to cause a decrease in tissue mass. When the tissue is completely unfrozen and in contact with distilled water, rehydration and incorporation of liquid occurs, increasing mass<sup>23</sup>. Care was taken to standardize the drying procedures of the pulp fragments both before and after the experiment. However, such a procedure does not prevent rehydration, incorporation of liquid, and the increase in mass that an unfrozen tissue goes through after coming in contact with distilled water. Cobankara et al. (2010) also observed a mass increase in bovine pulp tissue in contact with saline solution in a study on the dissolution capacity of organic tissue<sup>12</sup>.

NaOCl is the only chemical auxiliary with the ability to dissolve tissue. The literature cites different models to test this property, such as porcine palatal mucosa used by Jungbluth et al. (2011) (15), porcine pulps by Clarkson et al. (2006)<sup>24</sup> and Clarkson et al. (2012)<sup>25</sup>, bovine muscle tissue by Tartari et al. (2015)<sup>22</sup>, and human tooth pulps by Slutzky-Goldberg et al. (2013)<sup>13</sup>. Bovine pulp tissue was chosen in the present study because it presents characteristics similar to that of human pulp tissue and because it has a considerably larger volume than that of the human dental pulp<sup>26</sup>.

The viscosity of NaOCl gel prepared in the present study is directly proportional to the initial chlorine concentration of NaOCl stock solution. The lower the amount of active chlorine, the lower the viscosity of the gel, as it will require a higher amount of NaOCl solution and a lower amount of gel to reach the desired concentration. According to the findings of Romolu et al. (2015), there is little control among some manufacturers regarding the active chlorine concentration of commercially available NaOCl solutions, with large variations in both industrial and manipulated sources<sup>27</sup>. The concentration of NaOCl stock solution used in this experiment was acquired by the manufacturer at 12%; however, after titration, there was 4.3% of active chlorine. For the present study, the discrepancy between the NaOCl concentration reported by the manufacturer and its actual concentration identified by the titration was relevant because it allowed the formulation of a less viscous gel.

## CONCLUSION

Under the conditions of the present experiment, there was no influence of the presentation form of 2.5% NaOCl on antimicrobial activity in any of the time periods tested. However, NaOCl gel did not show tissue dissolution capacity. Additional studies should be performed by modifying the pH of NaOCl gel and increasing the exposure time of the sample to the chemical auxiliary.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank the Federal University of Rio Grande do Sul for the scholarship granted to Amanda Prates (BIC-UFRGS 2016-2017)

## REFERENCES

1. Barbakow F., Lutz F., Toth L. [Materials and technics in root canal treatments in Switzerland--a determination of their status]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1995;105(10):1265-71.
2. Macedo RG, Herrero NP, Wesselink P, Versluis M, van der Sluis L. Influence of the dentinal wall on the pH of sodium hypochlorite during root canal irrigation. *J Endod* 2014 Jul; 40(7):1005-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.12.018.
3. Regalado Farreras Desirée C., Puente Carlos García, Estrela Carlos. Sodium hypochlorite chemical burn in an endodontist's eye during canal treatment using operating microscope. *J Endod* 2014 Aug; 40(8): 1275-9. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.026.
4. Hülsmann M., Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000 May; 33(3): 186-93.
5. Kleier DJ, Averbach RE., Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: experience of diplomates of the American Board of Endodontics. *J Endod.* 2008 Nov; 34(11): 1346-50. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.021.
6. Goswami M, Chhabra N, Kumar G, Verma M, Chhabra A. Sodium hypochlorite dental accidents. *Paediatr Int Child Health.* 2013 Dec; 34(1): 66-9. doi: 10.1179/2046905512Y.0000000042.
7. Bosch-Aranda ML, Canalda-Sahli C, Figueiredo R, Gay-Escoda C. Complications following an accidental sodium hypochlorite extrusion: A report of two cases. *J Clin Exp Dent* 2012 Jul; 4(3): e194-e198. doi: 10.4317/jced.50767.
8. Guivarc'h M, Ordioni U, Ahmed HM, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review. *J Endod* 2017; 43(1): 16-24. doi: 10.1016/j.joen.2016.09.023.
9. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001 Jul; 27(7): 452-5.
10. Bhandari S, T S A, Patil CR. An in Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of 2% Chlorhexidine Gel, Propolis and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus faecalis* in Human Root Dentin. *J Clin Diagn Res.* 2014 Nov; 8(11): ZC60-63. Doi: 10.7860/JCDR/2014/10359.5144.
11. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho Francisco José. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004 Jan; 97(1): 79-84. doi: 10.1016/S1079210403003603.
12. Cobankara FK, Ozkan HB, Terlemez A. Comparison of organic tissue dissolution capacities of sodium hypochlorite and chlorine dioxide. *J Endod* 2010 Feb; 36(2):272-4. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.027.
13. Slutzky-Goldberg I, Hanut A, Matalon S, Baev V, Slutzky H. The effect of dentin on the pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *J Endod* 2013 Aug; 39(8):980-3. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.040.
14. Zand V, Lotfi M, Soroush MH, Abdollahi AA, Sadeghi M, Mojadadi A. Antibacterial Efficacy of Different Concentrations of Sodium Hypochlorite Gel and Solution on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Iran Endod J.* 2016;11(4): 315-9. doi: 10.22037/iej.2016.11.
15. Jungbluth H, Marending M, De-Deus G, Sener B, Zehnder M. Stabilizing sodium hypochlorite at high pH: effects on soft tissue and dentin. *J Endod* 2011 May; 37(5):693-6. doi: 10.1016/j.joen.2011.02.019.
16. Rossi-Fedele G, Guastalli AR, Doğramacı EJ, Steier L, Figueiredo JP. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2011 Sep; 44(9): 792-9. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01911.x.
17. Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA, et al. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig* 2015 Nov;19(8): 2067-73. doi: 10.1007/s00784-015-1431-6.
18. Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem J.* 1947; 41(3):337-42.
19. Tanomaru JMG, Rodrigues VMT, Tanomaru M Filho, Spolidorio DMP, Ito IY. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras empregadas em endodontia. *Rev paul odontol* 2005 Jan-Mar; 27(1):38-40.
20. Christensen CE, McNeal SF, Eleazer P. Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro. *J Endod.* 2008 Apr; 34(4):449-52. doi: 10.1016/j.joen.2008.01.001.

**How to cite this article/Como citar este artigo:**

Luz LB, Santana R, Prates A, Froehlich j, Melo TAF, Montagner F, et al. Antimicrobial action, pH, and tissue dissolution capacity of 2.5% sodium hypochlorite gel and solution. *J Health Biol Sci.* 2019 Abr-Jun; 7(2):121-125

# Gastric toxicity of Alendronate and Methotrexate in Walker 256 carcinosarcoma jaw model

## Toxicidade gástrica de Alendronato e Metotrexato em modelo de carcinossarcoma de Walker 256 em mandíbula

Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>1</sup> , Maria Elisa Quezado Lima Verde<sup>2,3</sup> , Paulo Goberlânio de Barros Silva<sup>3</sup> , Fabrício Bitu Sousa<sup>1,3</sup> , Mário Rogério Lima Mota<sup>1</sup> , Cláudia do Ó Pessoa<sup>4</sup> , Leticia Veras Costa Lotufo<sup>4</sup> , Manoel Odorico de Moraes-Filho<sup>4</sup> 

1. Docente do Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 2. Discente do Programa de Pós-graduação em Odontologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 3. Docente do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus (Unichristus), Fortaleza, CE, Brasil. 4. Docente do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

### Abstract

**Introduction:** Experimental animal models represent a key tool used to elucidate the mechanisms of action and toxicity of anticancer drugs. **Objective:** The purpose was to establish a correlation of neoplastic growth with the combinatorial therapeutic application of sodium alendronate (ALD) and methotrexate (MTX), and to evaluate the gastrointestinal toxicity of these drugs, in the rat Walker 256 carcinosarcoma inoculation model. **Methods:** Female rats were selected and randomly distributed into 5 groups (n=10): negative control (NC), positive control (PC), MTX-treated group, ALD-treated group, and MTX-ALD-treated group (MTX/ALD). Tumor cells were inoculated as a suspension of 1x10<sup>6</sup> cells/mL into the alveolar cavities produced by exodontia procedures. The following parameters were evaluated: body weight, tumor volume and percentage of tumor inhibition, and gastrointestinal toxicity. **Results:** The body weight variation was statistically significant between NC animals and PC animals, and between NC animals and ALD-treated group (p<0.01). Tumor volume variation was statistically significant between PC animals, MTX-treated group and MTX/ALD-co-treated group (p<0.05). Analysis of gastric toxicity of MTX-treated group revealed slight reduction of chief (Ch) and parietal (Pr) cellular populations; ALD-treated group exhibited gastric mucosa without histological alterations of Ch cells but intense reduction of Pr cellular population; and MTX/ALD-co-treated group presented reduction of Ch and Pr cellular populations. **Conclusions:** ALD does not elicit significant antitumor effects on Walker 256 carcinosarcoma cells and decreases antitumor effects of MTX due to toxicity on the gastric epithelium, which is intensified with MTX association.

**Key words:** Gastric Mucosa. Carcinoma 256, Walker. Alendronate. Methotrexate.

### Resumo

**Introdução:** Modelos experimentais em animais representam um instrumento fundamental para elucidar os mecanismos de ação e toxicidade de drogas anticâncer. **Objetivo:** estabelecer uma correlação do crescimento neoplásico com a aplicação terapêutica combinatória de alendronato de sódio (ALD) e metotrexato (MTX), e avaliar a toxicidade gastrointestinal dessas drogas, no modelo de inoculação de carcinossarcoma de Walker 256 em ratos. **Métodos:** Ratas fêmeas foram selecionadas e distribuídas aleatoriamente em 5 grupos (n = 10): controle negativo (NC), controle positivo (PC), grupo tratado com MTX, grupo tratado com ALD e grupo tratado com MTX-ALD (MTX/ALD). As células tumorais foram inoculadas como uma suspensão de 1x10<sup>6</sup> células/mL nas cavidades alveolares produzidas por procedimentos de exodontia. Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso corporal, volume tumoral e porcentagem de inibição tumoral e toxicidade gastrointestinal. **Resultados:** A variação do peso corporal foi estatisticamente significativa entre animais NC e animais PC, e entre animais NC e grupo tratado com ALD (p < 0,01). A variação do volume tumoral foi estatisticamente significativa entre animais PC, grupo tratado com MTX e grupo tratado com MTX / ALD (p < 0,05). A análise da toxicidade gástrica do grupo tratado com MTX revelou uma ligeira redução das populações celulares principais (Ch) e parietais (Pr); o grupo tratado com ALD exibiu mucosa gástrica sem alterações histológicas de células Ch mas intensa redução da população celular Pr; e o grupo tratado com MTX / ALD apresentou redução das populações celulares Ch e Pr. **Conclusões:** O ALD não provoca efeitos antitumorais significativos nas células do carcinossarcoma Walker 256 e diminui os efeitos antitumorais do MTX devido à toxicidade no epitélio gástrico, que é intensificada com a associação MTX.

**Palavras-chave :** Mucosa Gástrica. Carcinoma 256 de Walker. Alendronato. Metotrexato.

### INTRODUCTION

In 2008, approximately 7.6 million deaths worldwide were attributed to cancer, and cancer-related deaths are projected to continue increasing up to 70% over the next 20 years, with

an estimated 13.1 million deaths in 2030<sup>1</sup>. Due to the fast progression of cancer, research into potential anticancer drugs with reduced side effects has intensified.

**Correspondente:** Ana Paula Negreiros Nunes Alves. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará. R. Alexandre Baraúna, 949 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, 60430-160. E-mail: ananegreirosnunes@gmail.com

**Conflict of interest:** There are no conflicts of interest in this research.

Received 16 Set 2019; Revised: 5 Mar 2019; Accepted: 27 Mar 2019

Among the variety of antimetastatic drugs available, bisphosphonates have received considerable attention. Bisphosphonates are analogues to endogenous pyrophosphates and induce apoptosis in osteoclasts, inhibiting the initial osseous resorption promoted by neoplastic cells, thereby preventing their adhesion to the demineralized organic matrix, and significantly diminishing the incidence of osseous metastases.<sup>2,3</sup> Aminobisphosphonates, a subclass of bisphosphonates, were generated by the addition of nitrogen atoms to the original bisphosphonate structure in effort to increase efficacy. However, despite being approved for human use a little more than a decade ago, even the most potent aminobisphosphonates, such as sodium alendronate (ALD, 4-amino-1-hydroxybutylidene), exhibit inadequate direct antitumor activity. Therefore, it is necessary and urgent to identify chemotherapeutic agents with enhanced specificity for malignant cells<sup>4</sup>.

Numerous drugs fit the description of tumor-specific chemotherapeutic agents. The folate inhibitor methotrexate (MTX, L-Glutamic acid, N-[4[[-(2,4-diamino-6-pteridinyl)methyl]-methylamino]benzoyl]) is still the drug of choice for the treatment of several malignancies, such as the acute lymphocytic leukemia, osteosarcoma, and breast cancer. Its action mechanism involves the inhibition of dihydrofolate reductase activity, which is necessary for the biosynthesis of the DNA base thymine. It consequently suppresses DNA replication and induces apoptosis in highly mitotic cells, such as neoplastic cells.<sup>5</sup> However, because it does not exhibit selectivity, MTX can non-specifically affect non-pathogenic groups of highly proliferative, resulting in clinically mild to moderate deleterious effects in the digestive tract.<sup>6</sup>

When applied as a single-agent therapy, MTX is well-tolerated in the majority of patients. However, its combinatorial application with ALD presents a therapeutic challenge because adding ALD results in significant side effects in the digestive tract.<sup>7</sup> These effects are largely attributable to the fact that it can only be orally administered.<sup>4</sup> The combined administration of ALD bisphosphonate and MTX has been shown to produce serious gastrointestinal complications. These side effects, combined with the onset of cancer-associated cachexia, can diminish the quality of life and life expectancy of the patients treated with these drugs.<sup>8</sup>

Experimental animal models represent a key tool used to elucidate the mechanisms of action and toxicity of anticancer drugs. Among these models is the rat Walker 256 carcinosarcoma inoculation model, which uses a mammary gland tumor that exhibits aggressive behavior and high invasive capacity.<sup>9</sup> As a breast cancer, Walker 256 carcinosarcoma is susceptible to MTX and, when inoculated into rat mandibles, represents an ideal model system for the analysis of antimetastatic and antitumor activities of ALD and MTX. Consequently, it is also an ideal model to analyze the non-specific and adverse effects of these drugs.<sup>5,9</sup>

The purpose of this study was to establish a correlation of neoplastic growth with the combinatorial therapeutic

application of ALD and MTX, as well as to evaluate the gastrointestinal toxicity of these drugs, in the rat Walker 256 carcinosarcoma inoculation model.

## METHODS

### Ethical Aspects

This study was conducted in accordance with the ethical principles and regulations for animal experimentation recommended by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBAE), an institution affiliated to the International Council for Laboratory Animal Science, and the Brazilian Legislation on Experimental Animals (Federal law nº. 6.638 -1979).

This study was submitted to and approved by the Ethics Committee of Animal Research of Federal University of Ceará (UFC).

### Sample and animals identification

A total of 50 adult female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing between 140 and 220g, were studied. The rats were acquired from the Central Animal Colony of UFC and were randomly distributed into 5 groups of 10 animals each.

The animals were housed in the Sectorial Biotery of the Department of Pharmacology and Physiology of UFC in plastic cages with pine-sawdust covered floors that were maintained at a temperature of 24°C and a dark-light cycle of 12 hours with water and commercial food (Bio-base) provided *ad libitum*.

### Tumor inoculation

This study performed tumor implantation according to the protocol described previously.<sup>9</sup> Briefly, the animals ( $n = 50$ ) were anesthetized by intra-peritoneal (i.p.) injection of 10% chloral hydrate for the inoculation of tumor cells. These cells were inoculated as a suspension of  $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L into the alveolar cavities produced by exodontia procedures that were performed on the first and second inferior right molars without suturing. Next, the animals were returned to their cages and remained under observation until the dissipation of the effects of the anesthesia and the complete recovery of reflexes.

### Groups and treatment protocol

After the tumor inoculation procedure, the animals were randomly distributed into 5 groups, as described in Table 1.

### Body weight analysis

The body weight of the animals was measured every 2 days, starting on the day of the surgical procedure and tumor inoculation (Day 0). The animals were followed up until spontaneous death or until the established day of sacrifice (Day 35), when the survival rate was assessed. Pilot studies revealed

that the survival rate of the animals treated with MTX was approximately 22.75 days. The administration of four doses of each therapeutic regimen tested was standardized, as well as the date of sacrifice, which was defined as 7 days after the last dose of treatment, which corresponded to Day 35.

### Assessment of antitumor activity

The tumor volume and the percentage of tumor inhibition were determined using the following formulas: Tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) =  $(D \times d^2) \times 0.5$ , where "D" represents the largest diameter (mm) and "d" represents the smallest diameter. Tumor inhibition (%) =  $(1 - T \div C) \times 100\%$ , where "T" and "C" represent the mean tumor volumes of the treated and control groups, respectively.<sup>10</sup>

### Analysis of gastric toxicity

Three stomach sections of each animal of the experimental groups were harvested from the cardia and fundus. The fragments were identified and fixed by immersion in 10% formaldehyde for 24 hours. After fixation, the specimens were evaluated macroscopically for their morphology, presence of stomach content and the color of the stomach wall. Subsequently,

the specimens were dehydrated in a series of increasing grades of alcohol, diaphanized in xylol, dipped in paraffin and melted at 60°C. Next, the fragments were embedded into paraffin-forming blocks at room temperature. The fragments were cut into 5  $\mu\text{m}$  thick sections using a semiautomatic microtome, followed by routine histological staining using hematoxylin-eosin. Using optical microscopy, we assessed the sections for histological indications of tissue damage and inflammatory reactions that were previously described to indicate any toxicity of the treatments.<sup>11</sup>

### Statistical analysis

Body weight comparison and the analysis of antitumor activity among the five groups (Sham, control, MTX, ALD, and MTX/ALD) were performed using ANOVA, followed by Tukey's post-test at a 1% significance level to comparison of body weight and 5% significance level to analysis of antitumor activity (GraphPad Prism 5.0®).

For comparison of survival curves, the Kaplan-Meier test was used, in addition to the chi-squared test and a value of  $p < 0.01$  was considered statistically significant (GraphPad Prism 5.0®).

**Table 1.** Group distribution according to procedure, treatment, routes and days of drug administration

Group	Procedure	Treatment/routes	Days
Sham	Exodontia procedure without inoculation of tumor cells	Saline solution 0,9%; 4 doses; (p.o.) <sup>a</sup>	7 <sup>th</sup> , 14 <sup>th</sup> , 21 <sup>st</sup> , 28 <sup>th</sup>
Control	Exodontia procedure and inoculation of tumor cells	Saline solution 0,9%; 4 doses; (p.o.)	7 <sup>th</sup> , 14 <sup>th</sup> , 21 <sup>st</sup> , 28 <sup>th</sup>
MTX <sup>b</sup>	Exodontia procedure and inoculation of tumor cells	MTX 25 mg/kg; 4 doses; (i.p.)	7 <sup>th</sup> , 14 <sup>th</sup> , 21 <sup>st</sup> , 28 <sup>th</sup>
ALD <sup>c</sup>	Exodontia procedure and inoculation of tumor cells	ALD 3 mg/kg; 4 doses; (p.o.)	7 <sup>th</sup> , 14 <sup>th</sup> , 21 <sup>st</sup> , 28 <sup>th</sup>
MTX/ ALD <sup>d</sup>	Exodontia procedure and inoculation of tumor cells	MTX 25 mg/kg (i.p.) + ALD 3 mg/kg (p.o.); 4 doses	MTX: 7 <sup>th</sup> , 14 <sup>th</sup> , 21 <sup>st</sup> , 28 <sup>th</sup> ALD: 5 <sup>th</sup> , 12 <sup>th</sup> , 19 <sup>th</sup> , 26 <sup>th</sup>

aTexon®; bMTX, Methotrexate (L-Glutamic acid,N-[4[-(2,4-diamino-6-pteridiny)]methyl]-methylamino]benzoyl)), Novartis®; cALD, Sodium alendronate (4-amino-1-hydroxybutylidene), Pharmacia Ind Com Ltda®; dThe treatments with methotrexate and sodium alendronate were administered on different days due to their combined toxicities and to the lack of knowledge regarding the actual side effects of these drugs when combined with bisphosphonates. p.o., orally; i.p. intra-peritoneal.

## RESULTS

Due to the mortality induced by the Walker 256 carcinosarcoma, the animals of the positive control group and the ALD group did not receive treatment according to the therapeutic regimen

proposed in Table 1. The control group survived only until the first two doses of saline and ALD-treated group survived only a single dose of ALD.

### Analysis of body weight variation

The animals of the sham group exhibited increase in weight during the 12 days of treatment. The animals of the control group lost weight during the first 2 days, but gained weight between Day 4 and Day 6, and exhibited high weight loss at 8, 10 and 12 days, when compared to the Sham group, this loss of

weight was statistically significant (Table 2).

Significantly, the animals from MTX (day 8) and MTX/ALD (day 8 and day 10) groups showed a lower weight loss compared to the control group. However, the animals of the ALD-treated group displayed similar behavior as the control group (Table 2).

**Table 2.** Variation of Body Weights of Animals.

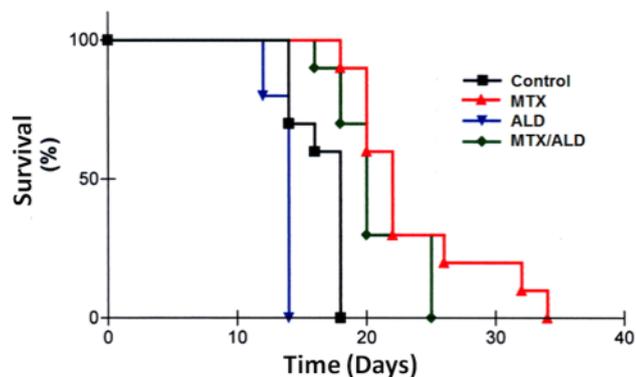
	Day 0	Day 2	Day 4	Day 6	Day 8	Day 10	Day 12
Sham	0 ± 0.0	-2.8 ± 0.7	6.1 ± 1.0	1.5 ± 0.6	2.0 ± 1.8	2.2 ± 1.56	1.9 ± 0.43
Control	0 ± 0.0	-5.9 ± 1.8	0.4 ± 1.6	6.7 ± 1.4	-10.6 ± 2.1 <sup>a</sup>	-19.6 ± 2.0 <sup>a</sup>	-12.8 ± 1.8 <sup>a</sup>
MTX	0 ± 0.0	-1.8 ± 2.4	1.7 ± 1.3	4.2 ± 2.0	3.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	-3.5 ± 2.8 <sup>b</sup>	-5.9 ± 2.7
ALD	0 ± 0.0	-4.3 ± 1.4	1.3 ± 1.0	3.0 ± 1.1	-11.0 ± 2.6	-12.0 ± 1.6	-11.6 ± 1.5
MTX/ALD.	0 ± 0.0	-8.9 ± 1.3	2.6 ± 1.8	0.3 ± 3.4	-6.2 ± 1.8	-2.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	-8.0 ± 2.9

a Body weights with statistically significant compared to Sham group on the same day ( $p < 0.01$ ). b Body weights with statistically significant compared to control group on same day ( $p < 0.01$ ). The variation in weight of animals was presented as the mean values ± SE. ANOVA/Tukey. MTX, methotrexate; ALD, sodium alendronate.

### Survival analysis and Determination of antitumor activity

In terms of overall survival, we observed a significant difference between control group, which exhibited a mean survival time of 16.6 days, and the MTX-treated group, which exhibited a mean survival time of 23.6 days ( $p = 0.0001$ ) (Fig. 1).

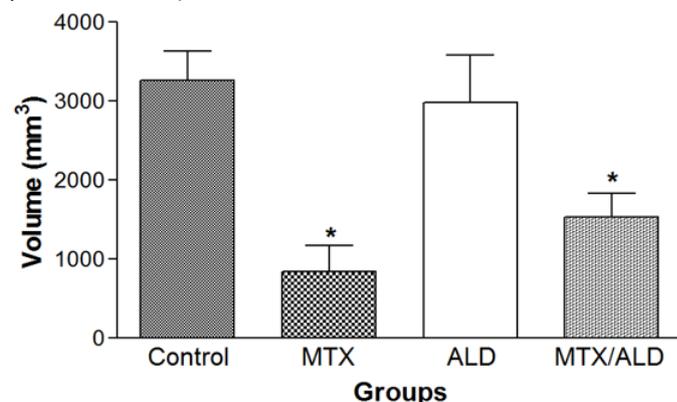
**Figure 1** Survival curve of control and MTX, ALD and MTX/ALD treated groups.



The ALD-treated group exhibited a mean survival time of 13.6 days, which was significantly less than the control group ( $p = 0.0011$ ). Conversely, the experimental MTX/ALD-co-treated group exhibited a mean survival time of 20.7 days, which was significantly more than the control group ( $p = 0.0019$ ) (Fig. 1).

For the assessment of the antitumor activity, the volume of the tumors and the percentage of tumor inhibition were measured. The MTX- treated and MTX/ALD-co-treated animals exhibited reduced tumor volumes compared to the control animals (Fig. 2).

**Figure 2.** Variation of tumor volume after treatment with saline solution (control), MTX, ALD, and MTX/ALD (\* $p < 0.05$  relative to positive control).



The MTX-treated and MTX/ALD-co-treated animals exhibited 69.4% and 49.7% tumor inhibition, respectively. Compared to the control animals, the ALD-treated animals did not exhibit tumor growth inhibition.

### Analysis of gastric toxicity

All of the Sham animals presented normal stomach morphologies, the presence of stomach content and gastric walls with whitish color and preserved pits. Histological analysis revealed that the gastric mucosae were lined by simple cylindrical epithelium exhibiting foveolae. Deeper within the mucosal layers were parietal cells and a predominance of chief cells (Fig. 3 - A and B). The examination of the mucosal smooth muscle layer (muscularis mucosa) revealed flanking loose connective tissue with few congested vessels, followed by the muscularis propria layer and a thin serosa layer.

The stomachs that were removed from the control animals did not contain stomach content and presented with a whitish color, normal morphology and preserved pits. Microscopic analysis revealed that the stomachs showed the same layers described for the sham stomachs, with a few additional small sections exhibiting apparent reduced cellularity (Fig. 3 - C and D).

The MTX-treated (i.p.) animals' stomachs contained variable stomach contents, but they exhibited similar normal whitish color and preserved pits, similar to the negative control group stomachs. All of the gastric layers were found to be consistent with those of the negative control group but with a slight reduction of chief, parietal and mucous-secreting cellular populations and gradual reduction of mucosal thickness (Fig. 3 - E and F).

The ALD-treated (p.o.) animals presented stomachs that contained white-yellowish color, viscous and mucoid orange stomach contents with reddish particles in suspension and hemorrhagic striations in the stomach walls. Sections of discontinuity of the pits were observed and none of the animals had food content in their stomachs. Microscopic analysis revealed that the gastric mucosa exhibited a few sections of reduced cellularity, particularly of the parietal cells, although the submucosal microvasculature was not significantly altered (Fig. 3 - G and H).

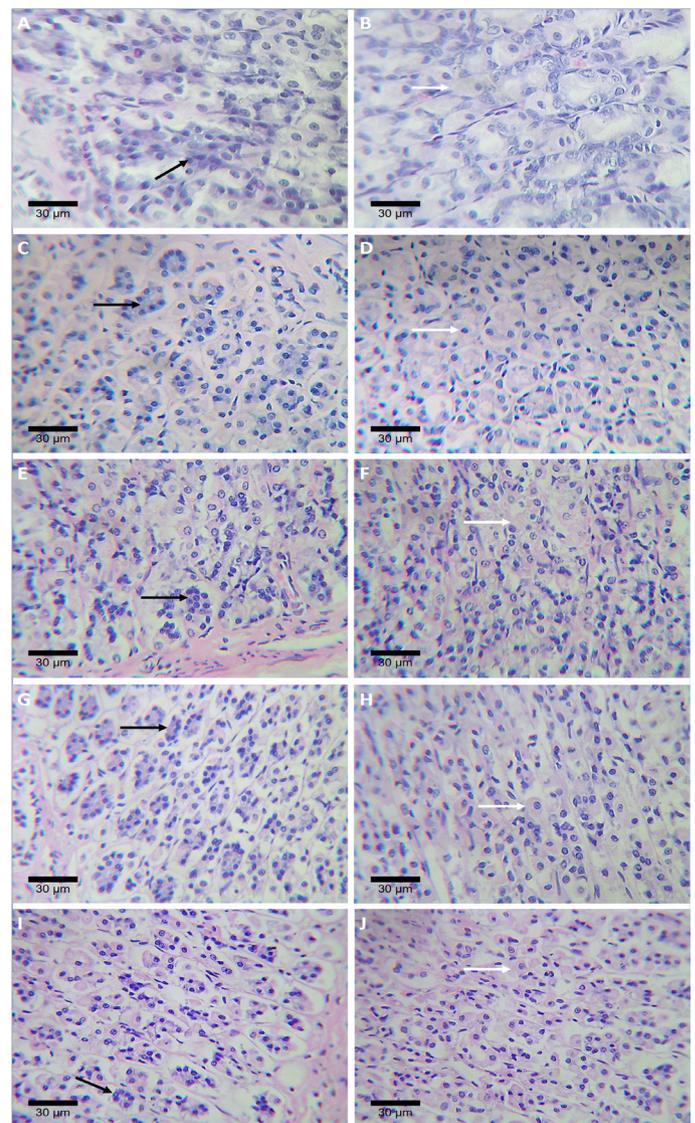
The MTX/ALD-treated (i.p/p.o.) animals presented stomachs that contained liquid-mucous content with hemorrhagic streaks in suspension. The gastric walls exhibited a reduction of the pits and the presence of a few hemorrhagic streaks. Microscopic analysis revealed reduced cellularity, particularly of the chief, parietal and mucous-secreting cells of the gastric mucosa (Fig. 3 - I and J).

### DISCUSSION

MTX is a chemotherapy drug that is predominantly used to treat oncological pathologies and malignancies due to its inhibitory effects on the DNA synthesis of tumor cells. In certain malignancies, such as breast cancer, it is also used simultaneously with aminobisphosphonates to diminish the possibility of bone metastasis, enhancing patient life expectancy.<sup>4,5</sup>

Although it is not yet approved for clinical and therapeutic

**Figure 3.** Photomicrographs of the gastric mucosae of the Sham, control and MTX, ALD and MTX/ALD treated groups (Black arrows: chief cells. White arrow: parietal cells). A - B) The Sham group exhibiting gastric mucosa with chief cells (A) and parietal cells (B) without histological perturbations. C - D) The control group treated with saline solution 0.9% (i.p.), exhibiting gastric mucosa with chief cells (C) and parietal cells (D) without abnormalities. E - F) The MTX-treated (i.p.) group showing a slight reduction of chief (E) and parietal cells (F). G - H) ALD-treated (p.o.) group exhibiting gastric mucosa with chief cells without histological alterations (G) and reduction of parietal cells (H). I - J) The MTX/ALD-co-treated group (i.p./p.o.) with a clear reduction of chief cells (I) and parietal cells (J). HE 400X.



application in human cancer treatment<sup>12</sup>, ALD induces apoptosis in osteoclasts by inhibiting ATP and cholesterol synthesis, which makes it a potent inhibitor of tumor-induced osteolysis that, theoretically, can inhibit metastasis and difficult tumor implantation in bone tissue<sup>2</sup>. In spite of its advantages, ALD, similar to all of the other bisphosphonates, elicits many side effects, including osteonecrosis of the jaw, hypocalcemia, asthenia, headache and disorders of the gastrointestinal tract<sup>4</sup>.

Another limiting factor regarding its use is that ALD is only commercially available as an oral formulation, a form of delivery that can directly cause accentuated damage to the surface of the gastric mucosa<sup>7</sup>.

When the toxic effects of these drugs on the digestive tract cells are combined with the cachexia-induced by Walker 256 carcinosarcoma, the general health of the animals can be seriously compromised during oncological therapy, causing weight loss with decreased survival rate impact.

Body weight variation analysis revealed that weight loss was significant in the control group animals, confirming that malignancies can consume the body's energy reserves, resulting in malnutrition and cachexia in individuals with cancer.<sup>8</sup> Moreover, the MTX-treated animals did not exhibit similar weight loss, corroborating the antitumor effects of folate inhibitors that were previously shown to suppress uncontrolled tumor proliferation and the exacerbated consumption of body nutrients<sup>13</sup>.

The ALD-treated animals exhibited significant weight loss, despite the antitumor and anti-angiogenic effects that ALD was previously demonstrated to elicit, particularly on malignancies of bone origin<sup>14,15</sup>. However, when used without being combined with MTX according to the proposed protocol, ALD did not elicit significant antitumor effects and did not alter nutrient consumption. Furthermore, the use of ALD was associated with acute gastrointestinal alterations, which might have compromised the digestive action and the absorption of nutrients, thereby preventing adequate nutrition.

MTX enhanced the survival rate of the animals when used alone, a finding that can be corroborated by the reduction of tumor volume and attributed to its suppressive effects on the DNA synthesis of highly mitotic tumor cells.<sup>5</sup> There was a slight decrease of prevention of weight loss, of the survival curve and antitumor activity when the folate inhibitor was combined with ALD. These data suggest that the co-administration of ALD and MTX can change the antitumor activity and survival afforded by MTX. This difference might be associated with the gastrointestinal toxicity of the bisphosphonate alone<sup>7</sup>.

Compared to the control animals, the ALD-treated animals presented a low survival rate, which is likely a consequence of several factors such as the cachexia induced by the Walker 256 carcinosarcoma,<sup>8,9</sup> the low antitumor activity of the bisphosphonate on particular cell types, and the toxic effects of oral ALD on the gastrointestinal mucosa even with only one ALD dose<sup>7</sup>.

Macroscopic evaluation of the stomachs presented morphological alterations in the ALD-treated and MTX-ALD-treated animals. It was demonstrated that the loss of gastric mucosal integrity due to drug toxicity could compromise nutritional absorption due to acute pain symptomatology<sup>7</sup>.

Microscopic analysis of the MTX-treated animals revealed

slight and regular decreased cellularity compared to the control animals. The toxicity of MTX can be associated with its antimetabolic effects in highly proliferative cells<sup>5</sup>.

The ALD-treated group exhibited a reduction of gastric mucosa cells, particularly of parietal cells, highlighting the specificity of ALD on this type of cells. The selectivity of ALD toward parietal cells can be associated with the presence of an amine group and the electronegativity of its phosphate groups. Consequently, this drug exhibits increased affinity for electropositive polar environments, such as gastric acid, which is saturated with protonated hydrogen ions.<sup>16</sup> This hypothesis is consistent with the malabsorption of ALD in the gastrointestinal tract when ingested because its protonation prevents its passage into the paracellular spaces of the small intestine<sup>17,18</sup>.

Because the pH is extremely low in parietal cells, with an average daily range of 1.4,<sup>19</sup> there might be a high accumulation of ALD in these cells or its proximities, making ALD largely responsible for the initial alterations of the gastric mucosa<sup>7</sup>.

Histological analysis of the stomachs revealed that when ALD was co-administered with MTX, there was a more significant but gradual loss of gastric mucosal cells when compared to the ALD-treated group, an effect that is associated with the antimetabolic effects of MTX in highly proliferative cells,<sup>5</sup> such as the chief and mucous-secreting cells, and with possible cytotoxic effects on the acid-producing parietal cells<sup>7</sup>.

Taken together, our findings indicate that bisphosphonates do not appear to elicit antitumor activity on the cell lineages evaluated in our study and decrease the antitumor effect of MTX when combined with this. ALD probably caused early toxicity on the gastric epithelium over a short treatment time and when combined with MTX, elicited a significant inhibitory effect on the turnover of gastric mucosal epithelial cells, leading to cellular rarefaction and early toxicity.

## CONCLUSIONS

Therefore, ALD does not elicit significant antitumor effects on Walker 256 carcinosarcoma cells but rather elicits toxicity on the gastric epithelium, despite the short treatment time, resulting in a negative impact on the survival outcome of the treated animals decreasing antitumor effect of MTX. The combination of ALD with MTX demonstrated a significant inhibitory effect on the turnover of the gastric mucosal lining, resulting in cellular rarefaction and early toxicity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Victor Teixeira Noronha for his assistance with biochemical approach of the protonation process of ALD. The authors wish to thank the National Agencies CNPq (National Center for Research and Development) and CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel) for financial support. In addition, the authors also thank Cristiane Roriz for carefully proofreading the article.

## REFERENCES

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15; 127(12): 2893-917. doi: 10.1002/ijc.25516.
2. Coleman R. Potential use of bisphosphonates in the prevention of metastases in early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2007 Jul; 7(suppl 1): 29S-35S. PubMed PMID: 17683651.
3. Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 Is Expressed in Invasive Breast Cancer Cell Lines. *Canc Res*. Feb 1999; 59(4): 947-52. PubMed PMID: 10029089.
4. Woo S, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. *Ann Intern Med*. May 2006;144(10): 753-61. PubMed PMID: 16702591.
5. Hagner N, Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis. *Cancer Manag Res*. Nov 2010; 19(2): 293-301. doi: 10.2147/CMR.S10043.
6. Cheng KK. Association of plasma methotrexate, neutropenia, hepatic dysfunction, nausea/vomiting and oral mucositis in children with cancer. *Eur J Care*. May 2008; 17(3): 306-11. doi: 10.1111/j.1365-2354.2007.00843.x.
7. Ohashi Y, Aihara E, Takasuka H, Takahashi K, Takeuchi K. Antral ulcers induced by alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in rat stomachs - prophylactic effect of rebamipide. *J Physiol Pharmacol*. Sep 2009; 60(3): 85-93. PubMed PMID: 19826186.
8. García-Luna PP, Parejo Campos J, Pereira Cunill JL. Causes and impact of hyponutrition and cachexia in the oncologic patient. *Nutr Hosp*. May 2006; 21(suppl 3):10S-6S. PubMed PMID: 16768026.
9. Alves APNN, Guedes RC, Costa-Lotufo LV, Moraes MEA, Pessoa CO, Ferreira FVA, Moraes MO. Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma developed in the oral cavity of rats. *Acta Cir Bras*. Jul-Aug 2004;19(4): 406-14. doi: 10.1590/S0102-86502004000400011.
10. Alves AP, Pessoa Cdo Ó, Costa-Lotufo L, Moraes MO Filho. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and metotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. *Acta Cir Bras*. Nov-Dec 2007; 22(6): 457-64. Pubmed PMID: 18235934.
11. Cavalcante GM, Sousa de Paula RJ, Souza LP, Sousa FB, Mota MR, Alves AP. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cir Bras*. 2011 May-Jun; 26(3): 227-34. PubMed PMID: 21537526.
12. Terpos E, Sezer O, Croucher PI, García-Sanz R, Boccadoro M, San Miguel J, et al. The use of bisphosphonates in multiple myeloma: recommendations of an expert panel on behalf of the European Myeloma Network. *Ann Oncol*. Aug 2009; 20(8):1303-17. doi: 10.1093/annonc/mdn796.
13. Biganzoli L, Goldhirsch A, Straehle C, Castiglione-Gertsch M, Therasse P, Aapro M, et al. Adjuvant chemotherapy in elderly patients with breast cancer: a survey of the Breast International Group (BIG). *Ann Oncol*. Feb 2004;15(2): 207-10. PubMed PMID: 14760110.
14. Segal E, Pan H, Benayoun L, Kopečková P, Shaked Y, Kopeček J, Satchi-Fainaro R. Enhanced anti-tumor activity and safety profile of targeted nano-scaled HPMA copolymer-alendronate-TNP-470 conjugate in the treatment of bone malignancies. *Biomaterials*. Jul 2011; 32(19): 4450-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.059.
15. Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Shimizu S, Ogata S, et al. Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 2007; 354(2): 478-84. PubMed PMID: 17240356.
16. Oizumi T, Yamaguchi K, Funayama H, Kuroishi T, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y. Necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates and their inhibition by clodronate, a non-nitrogen-containing bisphosphonate in mice: potential for utilization of clodronate as a combination drug with a nitrogen-containing bisphosphonate. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009 May; 104(5): 384-92. doi: 10.1111/j.1742-7843.2008.00374.x.
17. Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig*. Feb 2009;14(1): 35-41. doi: 10.1007/s00784-009-0266-4.
18. Ward PD, Tippin TK, Thakker DR. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technol Today*. Oct 2000; 3(10): 346-58. PubMed PMID: 11050459.
19. Sachs G, Shin JM, Briving C, Wallmark B, Hersey S. The pharmacology of the gastric acid pump: The H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 277-305. PubMed PMID: 7598495.

## How to cite this article/Como citar este artigo:

Alves APNN, Verde MEQL, Silva PGB, Sousa FB, Mota MRL, Pessoa CO, et al. Gastric toxicity of Alendronate and Methotrexate in Walker 256 carcinosarcoma jaw model. *J Health Biol Sci*. 2019 Abr-Jun; 7(2):126-132.

# Saliva contamination effects at different application steps on bond strength of total etch two-step adhesive

## Efeitos da contaminação por saliva em diferentes etapas de aplicação do sistema adesivo convencional de dois passos na resistência de união de restaurações adesivas

Lidiane Costa de Souza<sup>1</sup> , Nara Sousa Rodrigues<sup>2</sup> , Elizeu Ytalo Pereira Aquino<sup>3</sup>, Mary Anne Sampaio Melo<sup>4</sup>, Diana Araújo Cunha<sup>5</sup> , Vicente de Paulo Aragão Saboia<sup>5</sup> 

1. DDS, MS, PhD; professor, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará (UFC), Sobral, Ceará, Brazil. 2. DDS, MS, PhD student, Graduate Program of Dentistry - Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. 3. DDS, Graduate Program of Dentistry - Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. 4. DDS, MS, PhD, Assistant professor, University of Maryland School of Dentistry, United States. 5. DDS, MS, PhD; professor, Department of Restorative Dentistry - School of Dentistry - Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

### Abstract

**Introduction:** there are clinical situations in the management of cavities favorable to saliva contamination. Human saliva is a complex mixture of oral fluids and it has been showed that the protein content of the saliva is responsible for the decrease in adhesive bond strength when contamination has occurred. **Objective:** this study aimed to evaluate the effect of saliva contamination during different steps of application of adhesive system on bond strength of total etch two-step adhesive system. **Methods:** twenty-five extracted human molars were ground flat to expose occlusal dentin. The bonding system and composite resins were applied to the dentin after etching step under five conditions (n=5/group): G1: control group–no contamination; G2: etching/contamination/dry/adhesive system application; G3: etching/contamination/wash/dry/adhesive system application; G4: etching/adhesive system application/contamination/wash/dry/adhesive system re-application; and G5: etching/adhesive system application/contamination/dry. Microtensile bond strength was tested after specimens were stored in distilled water at 37°C for 24h. Data (mean values - $\mu$ TBS) were analyzed by ANOVA one-way and Tukey tests ( $\alpha=5\%$ ), respectively. Results: Groups G2, G3 and G4 revealed bond strength similar to the control (G1). Group G5 showed significantly lower bond strengths than other groups ( $p<0.001$ ). **Conclusion:** the total etch two-step adhesive tolerated salivary contamination except when the contamination occurred after application of the bond and it was only removed with an air jet and adhesive system was not reapplied.

**Key words:** Saliva. Dentin.

### Resumo

**Introdução:** a saliva humana é uma mistura complexa de fluidos orais e tem sido demonstrado que o conteúdo proteico da saliva é responsável pela diminuição da resistência adesiva quando ocorre contaminação. **Objetivo:** este estudo objetivou avaliar o efeito da contaminação salivar durante diferentes etapas de aplicação do sistema adesivo sobre a resistência de união. **Métodos:** vinte e cinco molares humanos extraídos foram cortados para exposição da dentina oclusal. O sistema adesivo convencional e as resinas compostas foram aplicados na dentina após a etapa de condicionamento sob cinco condições (n = 5 / grupo): G1: grupo controle - sem contaminação; G2: condicionamento ácido/contaminação/secagem/adesivo; G3: condicionamento ácido/contaminação/lavagem/secagem/adesivo; G4: condicionamento ácido/aplicação do sistema adesivo/contaminação/lavagem/secagem/reaplicação do sistema adesivo; e G5: condicionamento ácido/aplicação do sistema adesivo/contaminação/secagem. A resistência à microtração foi testada após o armazenamento das amostras em água destilada a 37°C por 24 horas. Os dados (valores médios - $\mu$ TBS) foram analisados por ANOVA unidirecional e testes de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ), respectivamente. Resultados: Os grupos G2, G3 e G4 revelaram resistência de união semelhante ao controle (G1). O grupo G5 apresentou resistência de união significativamente menor que os demais grupos ( $p < 0,001$ ). **Conclusão:** o adesivo convencional de dois passos não foi afetado pela contaminação salivar, exceto quando a contaminação ocorreu após a aplicação adesiva e foi removida apenas com jato de ar e o sistema adesivo não foi replicado.

**Palavras-chave:** Saliva. Dentina

### INTRODUCTION

Composites and adhesive systems are by far the most widely-used and versatile dental material available to the dental professional<sup>1</sup>. These materials have a wide variety of applications mainly due to their esthetics, and direct-filling capabilities, but there are concerns about their clinical performances in long-term services<sup>2,3</sup>. Secondary caries around restorations restorative margins, fracture and discoloration are the primary modes of resin-based dental materials failure<sup>4</sup>. Deterioration of

composite/adhesive-dentin bond interface integrity as a result from poor initial adhesion appear to be largely related to these failures<sup>5</sup>.

The resin/dentin bond strength has been shown as the key for suitable clinical performance and many different factors including materials, patient and dentist-related factors<sup>6</sup>. The placement technique, under the control of the clinician, is also

**Correspondence:** Diana Araújo Cunha. Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil. Rua Monsenhor Furtado - S/N - Rodolfo Teófilo - Zip code: 60430-355. Email: araujo.diana@gmail.com

**Conflict of interest:** There are no conflicts of interest in this research.

Received: 15 Set 2018; Revised: 5 Mar 2019; 1 Abr 2019; Accepted: 3 Abr 2019

a critical approach to improve adaptation, retention and sealing of the material within the preparation<sup>4</sup>. Performing satisfactory moisture control with no blood, gingival crevicular fluid or saliva contamination is a frequent problem encountered in restorative dentistry daily practice<sup>7</sup>. Clinical situations in the management of cavities with sub gingival margins, partially erupted crowns, malpositioned teeth, or uncooperative patients where rubber dam isolation is not unlikely to be performed are examples of conditions favorable to saliva contamination<sup>8</sup>.

Human saliva is a complex mixture of oral fluids mainly composed by water, enzymes, electrolytes and proteins such as mucoproteins, albumin and gama-globulin<sup>9</sup>. It has been showed that the protein content of the saliva is responsible for the decrease in adhesive bond strength when contamination with saliva has occurred<sup>10,11</sup>. Previous studies related to the bonding efficacy of adhesive system steps contaminated with saliva are controversial. Some studies demonstrated that saliva contamination reduces the bond strength of dental adhesives to dentin<sup>12,13</sup> while others reported conflicting results<sup>7,14</sup>. These differences are related to various influencing factors, such as the composition of adhesive systems and the stage of bonding procedures that saliva contamination occurs<sup>15</sup>. Then, it is not possible to conclude plausible orientations to clinicians.

Currently, a popular strategy in adhesive dentistry involves the total etch, two step adhesive system where a single solution contain primer and adhesive components<sup>16</sup>. These systems have become increasingly popular in daily practice in Brazil due to their simplified and thus more user-friendly application procedure<sup>17</sup>. When using this system, the first step involves the application of a phosphoric acid gel, followed by the bond component (second step). These sequential steps are susceptible to saliva contamination during clinical procedures.

The purpose of this study was to evaluate the effects of saliva contamination at different bond application steps on the microtensile bond strength of a two-step total-etch adhesive systems and to identify strategic additional steps in bonding procedures that reestablishes bond strength comparable with the non-contaminated control group. The null hypothesis tested was that saliva contamination at different stages during the bonding procedures has no significant effect on the dentin bond strength of a two-steps total-etch adhesive system.

## MATERIAL AND METHODS

The materials used in this study included one 37wt%- phosphoric acid and one (Condicionador Dental Gel, Dentsply. International, York, USA) commercial two-step total-etch adhesive Adper™ Single Bond 2 (3M/ESPE, St. Paul, USA), and Z-100 (3M/ESPE, St. Paul, USA). The chosen adhesive system contains BisGMA (Bisphenol A-Glycidyl-Methacrylate), HEMA (Hydroxyethyl Methacrylate), dimethacrylates, ethanol, water, photoinitiator system and a methacrylate functional copolymer of polyacrylic and polyitaconic acids with 10% by weight of 5 nm-diameter spherical silica particles as basic composition.

The Ethical Research Committee of the School of Medicine of the Federal University approved the use of 25 extracted caries-free human third molars in this study (protocol # 050/11). The teeth were stored in 0.01% (w/v) thymol solution at 4°C and used within 3 months after extraction<sup>18</sup>. A flat dentin surface was exposed on each tooth after wet grinding of the occlusal enamel on #100-grit SiC paper mounted in a polishing machine (Arotec SA, Cotia, Brazil). Dentin surfaces were exposed and inspected under ×8 magnification to ensure that no enamel remnants were left (Leica Zoom 2000 - Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). The enamel-free exposed dentin surfaces were further polished on wet #600-grit silicon-carbide paper for 20 s to produce a standardized smear layer. Specimens were etched with 37% phosphoric acid gel for 15 s, rinsed with water and dried with absorbent paper.

Using a computer-generated list, we randomly assigned the teeth to one of 5 groups (n=5), according to the saliva contamination during bonding procedures as showed in Figure 1. The sample size calculation was based in a previous pilot study. A description of all groups is as follows:

- G1 (Control): In this group, there was no saliva contamination. The adhesive system was applied to the dentin of each specimen according to the manufacturer's instructions (Apply two consecutive coats of adhesive for 15 s with gently agitation, gently air thin for 5 s to evaporate the solvent and light cure for 10 s)
- G2 (Contamination/ dry/ adhesive system application): fresh human saliva was applied with a disposable brush to the etched dentin for 20 s. Surface was then dried with air for 5 s and the bonding agent applied as in the control group.
- G3 (Contamination/ wash/ dry/ adhesive system application): After saliva contamination of etched dentin, the surface was rinsed with water for 5 s, and it was then dried with air for 5 s. Then, the bonding procedure was carried out as in the control group.
- G4 (adhesive system application/ contamination/ wash/ dry/ adhesive system): After the bonding agent application, saliva decontamination was performed, the surface was rinsed with water for 5 s and dried with air for 5 s. The bonding agent application was repeated.
- G5 (adhesive system application/ contamination/ dry): After the bonding agent application, saliva contamination was performed, the surface was dried with air for 5 s. None additional procedures were carried out.

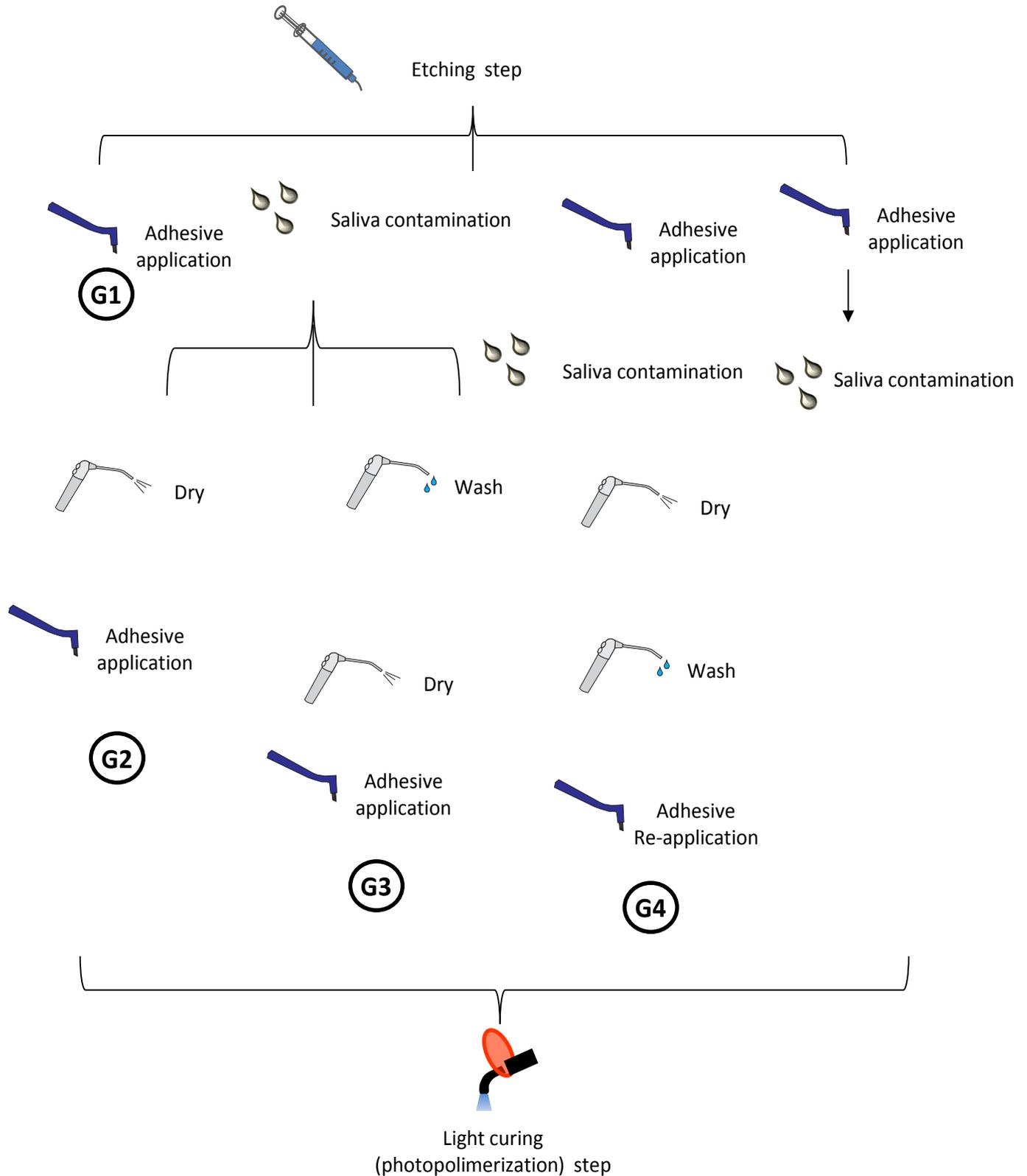
For all groups, the adhesive was light activated for 10 s using a Light Emitting Diode Optilight LD Max (Gnatus, Ribeirão Preto, Brazil) with a power density of 460 mW/cm<sup>2</sup>.

The fresh saliva used in the study was provided by the researcher himself in the act of the restorative process, being collected one hour after meal, thus simulating a clinically existing situation. The time and the amount of saliva contamination were determined by previous study of Darabi et al<sup>19</sup>. All the

experimental procedures were performed by a single operator to reduce inter-operator variation. Dentin surfaces were bonded according each group. Then, composite resin was then used

incrementally to build up the specimen to a thickness of 4 mm. Each 2-mm increment was individually light-activated for 40 s. The specimens were stored in deionized water at 37°C for 24 h.

**Figure 1.** Schematic representation of the experimental design with group representation. The steps at which saliva contamination occurred during the bonding procedure and the strategic steps to overcome the contamination are illustrated.



### Microtensile bond strength test ( $\mu$ TBS)

The bonded teeth were serially sectioned, with a water-cooled diamond saw in a cutting machine, in mesial-distal and buccal-lingual directions, to obtain sticks with a cross-sectional area approximately 0.9 mm<sup>2</sup>, measured with a digital caliper (Absolute Digimatic, Tokyo, Japan). Each stick was glued with cyanoacrylate-based adhesive (Zapit Base and Accelerator, Dental Ventures of America Inc., Corona, USA), attached to opposing arms of the testing device and finally stressed until failure with a tensile force in a microtensile testing machine (Model 4440, Instron Corp., Canton, USA) at a crosshead speed of 1 mm/min. The bond strength (MPa) of each specimen was determined as the failure load (N) divided by the cross-sectional area of the bonded interface.

### Failure pattern determination

Both surfaces of each fractured specimen were observed under a stereomicroscope (Leica Zoom 2000 - Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) at  $\times 80$  magnification to record the types of failure, which were classified as mixed, cohesive failure in dentin, and cohesive failure in composite resin.

### Statistical Analysis

The experimental unit in this study was the tooth and values of all sticks from the same tooth were averaged. For statistical purposes, an arbitrary value corresponding to approximately half of the minimum  $\mu$ TBS that could be observed in this study (5.0 MPa) was attributed to specimens that spontaneously debonded (premature debond failure) during cutting procedures<sup>20</sup>. The normality of error distribution and the degree of non-constant variance were checked for each response variable using Shapiro-Wilk test. Statistical analysis was carried out using the SPSS software package (SPSS Software, version 18.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Comparison of the  $\mu$ TBS of the five studied conditions was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests.

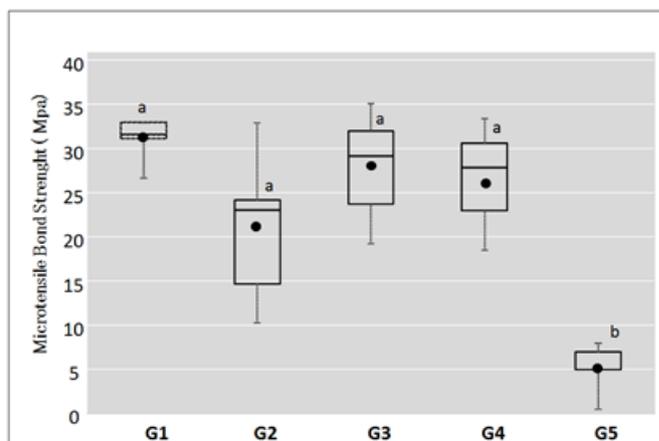
## RESULTS

The mean  $\mu$ TBS and respective standard deviations are summarized in Graphic 1. A one-way ANOVA found a significant effect for studied conditions ( $p < 0.001$ ). The Tukey test ( $p < 0.05$ ) revealed significant differences for group G5 related to saliva contamination after adhesive application with just air dry like overcoming strategy presented the lowest bond strength, which was different from that of all other groups. The highest  $\mu$ TBS was found for the control group, in which there were no significant different comparatively to groups G2, G3 and G4, that had additional strategic steps (drying, rinsing or re-application of adhesive layer) were performed.

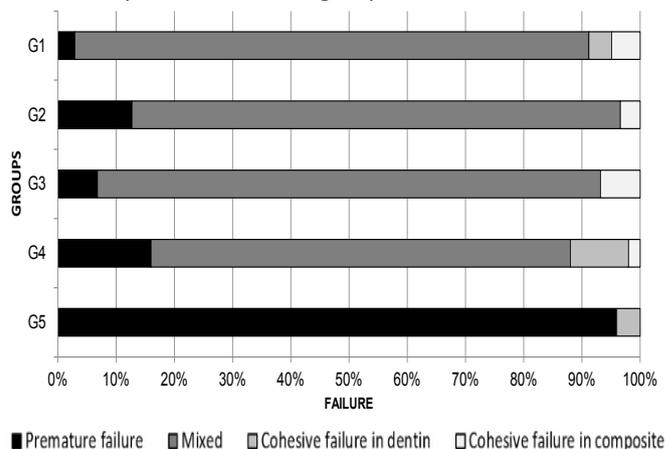
Graphic 2 displays the fracture pattern failure as well as the premature failure related to the groups studied. The results of fracture mode analysis showed that mixed fractures were

prevalent in G1 (control) group and in those groups with some strategic step was performed. In contrast, the group subjected to saliva contamination prior the adhesive application (G5) were tremendously affected (94 % of premature failure) by this condition.

**Graphic 1.** Box-whisker plots of the microtensile bond strength in MPa for the different experimental groups tested. The median  $\mu$ TBS is represented by the central line and the mean by black dot. The box represents the interquartile range. Groups identified with different letters were statistically significantly different ( $p < 0.05$ ).



**Graphic 2.** Percentage of fracture-type and premature debonded specimens in each group.



## DISCUSSION

This study evaluated the effect of saliva contamination during different application steps and possible procedures to overcome the contamination on the bond strength of etch-and-rinse two steps adhesive systems to dentin. The null hypothesis of the present study that saliva contamination could not interfere on bond strength was rejected. The group submitted to contamination after adhesive application, in which only air-drying was done, revealed a significantly lower bond strength mean values corresponding to a reduction of 83% in relation to control; however, there were not significant differences in  $\mu$ TBS among the other groups when the contamination occurred but

additional strategic steps (blot-dry, wash off, the association blot-dry and wash off, and re-application of bonding agent) were applied to remove the contaminating agent ( $p>0.05$ ). In these groups the reduction on bond strength range from 11-32% in relation to control. These findings are consistent with literature data<sup>19,21</sup>.

In a previous study using the same adhesive system, evaluated through shear bond test, the effect of saliva contamination during bonding steps without procedures to remove saliva showed great impact of contamination after adhesive application and before its polymerization. They found bond strength values for this condition about 50% in relation to control<sup>22</sup>. It has been suggested that the water content from saliva can affect the degree of conversion and bond strength. Molecules from HEMA monomer present great hydrophilicity and may retain water within the adhesive layer with no participation in chain growth during polymerization<sup>23</sup>. This induces an inhomogeneous structure of the cured adhesive, which might be a potential mechanism for degradation<sup>24</sup>. In addition, the glycoproteins present in saliva lead to an adherent organic coating that may prevent complete infiltration of the next composite layer and lead to an insufficient copolymerization<sup>25</sup>. This kind of contamination seems to be a potential cause for poor bond quality of adhesive systems during restorative procedures<sup>26</sup>.

Interestingly, the use of simple strategic procedures on the saliva-contaminated surfaces could satisfactorily recover the bond strength. Water-rinsing associated to air-drying procedures (G3) greatly restored the  $\mu$ TBS, which is consistent with previous study<sup>27</sup>. Air-drying strategic step was less effective to recover the bond strength to values statistically similar to control. In contrast, Justin et al<sup>28</sup> showed inability of this procedure in recover the bond strength to suitable mean values. One explanation for this may be related to extended

air-drying time (20 s), which can cause dehydration and collapse the collagen scaffold, and different methodologies to test bond strength between studies. The reapplied adhesive layer also showed great efficacy to restore the bond strength; previous report showed this approach as the most reliable method to overcome contamination<sup>19</sup>. When one-step self-etching adhesives were tested on saliva-contaminated dentin, the rinsing with water and air drying approach followed by reapplication of the adhesive restored the  $\mu$ TBS<sup>29</sup>.

The similar results found for groups that present any additional strategy may be attributed to features of chosen adhesive system. Darabi et al<sup>19</sup> suggested that this etch-and-rinse adhesive system contains water as a co-solvent, which gives a lower volatility to this material. Furthermore, it can be suggested that solvents that have a higher affinity to form H-bonds will be able to break the stabilizing H-bonds and other forces that keep the collagen in a shrunken state<sup>12</sup>. Water and ethanol consist of a hydroxyl group that can form strong hydrogen bonds and are both present in composition of used adhesive system<sup>30</sup>.

The present study focused on the impact of saliva contamination during restorative procedures on bond strength measuring the dentin bond strength after 1 day of water-aging. Further study should determine the bond strength after long-term water-aging to investigate the effects of saliva contamination on the durability of the dentin-resin bond.

## CONCLUSION

Within the limitations, the results of the present investigation suggest that the total-etch two-step adhesive tolerated salivary contamination except when the contamination occurred after application of the bond and it was only removed with an air jet and adhesive system was not reapplied.

## REFERENCES

- Puckett AD, Fitchie JG, Kirk PC, Gamblin J. Direct composite restorative materials. *Dent Clin North Am.* 2007 Jul; 51(3): 659-75. Pubmed PMID: 17586149.
- Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJ. Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater.* 2012 Jan; 28(1): 87-101. Pubmed PMID: 22192253.
- Carvalho RM, Manso AP, Geraldini S, Tay FR, Pashley DH. Durability of bonds and clinical success of adhesive restorations. *Dent Mater.* 2012 Jan; 28(1): 72-86. Pubmed PMID: 22192252.
- Ferracane, J.L. Resin-based composite performance: Are there some things we can't predict? *Dent Mater.* 2013 Jan; 29(1): 51-8. Pubmed PMID: 22809582.
- Drummond JL. Degradation, fatigue, and failure of resin dental composite materials. *J Dent Res.* 2008 Aug; 87(8):710-9. Pubmed PMID: 18650540.
- Goldstein GR. The longevity of direct and indirect posterior restorations is uncertain and may be affected by a number of dentist-, patient-, and material-related factors. *J Evid Based Dent Pract.* 2010 Mar; 10(1): 30-1. Pubmed PMID: 20230962.
- Van Schalkwyk JH, Botha FS, van der Vyver PJ, de Wet FA, Botha SJ. Effect of biological contamination on dentine bond strength of adhesive resin. *SADJ.* 2003 May; 58(4): 143-7. Pubmed PMID: 13677688.
- Vieira SN, Kawaguchi FA, Botta SB, Matos AB. Longitudinal evaluation of the effect of saliva contamination during the bonding protocol with a self-etch adhesive system. *Braz J Oral Sci [internet].* 2010 Abr/Jun; 9(2): 98-103.
- Van Nieuw A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology. *Caries Res.* 2004 May-Jun; 38(3): 247-53. Pubmed PMID: 15153696.
- Eiriksson SO, Pereira PN, Swift EJ Jr, Heymann HO, Sigurdsson A. Effects of saliva contamination on resin-resin bond strength. *Dent Mater.* 2004 Jan; 20(1): 37-44. Pubmed PMID: 14698772.
- Jiang Q, Pan H, Liang B, Fu B, Hannig M. Effect of saliva contamination and decontamination on bovine enamel bond strength of four self-etching adhesives. *Oper Dent.* 2010 Mar-Apr; 35(2): 194-202. Pubmed PMID: 20420063.
- Cobanoglu N, Unlu N, Ozer F, Blatz M. Bond Strength of Self-etch Adhesives After Saliva Contamination at Different Application Steps. *Oper Dent.* 2013 Jan 17. Pubmed PMID: 23327232.
- Park JW, Lee KC. The influence of salivary contamination on shear bond

strength of dentin adhesive systems. *Oper Dent.* 2004 Jul-Aug; 29(4): 437-42. Pubmed PMID: 15279484.

14. Pinzon LM, Powers JM, O'Keefe KL, Dusevish V, Spencer P, Marshall GW. Effect of mucoprotein on the bond strength of resin composite to human dentin. *Odontology.* 2011 Jul; 99(2): 119-28. Pubmed PMID: 21516294.

15. Hanabusa M, Mine A, Kuboki T, Momoi Y, Van Ende A, Van Meerbeek B, et al. Bonding effectiveness of a new 'multimode' adhesive to enamel and dentine. *J Dent* 2012 Jun; 40(6): 475-84. Pubmed PMID: 22381614.

16. Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dent Mater.* 2005 Sep; 21(9): 864-81. Pubmed PMID: 16009415.

17. Silva e Souza MH Jr, Carneiro KG, Lobato MF, Silva e Souza PA, Góes MF. Adhesive systems: important aspects related to their composition and clinical use. *J Appl Oral Sci.* 2010 May-Jun;18(3): 207-14. Pubmed PMID: 20856995.

18. Santana FR, Pereira JC, Pereira CA, Fernandes Neto AJ, Soares CJ. Influence of method and period of storage on the microtensile bond strength of indirect composite resin restorations to dentine. *Braz Oral Res.* 2008 Oct-Dec; 22(4): 352-7. Pubmed PMID: 19148392.

19. Darabi F, Tavangar M, Davaloo R. Effect of different decontamination procedures from a saliva-contaminated cured bonding system (Single Bond). *Dent Res J (Isfahan).* 2012 Jul; 9(4): 399-403. Pubmed PMID: 23162579.

20. Loguercio AD, Barroso LP, Grande RH, Reis A. Comparison of intra- and intertooth resin-dentin bond strength variability. *J Adhes Dent.* 2005 Summer; 7(2): 151-8. Pubmed PMID: 16052764.

21. Kermanshah H, Ghabraei Sh, Bitaraf T. Effect of salivary contamination

during different bonding stages on shear dentin bond strength of one-step self-etch and total etch adhesive. *J Dent (Tehran).* 2010 Summer; 7(3):132-8. Pubmed PMID: 21998787.

22. Sattabanasuk V, Shimada Y, Tagami J. Effects of saliva contamination on dentin bond strength using all-in one adhesives. *J Adhes Dent.* 2006 Oct; 8(5): 311-8. Pubmed PMID: 17080879.

23. Guo X, Wang Y, Spencer P, Ye Q, Yao X. Effects of water content and initiator composition on photopolymerization of a model BisGMA/HEMA resin. *Dent Mater.* 2008 Jun; 24(6): 824-31. Pubmed PMID: 18045679.

24. Yoo HM, Oh TS, Pereira PN. Effect of saliva contamination on the microshear bond strength of one-step self-etching adhesive systems to dentin. *Oper Dent.* 2006 Jan-Feb; 31(1): 127-34. Pubmed PMID: 16536204.

25. Nair P, Hickel R, Ilie N. Adverse effects of salivary contamination for adhesives in restorative dentistry. A literature review. *Am J Dent.* 2017 Jun; 30(3): 156-164. Pubmed PMID: 29178762.

26. Justin RM, Paranthaman H, Rajesh AG, Varghese RP, Ranganath LM. Effect of salivary contamination on the bond strength of total-etch and self-etch adhesive systems: an in vitro study. *J Contemp Dent Pract.* 2012 Sep; 13(5): 655-60. Pubmed PMID: 23250170.

27. Santschi K, Peutzfeldt A, Lussi A, Flury S. Effect of salivary contamination and decontamination on bond strength of two one-step self-etching adhesives to dentin of primary and permanent teeth. *J Adhes Dent.* 2015 Feb;17(1): 51-7. Pubmed PMID: 25625136.

28. Pashley DH, Carvalho RM, Tay FR, Agee KA, Lee KW. Solvation of dried dentin matrix by water and other polar solvents. *Am J Dent.* 2002 Apr; 15(2): 97-102. Pubmed PMID: 12092999.

**How to cite this article /Como citar este artigo:**

Sousa LC, Rodrigues NS, Aquino EYP, Melo MAS, Cunha DA, Saboia VPA. Saliva contamination effects at different application steps on bond strength of total etch two-step adhesive. *J Health Biol Sci.* 2019 Abr-Jun; 7(2):133-138.

# Different Concentrations of Ethanol as Dentin Pre-treatment to Bonding of an Etch-and-rinse Adhesive

## Diferentes Concentrações de Etanol como Pré-Tratamento da Dentina na adesão de um Adesivo Convencional

Francisco Cláudio Fernandes Alves e Silva<sup>1</sup> , Vicente de Paulo Aragão Saboia<sup>2</sup> 

1. Docente do Programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil. 2. Docente do Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

### Abstract

**Objective:** to evaluate the bond strength (BS) to dentin pre-treated with ethanol in single application for 20 s after etching and before application of a two-step etch-and-rinse adhesive and to analyze the morphological features at the resin-dentin interface. **Methods:** twenty four third molars were collected and randomly assigned into four groups (n=5) according to the ethanol concentration: control (traditional water-wet technique), 50vol%, 70vol% and 100vol%. In experimental groups, ethanol was applied for 20 s and gently air-dried for 5 s. Bonding procedures were performed and resin composite was built up incrementally. Bonded teeth were sectioned into 0.8mm<sup>2</sup> sticks on average. These specimens were submitted to microtensile bond strength test ( $\mu$ TBS). One-way ANOVA and post hoc Tukey's test were applied to analyze statistical data ( $\alpha=0.05$ ). Light microscopy (LM) assisted by Masson's trichrome staining was used to observe the features of resin/dentin interfaces. **Results:** control BS was not different from ethanol 50vol% ( $p>0.05$ ). However, the pre-treatment using ethanol 70vol% and 100vol% showed increase on BS ( $p<0.001$  and  $p=0.003$  respectively) with no difference between these two groups. LM Showed a discrete decrease in denuded collagen fibrils to teeth treated with 70vol% and 100vol%. **Conclusion:** the pre-treatment of dentin using ethanol may increase the initial BS of resin/dentin interface when applied using 70vol% or 100vol% ethanol. Ethanol 70vol% is also able to decrease the thickness of the resin-sparse collagen fibrils.

**Key words:** Dentin bonding. Ethanol-saturated dentin. Microtensile bond strength.

### Resumo

**Objetivo:** avaliar a resistência de união (RU) à dentina pré-tratada com etanol em aplicação única por 20 s após condicionamento e antes da aplicação de um adesivo convencional de dois passos e analisar as características morfológicas na interface resina-dentina. **Métodos:** vinte e quatro terceiros molares foram coletados e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n = 5) de acordo com a concentração de etanol: controle (técnica tradicional - úmida), 50%, 70% e 100%. Em grupos experimentais, o etanol foi aplicado por 20 s e gentilmente seco ao ar por 5 s. Procedimentos de colagem foram realizados e a restauração em resina composta foi construída de forma incremental. Os espécimes foram seccionados em palitos com média de 0,8 mm<sup>2</sup> e submetidos ao teste de resistência à microtração ( $\mu$ TBS). One-way ANOVA e teste post hoc de Tukey foram aplicados para analisar os dados ( $\alpha = 0,05$ ). Microscopia ótica (MO) auxiliada pela coloração tricrômica de Masson foi usada para observar as características das interfaces resina-dentina. **Resultados:** a RU do controle não foi diferente do etanol a 50% ( $p > 0,05$ ). No entanto, o pré-tratamento utilizando etanol a 70% e 100% apresentou aumento na RU ( $p < 0,001$  e  $p = 0,003$  respectivamente) sem diferença entre esses dois grupos. MO apresentou uma diminuição discreta nas fibrilas de colágeno desnudadas nos dentes tratados com 70% e 100%. **Conclusão:** o pré-tratamento da dentina usando etanol pode aumentar a RU inicial da interface resina-dentina quando aplicado nas concentrações de 70% ou 100%. O etanol a 70% também é capaz de diminuir a espessura das fibrilas de colágeno-resina esparsas.

**Palavras-chave:** Cone-beam computed tomography. Endodontics. Root fracture. Dental radiograph.

### INTRODUCTION

A Resin-dentin bonds are less durable than resin/enamel bonds<sup>1,2,3</sup>. In fact, this is due to the fact that dentin bonding relies on organic components which are not remarkable in enamel bonding<sup>4,5,6,8</sup>. Even though the moisture after etching is essential for successful bonding using etch-and-rinse adhesives, it also affects the long-term bonding stability<sup>9,10</sup>. Although immediate bond strengths of contemporary adhesives have been acceptable and in some cases relatively high<sup>6,7,11,12</sup>, substantial decreases occurred after several sorts of aging<sup>2,8,15,14</sup>.

Resin-dentin bonding uses a partially demineralized dentin collagen matrix as the scaffold for resin infiltration, to produce a hybrid layer that couples the adhesives, the resin composite and the underlying mineralized dentin<sup>8</sup>. However, the permeation of resin monomers within exposed collagen fibrils is not complete<sup>8,15</sup> and one of the reasons for this to occur is the presence of residual water from the etch-and-rinse technique<sup>16</sup>. Water is responsible for maintaining the collagen fibrils (exposed after demineralization) optimally expanded

**Correspondence:** Francisco Cláudio Fernandes Alves e Silva - João Adolfo Gurgel Street, 133 - Cocó - Fortaleza-CE (BR) Zip Code: 60190-060, E-mail: claudiofernandes@me.com

**Conflict of interest:** There are no conflicts of interest in this research.

Received: 14 Sep 2018; Revised: 4 Jan 2019; 13 Mar 2019; Accepted: 14 Mar 2019

for the infiltration of the co-monomer blend and formation of the hybrid layer<sup>17</sup>. Nevertheless, excessive water also impairs the infiltration of hydrophobic monomers and precludes the polymerization of the resin facilitating the degradation of the bond over time<sup>5,9,18</sup>. Furthermore, the resin-sparse collagen fibrils are more susceptible to hydrolytic and enzymatic degradation<sup>10,19</sup>. Therefore, the control of water content (dentin wetness) after etching is important to create a reliable resin-dentin bond<sup>1,3,8,20,21</sup>.

In order to assist the removal of residual water and improving the infiltration of hydrophobic monomers into exposed collagen fibrils, as well as to allow the formation of a homogeneous hybrid layer (HL), it has been proposed to saturate with ethanol the etched dentin prior to the application of the two-step etch-and-rinse adhesive, the so-called “ethanol-wet-bonding”<sup>22</sup>. This technique involves the application of a gradual and increasing concentration of ethanol, starting with 50vol%, 70vol%, 80vol%, 95vol% and finally 100vol%<sup>22-26</sup>. Such process is required to allow complete exchange of water by ethanol within the partially demineralized dentin<sup>21,27</sup>. These additional clinical steps are justified to obtain a more adequate infiltration of hydrophobic monomers of the adhesive<sup>26</sup> as well as less water content which could result in higher bond strength and more durable resin-dentin interfaces<sup>23-25,28</sup>. However, this technique is considered clinically unattainable as it is laborious, time consuming and technique sensitive. In an attempt to turn the ethanol pre-treatment clinically viable, an alternative and simplified technique has been suggested, in which seven applications of 100vol% ethanol are conducted, showing promising results<sup>23-25,29,30</sup>.

Although this simplified technique presented high bond strength, it is still time consuming and unattractive to be used clinically. It would be interesting to observe the effects of ethanol pre-treatment in a single application during a shorter period prior to the adhesive application, in order to make the technique clinically acceptable.

**Table 1.** Materials used in the study.

Comercial brand	Main components	Mode of application	Manufacturer
Adper Single Bond 2	Ethanol, bis-GMA, HEMA, GDMA, polycarboxylic acid copolymer, UDMA, water ter, CQ, EDMAB, DPIHFP	Apply two layers of the adhesive resin, gently air-stream for 5 s and light-cure for 10 s	3M/ESPE
Scotchbond Etchant	35% phosphoric acid, water, silica	Apply a layer for 15 s and wash for 30 s.	3M/ESPE
Filtek Z350 XT	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, TEGDMA resins, zirconium, silica	Apply increments of 2 mm and light-cure for 20 s	3M/ESPE

### Microtensile Bond Strength ( $\mu$ TBS)

Following storage in distilled water at 37 oC for 24 h, each restored tooth was longitudinally sectioned in both “x” and “y” directions, across the bonded interface using a diamond blade

Therefore, the aim of this study was to evaluate the bond strength and morphological features of resin-dentin bonds created using ethanol pre-treatment after the etching procedures by means of a single ethanol application for 20 s. The null hypothesis tested is that ethanol saturated dentin with 50vol%, 70vol% and 100vol% does not interfere on BS.

## METHODS

### Tooth preparation

Twenty four recently extracted, caries free human third molars were used under a protocol approved by an institutional Research Ethics Committee Institution (Process #107/10). The teeth were stored in 0.01% thymol solution at 4°C and were used within 2 months after extraction. After being copiously rinsed in running water, cleaned, and pumiced, tooth crowns were cut flat using a low-speed diamond saw under water irrigation (Isomet, Buehler; Lake Bluff, USA), and a standardized smear layer was produced on the exposed coronal dentin using 600-grit wet silicon carbide paper mounted in a polishing machine (Aropol 2V – Arotec; São Paulo, SP, Brazil). The teeth were randomly assigned into four groups (n=5) according to the ethanol concentration: control (water), 50vol%, 70vol% and 100vol%. Each tooth was etched with 35% phosphoric acid gel (Scotchbond Etchant, 3M ESPE; St Paul, MN, USA) for 30 s and rinsed thoroughly with distilled water for 15 s. The excess of water was removed from the surface with absorbent paper (Mellita; São Paulo, SP, Brazil). In experimental groups, the different concentrations of ethanol were applied for 20 s in a single application. Thereafter, the adhesive and resin composite (Z350 XT 3M/ESPE St. Paul, MN, USA) applications were performed according to the manufacturer’s instructions. Each resin composite increment was light cured for 20 s with 600 mW/cm<sup>2</sup>, by light-curing unit (VALO - Ultradent - South Jordan, UT, USA). The details of all materials used are described in Table 1.

(Isomet 1000, Buehler Ltd., Lake Bluff, USA) to obtain sticks with cross-sectional areas of approximately 0.9 mm<sup>2</sup>. Each stick was measured with a digital caliper (Absolute Digimatic, Mitutoyo, Tokio, Japan) and fixed to a test apparatus (Bencor Multi-T Device - Danville Engineering, San Ramon, CA, USA) using

cianoacrylate glue (Zapit, Dental Ventures of America, Corona, CA) and stressed to failure with tensile force in a universal testing machine (Instron 4411, Canton, MA, USA) at a cross-head speed of 1 mm/min and data were collected in MPa. The bond strengths from the same bonded tooth were averaged and the mean was used as a statistical unit. The fractured beams were analyzed using a stereomicroscope (Stemi 2000-C, Carl Zeiss Jena GmbH, Germany) at 50x magnification and the failure mode classified as cohesive in dentin (CD), cohesive in resin (CR), adhesive (A) or mixed (M).

### Light Microscopy – Masson's trichrome

One tooth from each group were sectioned serial 1 mm thick resin-dentin slabs, which were fixed in a glass holder with cyanoacrylate glue (Super Bonder flex gel – Henkel Ltd., Düsseldorf, Germany) and polished with SiC papers on increasing fine grits (800, 1000, 1200 and 2500) under running water (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) reducing the slabs to about 150 µm in thickness. After polishing, the specimens were treated with Masson's trichrome staining technique, as previously described<sup>31</sup>. This staining technique has high affinity for cationic elements normally found in mineralized type I collagen, resulting in blue color. The acid etching of dentin causes the removal of these cationic elements and exposes collagen fibers showing a red pigmentation. These exposed collagen fibrils, showed by LM images, represented by a thin red colored layer at the HL, is called "red zone". Using this microscopic technique, lower incidence of red zones in the interface indicates less denuded collagen fibrils<sup>5,11</sup>. The composite resin usually stains in beige color. After all staining procedures, the specimens were covered with a glass coverslip and analyzed using light microscopy (LM) with a 400x magnification (Olympus BH-2, Tokyo, Japan). h' Trichrome was performed qualitatively.

### Statistical Analysis

SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) software was used to perform the statistical analysis. One Way ANOVA was applied to analyze the µTBS data (MPa) complemented by *post hoc* Tukey' multiple comparison test with significance level set at α=5%. Premature failures were noted but not included in the statistical analysis.

## RESULTS

### Microtensile Bond Strength - µTBS

One-way ANOVA test showed a statistically significant difference on BS between groups ( $p < 0.001$ ). Tukey multiple comparison post hoc test showed no difference between control and ethanol 50vol% ( $p > 0.05$ ), although pre-treatment with ethanol 70vol% and 100vol% showed statistically higher BS ( $p < 0.001$  and  $p = 0.003$ , respectively), with no difference between these two treatments ( $p > 0.05$ ). Mixed failures (M) were the most common fracture pattern observed in all groups. Mean bond strength and failure mode distribution are summarized in Table<sup>2</sup>.

**Table 2.** Bond Strength and distribution of Fracture Mode.

Dentin pre-treatment	µTBS*	Failure Mode			
		CD	CR	M	A
Water (control)	34,8 ± 9,8 (45) <sup>b</sup>	9	17	65	9
50 vol%	36,1 ± 9,4 (59) <sup>b</sup>	12	15	62	11
70 vol%	41,5 ± 8,8 (53) <sup>a</sup>	10	12	71	7
100 vol%	40,9 ± 8,4 (57) <sup>a</sup>	13	11	69	7

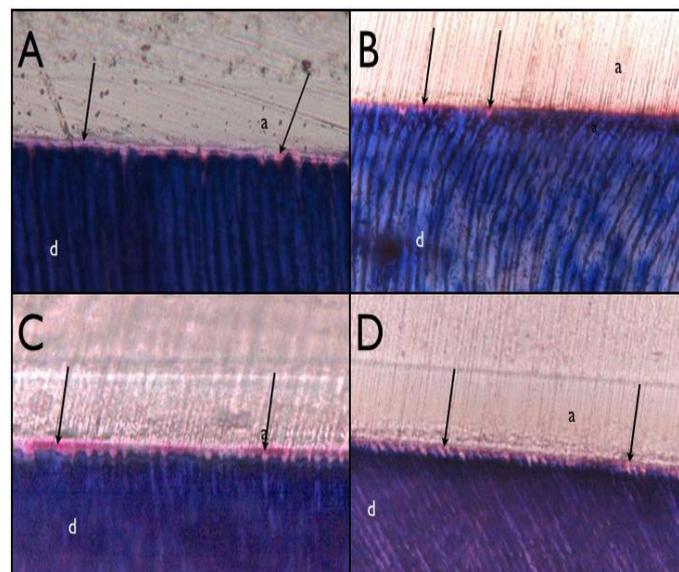
\* Bond Strength values are means ± Standard Deviations (beams/group). Different superscripts indicate statistically differences ( $p < 0.05$ ).

\*\*Failure modes pattern: CD - cohesive in dentin; CR - cohesive in resin; M - mixed; A - adhesive.

### Light microscopy - LM

Representative light microscopy (LM) images of the adhesive interface showed presence of denuded collagen fibrils in all groups, demonstrated by red zones representing non-encapsulated/exposed collagen, able to react with the stain (Fig. 1 - arrows). A thicker red zone (resin-sparse collagen) can be seen along the whole adhesive interface of control and 50vol% groups (Fig. 1A and 1B) suggesting less ability of these techniques in replacing the residual water by polymers. When dentin was treated with 70vol% and 100vol% ethanol, images showed less red zones indicating better infiltration of monomers during the hybrid layer formation, (Fig. 1C and 1D).

**Figure 1.** Light micrographs Masson's Trichrome of resin-dentin interface.



## DISCUSSION

In the present study, it could be observed that dentin pre-treatment using 50vol% ethanol applied for 20 s showed no statistical significant difference on BS ( $p>0.05$ ) in comparison with the traditional water-wet technique (control group) additionally, based on morphological features of the resin-dentin interfaces imaged by LM (Fig. 1A and 1B) we could suggest that the effectiveness in replacing water was the same for these groups. Contrariwise, 70vol% and 100vol% ethanol presented a significant increase on BS (Table 2) compared with control group ( $p<0.05$ ). The null hypothesis was rejected once 70vol% and 100vol% ethanol increased BS despite 50vol% presented similar BS to control (water). The microscopical survey showed that dentin pre-treatment using both 70vol% and 100vol% ethanol achieved higher resin infiltration than using 50vol% ethanol or water-wet bonding, as demonstrated by the less amount of red zones (Fig. 1C and 1D respectively). These findings are not in agreement with those of Sadek et al. (2010), who affirm that 100vol% ethanol applied for 30 s induced low bond strength. On the other hand, Hosaka et al. (2009) showed acceptable performance of 100vol% ethanol applied for 1 min.

Authors have reported that the interfibrillar spaces between collagen fibrils contain a hydrogel composed of proteoglycans<sup>32,33</sup>. It has been speculated that the presence of this hydrogel may interfere with comonomer infiltration during bonding<sup>5,11</sup>. However, ethanol removes the water from these spaces, causing the hydrogel to collapse, and shrinks the dehydrated collagen fibrils in a greater extent than the overall shrinkage of the collagen mesh<sup>15</sup>, thereby enlarging the interfibrillar spaces and allowing more resin infiltration resulting in a resin-dentin interface with less denuded collagen fibrils<sup>28,37</sup>. By LM, the dentin pre-treatment using 70vol% and 100vol% ethanol (Fig. 1C and 1D, respectively) presented less incidence of red zones than the control and 50vol% ethanol (Fig. 1A and 1B, respectively). It may be speculated that the former groups achieved improved resin infiltration and reduced resin-sparse collagen which could likely decrease the degradation of the resin-dentin interface.

Although ethanol-saturated dentin might be a better substrate for adhesive infiltration, it may be taking into account that ethanol evaporates faster than water, due to its higher vapor pressure<sup>22</sup>. Thus, the high volatility of 100vol% ethanol and its rapid evaporation may lead collagen fibrils to collapse unless a continuous and time-consuming application is performed<sup>22-25</sup> which sometimes reduces the clinical feasibility of the technique. Although 70vol% ethanol also has a relatively high volatility, the presence of water in its composition decreases its evaporation thereby facilitating the exchange of water and maintenance of the interfibrillar spaces. In fact, this procedure allows better infiltration of the resin comonomer blend<sup>29</sup>. However, in order to accomplish the optimal resin infiltration, the operator needs to avoid over-wet and over-dry situations which is easier to be

controlled using 70vol% ethanol<sup>22-25,29</sup>. Furthermore, the water present in 70vol% ethanol facilitates the passage of ethanol through the bacteria cell wall which attains its well-known antibacterial properties<sup>34,38</sup>.

The hydrophobic monomers are more soluble in ethanol than in water<sup>35</sup>, and most of the dental adhesives are currently ethanol/water solvated mixtures of different sorts of monomers. Nevertheless, the degradation of the resin-dentin interface is remarkably reduced using more hydrophobic monomers which have higher affinity to ethanol-saturated dentin<sup>36</sup>. Therefore, it is possible that most of current adhesives may exhibit enhanced penetration in ethanol-wet partially demineralized dentin matrix<sup>36</sup>.

In an etched and rinsed dentin, the surface remains water-saturated avoiding the collagen shrinkage, and after the experimental treatments the ethanol concentration would certainly diminish. In other words, the 50vol% ethanol when in contact with this water-saturated dentin would be diluted (<50% ethanol), leaving the partially demineralized dentin predominantly water-wet. The same dilution could occur with 70vol% and 100vol% ethanol creating respectively <70% and <100% ethanol concentrations in the substrate. However, even after the dilution, these concentrations (70% and 100%) would likely saturate the partially demineralized dentin into a predominantly ethanol-wet surface due to the higher amount of ethanol. As previously demonstrated<sup>22</sup>, the overall solubility parameter of dental adhesive resins is higher in ethanol than in water. Therefore, the solubility and infiltration of the comonomer blend in a predominantly ethanol-wet substrate would be improved. This may explain the outcomes observed in the present investigation for 70vol% and 100vol% ethanol pre-treatment (Table 2 and Fig. 1). Indeed, in the 50vol% ethanol pre-treated dentin, this solvent was not able to significantly improve the BS and resin infiltration due to the increasing in the overall water content.

Despite the limitations of this in vitro study, the simplified application of 70vol% and 100vol% ethanol prior to the application of a two-step etch-and-rinse adhesive demonstrated to be effective in terms of initial dentin bonding performance. However, more investigations should be undertaken to confirm the efficacy of such dentin pre-treatments.

## CONCLUSION

To conclude, the dentin pre-treatment using ethanol increased the bond strength of the resin-dentin interface when used in 70vol% or 100vol% concentrations.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by FUNCAP (BMD-0008-00071.01.07/09).

## REFERENCES

1. Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc* 2003 Dec; 69(11): 726-731.
2. Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent Advances in The Theory and Mechanism of Adhesive Resin Bonding to Dentin: a Critical Review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Feb; 88(2): 558-78. doi: 10.1002/jbm.b.31253.
3. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore Memorial Lecture. Adhesion to Enamel and Dentin: Current Status and Future Challenges. *Oper Dent* 2003 May-Jun; 28:215-35.
4. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo Degradation of Resin-dentin Bonds in Humans Over 1 to 3 Years. *J Dent Res* 2000 Jun; 79(6): 1385-91.
5. Carvalho RM, Mendonça JS, Santiago SL, Silveira RR, Garcia FCP, Tay FR, et al. Effects of HEMA/solvent Combinations on Bond Strength to Dentin. *J Dent Res* 2003 Aug; 82(8): 597-601.
6. Loguercio AD, Reis A, Ballester RY. Polymerization Shrinkage: Effects of Constraint and Filling Technique in Composite Restorations. *Dent Mater* 2004 Mar; 20(3):236-43.
7. Loguercio AD, Moura SK, Pellizaro A, Dal-Bianco K, Patzlaff RT, Grande RH, et al. Durability of Enamel Bonding Using Two-Step Self-Etch Systems on Ground and Unground Enamel. *Oper Dent* 2008 Jan-Feb; 33(1): 79-88. doi: 10.2341/07-42.
8. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental Adhesion Review: Aging and Stability of The Bonded Interface. *Dent Mater* 2008 Jan; 24(1): 90-101.
9. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year Water Degradation of Total-Etch Adhesives Bonded to Dentin. *J Dent Res* 2003 Feb; 82(2): 136-40.
10. Garcia-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Feilzer A, Tjäderhane L, Pashley EL. Degradation of Resin-bonded Human Dentin After 3 Years of Storage. *Am J Dent* 2007 Apr; 20(2):109-13.
11. Nishitani Y, Yoshiyama M, Donnelly AM, Agee KA, Sword J, Tay FR, Pashley DH. Effects of Resin Hydrophilicity on Dentin Bond Strength. *J Dent Res* 2006 Nov; 85(11): 1016-21. doi: 10.1177/154405910608501108.
12. Saboia VP, Silva FC, Nato F, Mazzoni A, Cadenaro M, Mazzotti G, et al. Analysis of Differential Artificial Ageing of the Adhesive Produced by a Two-step Etch-and-rinse Adhesive. *Eur J Oral Sci* 2009 Oct; 117(5): 618-24. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00665.x.
13. Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. Single-step Adhesives are Permeable Membranes. *J Dent* 2002 Sep-Nov; 30(7-8): 371-82.
14. Tay FR, Pashley DH. Water Treeing - A Potential Mechanism for Degradation of Dentin Adhesives. *Am J Dent* 2003 Feb; 16(1): 6-12.
15. Tay FR, Pashley DH, Kapura RR, Carrilho MRO, Hur YB, Garrett LV, Tay KCY. Bonding BisGMA to dentin - A proof of Concept for Hydrophobic Dentin Bonding. *J Dent Res* 2007 Nov; 86(11): 1034-39.
16. Toledano M, Osorio R, Osorio E, Aguilera FS, Yamauti M, Pashley DH, et al. Durability of resin-dentin bonds: effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dent Mater* 2007 Jul; 23(7): 885-92.
17. Nakabayashi N, Nakamura M AND Yasuda N. Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. *J. Esthetic Rest Dent* 1991 Jul; 3(4):133-38. doi: https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.1991.tb00985.x.
18. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Russel CM, Pashley DH. Tensile Properties of Resin- Infiltrated Demineralized Human Dentin. *J Dent Res* 1995 Apr; 74(4): 1093-102.
19. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Tjäderhane L, Toledano M, et al. Reactivation of Inactivated Endogenous Proteolytic Activities in Phosphoric Acid- etched Dentin by Etch-and-rinse Adhesives. *Biomaterials*. 2006 Sep; 27(25): 4470-76.
20. Van Dijken JW, Sunnergardh-Grönberg K, Lindberg A. Clinical Long-Term Retention of Etch-And-Rinse and Self-Etch Adhesive Systems in Non-Carious Cervical Lesions. A 13 Years Evaluation. *Dent Mater* 2007 Sep; 23(9): 1101-07.
21. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in Bonding to Dentin and Experimental Strategies to Prevent Bond Degradation. *J Dent Res* 2011Aug; 90(8):953-68. doi: 10.1177/0022034510391799.
22. Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM, Rueggeberg FA, Agee KA, Carrilho M, et al. From Dry Bonding to Water-wet Bonding to Ethanol-wet Bonding. A Review of The Interactions Between Dentin Matrix and Solvated Resins Using a Macromodel of The Hybrid Layer. *Am J Dent* 2007 Feb; 20(1): 7-20.
23. Sadek FT, Pashley DH, Nishitani Y, Carrilho MR, Donnelly A, Ferrari M, et al. Application of The Hydrophobic Resin Adhesive to Acid-etched Dentine With an Alternative Wet Bonding Technique. *J Biomed Mater Res* 2008 Jan; 84(1): 19-29. doi: 10.1002/jbm.a.31290.
24. Sadek FT, Castellan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, et al. One-year Stability of Resin-dentin Bonds Created with a Hydrophobic Ethanol-wet bonding Technique. *Dent Mater* 2010 Apr; 26(4): 380-86. doi: 10.1016/j.dental.2009.12.009.
25. Sadek FT, Mazzoni A, Breschi L, Tay FR, Braga RR. Six-month Evaluation of Adhesives Interface Created by a Hydrophobic Adhesive to Acid-etched Ethanol-wet Bonded Dentine With Simplified Dehydration Protocols. *J Dent* 2010 Apr; 38(4): 276-83. doi: 10.1016/j.jdent.2009.11.007.
26. Osorio E, Toledano M, Aguilera FS, Tay FR, Osorio R. Ethanol Wet-bonding Technique Sensitivity Assessed by AFM. *J Dent Res* 2010 Nov; 89(11): 1264-69. doi: 10.1177/0022034510376403.
27. Guimarães LA, Almeida JCF, Wang L, D'Alpino PHP, Garcia FCP. Effectiveness of Immediate Bonding of Etch-and-rinse Adhesives to Simplified Ethanol-saturated Dentin. *Braz Oral Res* 2012 Mar-Apr; 26(2): 177-82. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242012000200015.
28. Hosaka K, Nishitani Y, Tagami J, Yoshima M, Brackett WW, Agee KA, et al. Durability of Resin-Dentin Bonds to Water- vs. Ethanol-saturated Dentin. *J Dent Res* 2009 Feb; 88(2):146-51. doi: 10.1177/0022034508328910.
29. Li F, Liub XY, Zhangc L, Kangd JJ, Chene JH. Ethanol-wet Bonding Technique May Enhance the Bonding Performance of Contemporary Etch-and-Rinse. *J Adhes Dent* 2012 Apr; 14(2): 113-20. doi: 10.3290/jjad.a21853.
30. Huang X, Li L, Huang C, Du X. Effect of Ethanol-wet Bonding With Hydrophobic Adhesive on Caries-affected Dentine. *Eur J Oral Sci* 2011 Aug; 119(4): 310-15. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00830.x.
31. Garcia Del Moral R. Coloraciones para fibras colagenas y elasticas del tejido conjuntivo, Coloraciones para sustancia amiloidea. In: Garcia del Moral R, editor. *Laboratorio de Anatomia Patologica*. Madrid: McGraw-Hill; 1993. p.175-8.
32. Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12(4): 331-349.
33. Pereira PN, Bedran-de-Castro AK, Durante WR, Yamauti M. Removal of noncollagenous components affects dentin bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007 Jan; 80(1): 86-91.

34. Chambers ST, Peddie B, Pithie A. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. *J Hosp Infect.* 2006 Jun; 63(2):193-6. doi: 10.1016/j.jhin.2006.01.009.
35. Cadenaro M, Breschi L, Rueggeberg FA, Agee K, Di Lenarda R, Carrilho M, et al. Effect of adhesive hydrophilicity and curing time on the permeability of resins bonded to water vs. ethanol- saturated acid-etched dentin. *Dent Mater* 2009 Jan; 25(1): 39-47. doi: 10.1016/j.dental.2008.05.004.
36. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid- etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater* 2010 Apr; 26(4): 368-379. doi: 10.1016/j.dental.2009.12.008.
37. Ayar MK. A review of ethanol wet-bonding: Principles and techniques. *Eur J Dent.* 2016 Jan-Mar; 10(1): 155-159. doi: 10.4103/1305-7456.175687.
38. Talungchit S, Jessop JLP, Cobb DS, Qian F, Geraldeli S, Pashley DH, et al. Ethanol-wet bonding and chlorhexidine improve resin-dentin bond durability: quantitative analysis using raman spectroscopy. *J Adhes Dent* 2014 Oct; 16(5): 441-50. doi: 10.3290/j.jad.a32695.

**Como citar este artigo/How to cite this article:**

Silva FCFA, Saboia VPA. Diferentes Concentrações de Etanol como Pré-Tratamento da Dentina na adesão de um Adesivo Convencional. *J Health Biol Sci.* 2019 Abr-Jun; 7(2):139-144

# Extraction and purification of RNA from human carious dentine: an approach to enable bacterial gene expression studies

## Extração e purificação de RNA proveniente de dentina humana cariada: uma abordagem para viabilizar estudos de expressão gênica

Daniela da Silva Bezerra<sup>1</sup> , Beatriz Gonçalves Neves<sup>2</sup> , Sarah Florindo de Figueiredo Guedes<sup>3</sup> , Wanessa Fernandes Matias Regis<sup>4</sup>   
Rafael Nóbrega Stipp<sup>5</sup> , Lidiany Karla Azevedo Rodrigues<sup>3</sup> 

1. Faculty of Dentistry, Christus University Center (UNICHRISTUS), Fortaleza, Ceará, Brazil. 2. Faculty of Dentistry, Federal University of Ceará (UFC), Sobral, Ceará, Brazil. 3. Post-graduation Program, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil. 4. Department of Pathology and Legal Medicine, College of Medicine, Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil. 5. Department of Microbiology and Immunology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, SP, Brazil.

### Abstract

**Background:** RNA isolation from bacteria within dentine caries lesions could be difficult due to reduced amount of collectable biomass and high mRNA instability. Attempting to overcome this challenge we describe one protocol developed to extract and purify total RNA from dentine lesions. **Objective:** customize a bacterial RNA extraction and purification method from human carious dentine. **Methods:** quantity and purity of extracted RNA were measured with a microvolume UV-VIS spectrophotometer, RNA integrity was assessed by standard denaturing agarose gel electrophoresis and images were captured under ultraviolet light with camera and analyzed. DNase treatment removed genomic DNA and an additional step of purification was carried out in silica spin column. **Results:** final yield (ng/ $\mu$ l) was  $67.01 \pm 22.33$ , absorbance ratio A260/A280 =  $2.0 \pm 0.07$  and RNA integrity were obtained. The purified samples were reversely transcribed and the expression of *atpD* and *fabM* gene from *Streptococcus mutans* analyzed by quantitative real-time PCR. **Conclusion:** the extraction methodology developed produced high-quality RNA from dentine microbiota for transcriptional analysis.

**Key words:** Dentine Caries. RNA Extraction. Gene Expression. *Streptococcus mutans*.

### Resumo

**Introdução:** o isolamento de RNA de bactérias dentro de lesões de dentina cariada pode ser difícil devido à quantidade reduzida de biomassa e alta instabilidade de mRNA. Na tentativa de superar esse desafio, descrevemos um protocolo desenvolvido para extrair e purificar o RNA total das lesões dentinárias. **Objetivo:** personalizar um método de extração e purificação de RNA bacteriano a partir da dentina cariada humana. **Métodos:** a quantidade e a pureza do RNA extraído foram medidas com um espectrofotômetro UV-VIS de microvolume, a integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante padrão e as imagens foram capturadas sob luz ultravioleta e analisadas. O tratamento com DNase removeu o DNA genômico e uma etapa adicional de purificação foi realizada em coluna de spin de sílica. **Resultados:** o rendimento final (ng /  $\mu$ l) foi de  $67,01 \pm 22,33$ , a razão de absorvância A260 / A280 =  $2,0 \pm 0,07$  e a integridade do RNA foram obtidas. As amostras purificadas foram transcritas reversamente e a expressão do gene *atpD* e *fabM* de *Streptococcus mutans* analisadas por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). **Conclusão:** a metodologia de extração desenvolvida produziu RNA de alta qualidade da microbiota dentinária para análises transcricionais.

**Palavras-chave:** Cárie Dentinária. Extração de RNA. Expressão Gênica. *Streptococcus mutans*.

### INTRODUCTION

Dental caries is a progressive disorder that begins with demineralization of tooth tissues associated with dysbiosis of the colonizing microbiota<sup>1</sup>. To have a better understanding about microbial roles in dental caries process, several molecular methods of investigation have been adopted in the last years. Among them, RNA-based analysis focus in detection of metabolically active microbial members and identification of

genes expressed under different circumstances<sup>2,3</sup>. The majority of RNA-based investigations of oral microbiota analyzed only planktonic cells<sup>4</sup>, in vitro biofilms<sup>5,6,7</sup> or in vivo biofilms from rodent animals<sup>8,9</sup>. Although the first transcriptomic studies of human dental biofilm<sup>10,11</sup> and dentine<sup>12,13</sup> were carried out, just a few articles showed is given about technical procedures, RNA yield, purity and integrity from these human samples

**Correspondence:** Lidiany K. A. Rodrigues, DDS, MSc, PhD, Associate professor Postgraduate Program in Dentistry, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil. Rua Monsenhor Furtado - S/N - Rodolfo Teófilo - Zip code: 60430-355. Email: lidianykarla@yahoo.com

**Conflict of interest:** There are no conflicts of interest in this research.

Received: 1 Mar 2019; Revised: 10 Mar 2019; 20 Mar 2019; Accepted: 22 Mar 2019

studies<sup>13,14</sup>. Besides, more attention has been requested about transcriptional studies in human dentinal caries, which can reflect the behavior of cariogenic bacteria in loco<sup>2</sup>.

The success of any transcriptional analysis depends not only on the amount of RNA extracted, but mainly on RNA quality, because the purity and integrity of this molecule can impact the accuracy of techniques such as RT-qPCR and microarrays<sup>15,16</sup>. Therefore, an absorbance ratio A260/A280  $\approx$  2.0 and detection of 16S and 23S rRNA bands with integrity and without smearing should be observed to consider a "high quality" intact RNA<sup>17</sup>.

Despite the carious dentine being a site of a diversity of bacteria, such as *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Veillonella*<sup>18</sup>, some particular limiting factors can hamper the obtaining of adequate quantity and quality of RNA, such as low amount of carious biomass per sample<sup>5</sup> and low proportion of bacteria when compared to other in vivo samples (e.g., oral biofilm)<sup>19,20</sup>. Furthermore, bacterial characteristics can also interfere with the adequate messenger RNA (mRNA) acquisition: (1) the high percentage of ribosomal RNA (rRNA) accounting for over 90 percent of total RNA, especially those with positive metabolic activity; (2) the relatively short half-life of mRNA; (3) rigid and thick cell walls of Gram-positive<sup>21</sup>. Besides, RNA concentration and quality can be definitely influenced by adequate and well-conducted extraction and purification techniques based on the nature of the samples<sup>21</sup>.

In an effort to solve possible challenges in RNA extraction from carious dentine and to establish an approach to enable bacterial transcriptional studies, the objective of this research was to customize a bacterial RNA extraction and purification method from human carious dentine.

## MATERIAL AND METHODS

### Study population and ethical statements

In order to collect the sample, one hundred eighty-one children from 48 to 71-month-old were examined in three public schools in Fortaleza, Ceará, Brazil, by a previously calibrated examiner (intraexaminer weighted kappa = 0.72). Of these, fourteen children were diagnosed with Early Childhood Caries (ECC) and met the inclusion criteria: the children had one or more primary teeth with at least one carious surface with distinct cavity and visible dentine without pulpal disease (confirmed by clinical and radiographic examination); the parent or guardian were willing to consent to the child's clinical examination and dentine sampling. The study excluded children that were sick or that had a bad behavior at the moment of the dental examination; and that had used antibiotics within the last 3 months. The study design was explained to the child's parent or guardian before the dental examination, from whom informed consent was obtained if they were disposed to participate with their child. The Ethics Committee of the Federal University of Ceará, protocol number 548.405, approved the study design, protocol, and informed consent.

### Sample Collection

One tooth with visible dentinal caries selected from each child was cleaned with pumice and local anesthesia was delivered prior to sample collection. The carious teeth were isolated with rubber dam cleaned with 2% chlorhexidine and the carious dentine from cavities was removed using individual, sterilized and RNase-free spoon excavators (S.S. White Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), whose size was determined by the dimension of the lesion. These instruments were submitted previously to autoclaving sterilization and heated at 200 °C for 18 hours to eliminate RNases<sup>22</sup>. During excavation, dentine hardness was checked and caries removal was considered completed when hard dentine was detected with a probe (S.S. White Duflex). Dentine was considered hard when, at applying a firm pressure, the probe was not able to penetrate into the tissue<sup>23</sup>. It is important to note that the biofilm layer found over the lesions in contact with the oral environment was detached before sample collection. The samples were immediately transferred to sterile RNase-free microtubes (Axygen, Union City, CA, USA) containing RNA stabilizer solution (RNAlater<sup>TM</sup> - Ambion Inc., Austin, TX, USA) and stored at 4 °C for 18 hours. After this period, the tubes were transferred to freezer (-80 °C) for storage until RNA extraction.

Cavities were lined and restored with a suitable restorative material and dental appointments were scheduled for continuing treatment if these were needed. In addition, the children and their parent or guardian were instructed about caries prevention.

### RNA extraction and purification

The dentine samples were thawed and centrifuged (11,000  $\times$ g/ 1 min/ 4°C). The RNAlater<sup>TM</sup> solution was removed using an automatic pipettor without disturbing the pellet. The samples were carefully transferred to cryogenic tubes containing 0.16 g of 0.1 mm diameter zirconium beads. The mechanical disruption of bacterial cells was made by Mini-Beadbeater (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, USA) at maximum power (2 cycles of 60 s with 1 min rest on ice). Then, 850  $\mu$ l of RLT buffer (Qiagen, Valencia, CA, USA) with 10% of  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) was added and the suspension homogenized by vortexing. After centrifugation (11,000  $\times$  g/ 2 min/ 4 °C), 2 aliquots of 350  $\mu$ l of the supernatant were transferred to microtubes with 250  $\mu$ l of pure ethanol, and vortexed. Next, the solutions were transferred to silica spin columns from RNeasy Minikit<sup>TM</sup> (Qiagen, Valencia, CA, USA) and centrifuged (11,000  $\times$  g/ 30 sec/ 20 °C) to allow RNA binding to the silica. After discarded the flow-through, 700  $\mu$ l of RW1 buffer was added on it column, centrifuged (11,000  $\times$  g/ 30 s/ 20°C) and discarded. Then, 500  $\mu$ l of RPE buffer was added, centrifuged (11,000  $\times$ g/ 30 s/ 20°C) and discarded. This operation was repeated. After additional centrifugation (11,000  $\times$  g/ 2 min/ 20°C) for removal of residual RPE buffer, each column was positioned in a new tube and 40  $\mu$ l of RNase-free water was dispensed on the center of it. After centrifugation (11,000  $\times$ g/ 1 min/ 20 °C), the RNA through the

column was collected, and immediately stored at -80 °C freezer.

RNA concentration (ng/ µl) and purity (absorbance ratio A260/A280) were verified by Nanodrop 2000c microvolume spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) and the integrity was verified by the detection of the 16S and 23S bands of rRNA in 1.2% formaldehyde agarose gel stained with ethidium bromide. Digital images were captured under ultraviolet light camera and analyzed by Gel Logic 200 Imaging System software (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA).

#### DNase treatment and additional purification

The two aliquots of RNA obtained from each sample was joined and submitted to treatment with Turbo™ DNase kit (Applied Biosystems, Ambion, Austin, TX, USA) to removal genomic DNA. Five µl of enzyme and 9 µl of buffer from kit were added to RNA sample and incubated at 37 °C for 15 min. Then, an additional purification step was executed by addition of 300 µl of RLT and 250 µl of pure ethanol to the sample. This solution was vortexed and transferred to silica spin columns from RNeasy MiniElute™ CleanUp kit (Qiagen, Dus, Bundesland, Germany). The purification steps previously described, including addition of RW1 and RPE buffers were repeated. Next, to elute the ultra-purified RNA, 40 µl of RNase-free water were added in the center of the silica column and centrifuged (11,000 ×g/ 1 min/ 4°C). Concentration and integrity of the RNA were checked.

#### cDNA synthesis

The cDNA was synthesized from the RNA using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Reverse transcription reactions were prepared with 6 µl of 5x iScript reaction mix, 1 µl of iScript reverse transcriptase, 1 µg of purified RNA and RNase-free water in sufficient amount for final volume of 30 µl. The prepared solution was homogenized by vortexing for 5 s and incubated at 25 °C for 5 min, heating at 42 °C for 2 h and incubated at 85 °C for 5 min in a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Afterwards, the concentration of cDNA from all samples was adjusted to 10 ng/µl.

#### Sanger sequencing

Six cDNA samples were submitted to conventional PCR with primers for genes from *Streptococcus mutans* (SM) related to their tolerance acid: *atpD* (5'-TGTTGATGGTCTGGGTGAAA-3' and 5'-TTTGACGGTCTCCGATAACC-3') (Xu et al., 2011) and *fabM* (5'-CTGATTAATGCCAATGGGAAAGTC and 5'-TGCGAACAAAGAGATTGTACATCATC-3') 21 and subsequently to Sanger sequencing. The objective was to investigate specificity of the primers for SM genes in human samples, since these primers were used only in vitro studies. PCR assays were executed in a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the reaction mix included 1 µl of Buffer PCR 10x, 1 µl of dNTPs 10mM, 2.5 µl of MgCl<sub>2</sub>, 3 µl of each primer F/R 10 µM, 0.25 µl of Taq polymerase 5 U/µl, 50 mM 1 µl of

template cDNA (10 ng/µl) and 37.25 µl of nuclease-free water. The thermal-cycling consisted in 5 min at 95°C; 35 cycles of 15 s at 95 °C, 60 s at 60 °C and 20 s at 72 °C; 4 min at 60°C. Their products were purified with commercial kit (QIAquick® PCR Purification Kit, QUIAGEN, USA) and the sequencing reactions were performed using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and submitted to thermal-cycling (20 s at 95 °C; 40 cycles of 15 s at 96 °C, 15 s at 50 °C and 4 min at 60 °C; 60s at 60 °C). At the end, the products were precipitated, dried, resuspended in 10 µl of formamide and denatured for 5 min at 95°C. Sanger sequencing occurred in a 3500 Series Genetic Analyzer (8-capillary) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequencing data obtained was submitted to BioEdit software, version 7.2.5, to obtain contigs sequences, The BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://estexplorer.biolinfo.org/hsd>) program was used to analyze sequences similarity.

#### Reverse Transcription – Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

In order to get DNA from *S. mutans* UA159 to obtain standards curves, this strain was cultured in broth for 24 h as recommended by Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>25</sup>. After centrifugation and washing in sterile saline solution (sodium chloride 0.9%), the quality and purity of bacterial cultures were checked by Gram staining and their DNA was recovered using an organic extraction protocol based on phenol/chloroform purification and alcohol precipitation<sup>26</sup>. Serial dilutions starting from 600 ng to 0.0006 ng (10-fold) of *S. mutans* DNA concentrations were used as standards and positive controls for relative quantification of the targeted bacteria. A standard amplification curve and a melting-point product curve were obtained for each primer set.

The RT-qPCR assays were performed to test the functionality of RNA extracted in gene expression studies using a StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reactions were performed using MicroAmpFast Optical 48-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) covered with Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). A mixture of 5 µl of Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2.4 µl of nuclease-free water, 0.3 µl of each primer F/R 10 µM and 2 µl of cDNA (20 ng) was added in each spot of a 48-well plate. Assays were carried out in duplicate, and the final analyses were based on the mean of the two reactions. Negative control included reactions without template. The standard curves were used to transform the quantification cycle (Cq) values to the mass of cDNA amplified. The normalization of gene expression was made using the ratio between final mass of cDNA detected and cDNA amount initially inserted in each reaction.

## RESULTS

A total of 14 dentine caries samples was collected and yielded 25.5±9.7 mg average of dentine carious tissue

(Values: maximum= 39,4 mg and minimum= 10,3 mg). After applying the customized method of total RNA extraction and purification from this substrate, we obtained adequate RNA yield ( $67.01 \pm 22.33$  ng/ $\mu$ l - values: maximum= 130,3 ng/ $\mu$ l and minimum= 46,05 ng/ $\mu$ l), purity ( $A_{260}/A_{280} = 2.00 \pm 0.07$ ) and

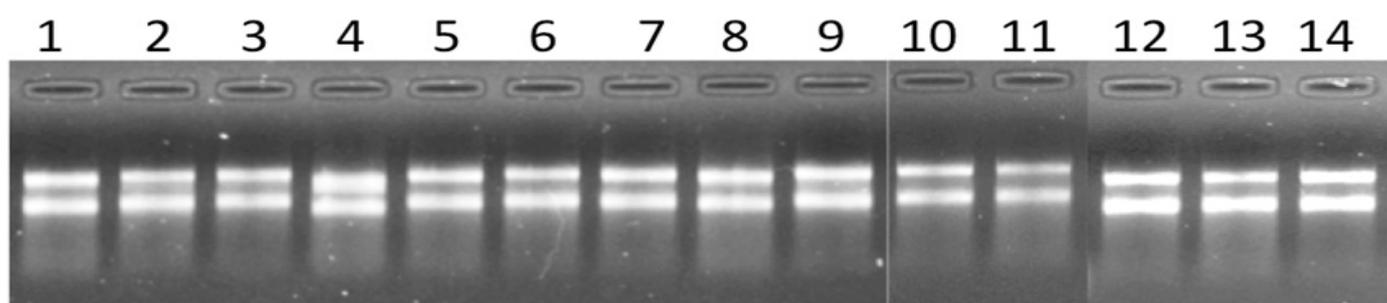
integrity (Table 1 and Figure 1). Results of atpD and fabM gene expression for *Streptococcus mutans* were also shown in table 1. Amplification plot, standard curve and melt curve for atpD and fabM gene expression were presented in Figure 02a and Figure 2b, respectively.

**Table 1.** RNA yield before and after DNase treatment, purity and gene expression values of *S. mutans* from dentine lesions (n=14). Values are mean  $\pm$  standard deviation. cDNA mass used to begin the RT-qPCR (20 ng) was used for normalization of gene expression.

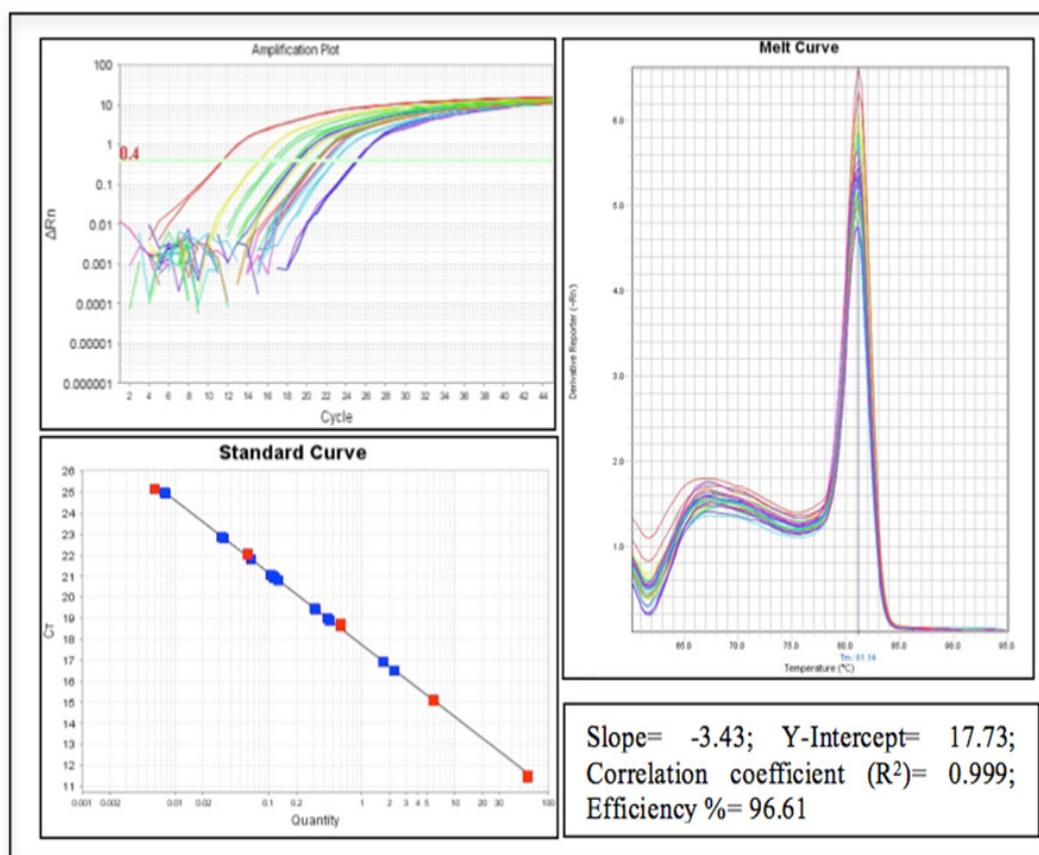
Initial yield (ng/ $\mu$ l)	Final yield (ng/ $\mu$ l)	Ratio (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	atpD gene expression	fabM gene expression
$92.54 \pm 27.15$	$67.01 \pm 22.33$	$2.00 \pm 0.07$	$0.007 \pm 0.010$	$0.007 \pm 0.012$

a = atpD mass (ng)/ 20 ng cDNA; b = fabM mass (ng)/ 20 ng cDNA

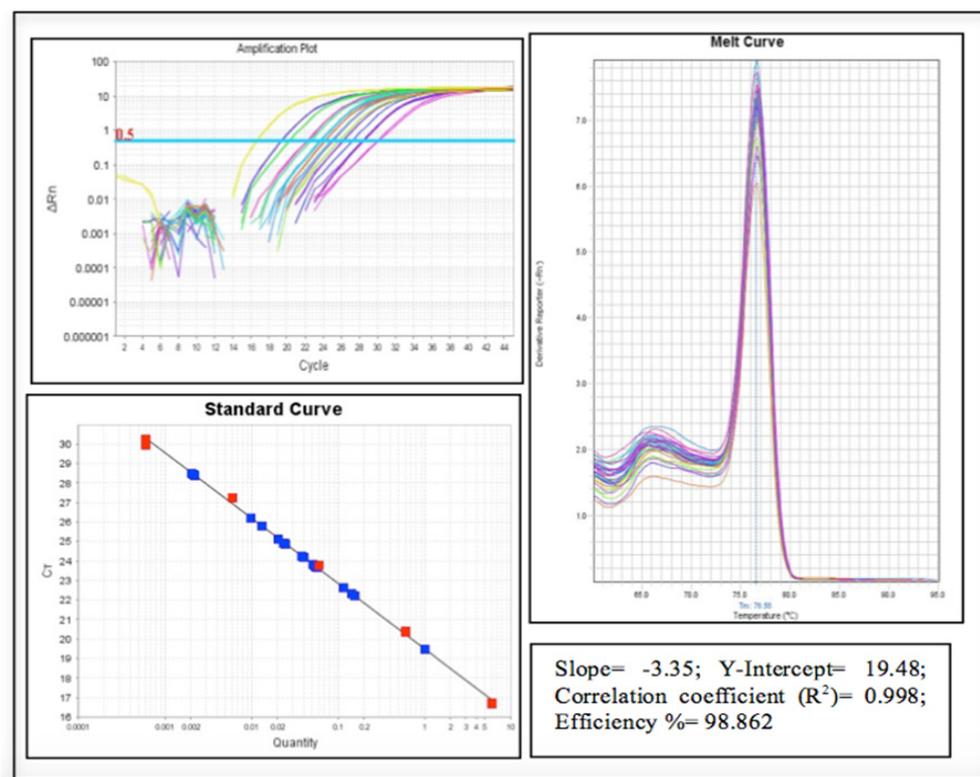
**Figure 1.** RNA integrity (16S and 23S bands) (n=14).



**Figure 2a.** RT-qPCR amplification plot and standard curve data for atpD gene from *S. mutans*. The values of expression detected for the tested samples (depicted in blue) are within the standard curve range (depicted in red).



**Figure 2b.** RT-qPCR amplification plot and standard curve date for fabM gene from *S. mutans*. The values of expression detected for the tested samples (depicted in blue) are within the standard curve range (depicted in red)



## DISCUSSION

Considering the importance of a better understanding of the bacterial behavior in carious sites<sup>2</sup>, the current research established a methodology for RNA extraction and isolation to enable bacterial gene expression studies from human carious dentine samples. The majority of transcriptional studies of cariogenic bacteria was performed in planktonic cells in vitro and in vivo biofilms<sup>7,9,11</sup>, substrates where higher bacterial concentration is found when compared to dentine caries lesions<sup>19</sup>.

Ecological factors of dentin caries have been poorly studied, possibly due to the complex structural composition of this tissue<sup>25</sup>. Besides that, other limitations factors, such as low amount of carious biomass per sample, mainly in deciduous teeth, due the proper low dimension of the teeth organ, could hinder the achievement of RNA extraction<sup>27</sup>. Some studies used in vivo carious dentine tissue from extracted permanent teeth from adults with large occlusal soft and active carious lesions, which enables a higher quantity of carious dentinal tissue<sup>14</sup>.

Several studies have described different RNA extraction protocols for different tissues, however, each one showed particular difficulties for isolation of proper amounts and high quality of RNA, since the efficiency of each method is highly dependent of the tissue composition<sup>28,29</sup>. In this study, the samples were collected from deciduous teeth and yielded an average weight of 25.5±9,7 mg of dentine per lesion, which is

considered a low amount, when compared to other substrates, such as biofilms from in vitro studies (2100 mg dry weigh)<sup>30</sup>. Moreover, a reduced number of bacteria within dentine in relation to in vivo biofilms<sup>19</sup> and the reduced quantity of mRNA in metabolically active bacteria<sup>11</sup> can hamper the achievement of acceptable quantity and quality of RNA. However, despite the nature of the tissue, our results showed yield (67.01 ± 22.33 ng/ µl), purity (A260/ A280 = 2.00 ± 0.07) and integrity of RNA sufficient for RT-qPCR assays, revealing a successful isolation protocol for extraction of RNA for dentine carious tissue.

Our adequate results were acquired from a customized method based on mechanical cell disruption (bead-beating) and a commercial kit. Mechanical disruption has several advantages over the traditional methods of cell lysis (lysis buffer, manual disruption and liquid nitrogen) including reduction of work time, multiple sample extraction and a reduction of cross contamination risks<sup>30</sup>. Moreover, this is a recognized method to obtaining better RNA yield and quality<sup>6,8,25</sup>, due to its capacity of lysing any bacterial cell wall and release all nucleic acids from the cells without degrade them<sup>27</sup>. Besides, we used a commercial extraction kit based on guanidine thiocyanate salts added of β-ME, which irreversibly denature RNases<sup>30</sup>, reduces time-consuming and avoid contact with toxic products such as phenol/chloroform<sup>30</sup>, occurring with previous techniques for RNA extraction from oral biofilms<sup>5,9,32</sup>. Authors was found relating RNA extraction from human carious dentine, using lysis buffer associated with sonication or commercial kit singly or

associated to mechanical disruption, however no details about methodology steps, yield and quality of RNA extracted were demonstrated<sup>12,13,34</sup>.

Additional RNA purification with RNeasy MiniElute™ CleanUp kit was performed in our research to guarantee the elimination of salt and other possible contaminants<sup>34,35</sup>, as well as to improve RNA yield<sup>33,31</sup>. The purified RNA samples showed good performance in reverse transcriptase reactions, since the cDNA templates were amplified with efficiency in RT-qPCR assays. These reactions were performed with *S. mutans* primers associated with bacterial virulence (atpD and fabM), responsible for its acidogenic and aciduric properties. Besides, even in low presence in the bacterial population from carious dentine as cited by some authors<sup>9,12,17</sup>, *S. mutans* genes were detected in our RT-qPCR, confirming the efficiency of this customized RNA extraction method.

## CONCLUSION

The cell mechanical disruption associated to the adapted use of commercial kits was considered an acceptable RNA extraction and purification method from carious dentine and, consequently, satisfactory for bacterial gene expression studies. With this finding, bacterial transcriptional researches in human dentinal caries can be well conducted and can promote new knowledge about behavior of bacteria in dentinal sites.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by CNPq (475346/2011-4 -MCT/CNPq 14/2011 Universal).

## REFERENCES

1. Neves BG, Stipp RN, Bezerra DDS, Guedes SFF, Rodrigues LKA. Quantitative analysis of biofilm bacteria according to different stages of early childhood caries, Arch Oral Biol. 2018 Dec; 96:155-161. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.09.007.
2. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res. 2013; 47(2): 89-102. doi: 10.1159/000345367.
3. Twin J, Bradshaw CS, Garland SM, Fairley CK, Fethers K, Tabrizi SN. The potential of metatranscriptomics for identifying screening targets for bacterial vaginosis. PLoS One. 2013 Sep; 8(9): e76892. doi: 10.1371/journal.pone.0076892.
4. Xu X, Zhou XD, Wu CD. The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factors of Streptococcus mutans. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Mar; 55(3), 1229-36. doi: 10.1128/AAC.01016-10.
5. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AHM, Hamaker BR, Lemo JA, Koo H. Dynamics of Streptococcus mutans transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. PLoS One. 2010 Oct; 5(10): e13478. doi: 10.1371/journal.pone.0013478.
6. Stipp RN, Boisvert H, Smith DJ, Höfling JF, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. CovR and VicRK regulate cell surface biogenesis genes required for biofilm formation in Streptococcus mutans. PLoS One. 2013; 8(3): e58271. doi: 10.1371/journal.pone.0058271.
7. Zhao X, Liu Z, Liu Z, Meng R, Shi C, Chen X, et al. Phenotype and RNA-seq-Based transcriptome profiling of Staphylococcus aureus biofilms in response to tea tree oil. Microb Pathog. 2018; 123:304-313.
8. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. Mol. Oral Microbiol. 2012 Oct; 27(5): 350– 361. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00647.x.
9. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai CH, et al. Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. Infect Immun. 2014 May; 82(5): 1968–1981. doi: 10.1128/IAI.00087-14.
10. Peterson SN, Meissner T, Su AI, Snesrud E, Ong AC, Schork NJ, et al. Functional expression of dental plaque microbiota. Front Cell Infect Microbiol. 2014 Aug; 4: 108. doi: 10.3389/fcimb.2014.00108.
11. Uppuluri P, Acosta Zaldívar M, Anderson MZ. Candida albicans dispersed cells are developmentally distinct from biofilm and planktonic cells. MBio. 2018; 9(4): e01338-18. 10.1128/mBio.01338-18. J. Health Biol Sci. 2019; 7(2): 145-151
12. Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. J. Oral Microbiol. 2014; 6: 25443.
13. Do T, Sheehy EC, Mulli T, Hughes F, Beighton D. Transcriptomic analysis of three Veillonella spp. present in carious dentine and in the saliva of caries-free individuals. Front. Cell Infect Microbiol. 2015; 5: 25.
14. Bezerra DS, Stipp RN, Neves BG, Guedes SF, Nascimento MM, Rodrigues LK. Insights into the Virulence Traits of Streptococcus mutans in Dentine Carious Lesions of Children with Early Childhood Caries. Caries Res. 2016; 50(3): 279-87. doi: 10.1159/000445256.
15. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. J Mol Endocrinol. 2005 Jun; 34(3): 597–601.
16. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc. 2006; 1(3): 559–1582. doi: 10.1038/nprot.2006.236.
17. Ahmad J, Baig MA, Ali AA, Al-Huqail A, Ibrahim MM, Qureshi MI. Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from Parthenium hysterophorus leaf. 3 Biotech. 2017 Dec; 7(6): 373. doi: 10.1007/s13205-017-1003-3.
18. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond Streptococcus mutans: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. PLoS One. 2012; 7(10): e47722. doi: 10.1371/journal.pone.0047722.
19. Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. Caries Res. 2013; 47(6), 591-600. doi: 10.1159/000351663.
20. Frias-Lopez J, Duran-Pinedo A. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. J Bacteriol. 2012 Apr; 194(8): 2082–2095. doi: 10.1128/JB.06328-11.
21. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, et al. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and inter-neurons in rat CNS. Neuron. 1995 Jul; 15(1):193–204.
22. Dobosy JR, Rose SD, Beltz KR, Rupp SM, Powers KM, Behlke, et al. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. BMC Biotechnol. 2011 Ago; 10;11:80. doi: https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-80 .

## 151 Extraction and purification of RNA from human carious dentine

23. Ferraz C, Thé PL, Mendonça JS, Fernandes CA, Rodrigues LKA, Yamauti M. Effectiveness of different removal methods of artificially demineralized dentin. *Arq. Odontol.* 2014 Abr; 50(2): 56-62.
24. Jeon JG, Pandit S, Xiao J, Gregoire S, Falsetta ML, Klein MI, et al. Influences of trans-trans farnesol, a membrane-targeting sesquiterpenoid, on *Streptococcus mutans* physiology and survival within mixed-species oral biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011 Apr; 3(2): 98-106. doi: 10.4248/IJOS11038.
25. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: BHL; 1994.
26. Takahashi N, Nyvad B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res.* 2016; 50(4): 422-31. doi: 10.1159/000447309.
27. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001; Chapter 2: 2-4. doi: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
28. Salzman RA, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa PM, Bressan RA. An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter.* 1999; 17(1): 11-17.
29. Azevedo H, Lino-Neto T, Tavares RM. An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. *Plant Mol Biol Rep.* 2003 Dec; 21(4): 333-338.
30. Gosalbes MJ, Durban A, Pignatelli M, Abellan JJ, Jimenez-Hernandez N, Perez-Cobas AE, Latorre A, Moya A. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS ONE.* 2011 Mar; 6(3): e7447. doi: 10.1371/journal.pone.0017447.
31. Kempf PF, Lee S, Laroche J. Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Aug; 59(8): 2594-2601.
32. Cury JA, Koo H. Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms. *Anal Biochem.* 2007 Jun; 365(2), 208-214.
33. Leite GM, Magan N, Medina Á. Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: An optimized method for filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods.* 2012 Mar; 88(3): 413-418. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.011.
34. De Bruin OM, Birnboim HC. A method for assessing efficiency of bacterial cell disruption and DNA release. *BMC Microbiol.* 2016 Aug; 16(1): 197. doi: 10.1186/s12866-016-0815-3.
35. Miller DF, Yan PS, Buechlein A, Rodriguez BA, Yilmaz AS, Goel S, et al. A new method for stranded whole transcriptome RNA-seq. *Methods.* 2013 Sep; 63(2): 126-134. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.03.023.

### How to cite this article/Como citar este artigo;

Bezerra DS, Neves BG, Guedes SFF, Regis WFM, Stipp RN, Rodrigues LKA. Extraction and purification of RNA from human carious dentine: an approach to enable bacterial gene expression studies. *J Health Biol Sci.* 2019 Abr-Jun; 7(2): 145-151.

# Cárie dentária na América do Sul: realidade entre escolares do Brasil e Argentina

## Dental caries in South America: reality among schoolchildren from Brazil and Argentina

Viviane Elisângela Gomes<sup>1</sup> , Raquel Conceição Ferreira<sup>1</sup> , Morgana Almeida Souza de Moraes<sup>2</sup> , Loliza Luiz Figueiredo Hourí Chalub<sup>1</sup> , Marcela Inés Bella<sup>3</sup> , Lila Susana Cornejo<sup>3</sup> , Pablo Cristian Gigena<sup>3</sup> , Patricia Verduci<sup>3</sup> , Patrícia Maria de Araújo Pereira Zarzar<sup>1</sup> , Isabela Almeida Pordeus<sup>1</sup> , Andrea Maria Duarte Vargas<sup>1</sup> , Efigênia Ferreira e Ferreira<sup>1</sup> 

1. Docente da Faculdade de Odontologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil. 2. Discente do Curso de Odontologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil. 3. Docente do Curso de Odontologia pela Faculdade de Odontologia da *Universidad Nacional de Córdoba*, Buenos Aires, Argentina.

### Resumo

**Objetivo:** este estudo transversal multicêntrico objetivou determinar a proporção de cárie dentária, sua gravidade e atividade em escolares brasileiros e argentinos. **Métodos:** a amostra foi composta por escolares selecionados por conveniência, 406 do Brasil (Belo Horizonte - MG) e 241 da Argentina (Córdoba-Cba). Os dados foram coletados por seis dentistas previamente treinados e calibrados ( $kappa_{intra} \geq 0,63$ ;  $kappa_{inter} \geq 0,67$ ). A proporção e gravidade da cárie foram medidas pelos índices ceod e CPOD. A alta experiência de cárie foi identificada pelo *Significant Caries Index* (SiC). A atividade de cárie foi avaliada segundo a reflexão e a textura da superfície (Nyvad et al., 1999) e o Índice de Cuidados ( $O/CPO * 100$ ) foi mensurado. **Resultados:** a proporção de livres de cárie (ceod e CPOD = 0) no Brasil foi de 45,7% e 19,9% na Argentina. O ceod foi de 1,48 (IC95%: 1,26-1,71) e 2,38 (IC95%: 2,0-2,72) entre escolares do Brasil e da Argentina, respectivamente. Nos dois países, o componente cariado foi o mais frequente. Entre os indivíduos com experiência de cárie (ceod > 1 e/ou CPOD > 1), a atividade de cárie esteve presente em 77,5% das crianças examinadas no Brasil e em 26,4% na Argentina. No grupo SiC, o CPOD foi de 2,20 (IC95%: 1,95-2,20) no Brasil e 2,17 (IC95%: 1,91-2,43) na Argentina, e o ceod no Brasil foi de 3,37 (3,01-3,72) e na Argentina 5,56 (5,04-6,07). O Índice de Cuidados foi baixo. **Conclusão:** em ambos os países, a proporção de crianças com experiência de cárie foi alta. Concentração de carga e atividade de cárie foi encontrada em grupos de polarização. Cabe ressaltar que a cárie dentária na dentição decídua é um problema relevante que necessita de esforços direcionados em ambos os países.

**Palavras-chave:** Cárie Dentária. Estudantes. Saúde Pública. Aplicações da Epidemiologia

### Abstract

**Objective:** This multicentric cross-sectional study aimed to determine the proportion of dental caries, its' severity and activity among Brazilian and Argentinian schoolchildren. **Methods:** The sample was selected by convenience and comprised of 406 schoolchildren from Brazil (Belo Horizonte-MG) and 241 in Argentina (Córdoba-Cba). Data were collected by six previously trained and calibrated dentists ( $kappa_{intra} \geq 0.63$ ;  $kappa_{inter} \geq 0.67$ ). The proportion and severity of dental caries were measured by dmft and DMFT index. The high caries experiences was identified using *Significant Caries Index* (SiC). The caries activity was evaluated according to the reflection and texture of the surface (Nyvad et al., 1999) and the Care Index ( $O/CPO * 100$ ) was measured. **Results:** The caries free (dmft and DMFT = 0) in Brazil was 45.7% and 19.9% in Argentina. The dmft was 1.48 (95% CI: 1.26-1.71) and 2.38 (95% CI: 2.0-2.72) among schoolchildren in Brazil and Argentina, respectively. In both countries, decayed component was the most frequent observed. Among subjects with caries experience (dmft > 1 and / or DMFT > 1) the caries activity was present in 77.5% of the children examined in Brazil and 26.4% in Argentina. In SiC group, DMFT was 2.20 (95% CI: 1.95-2.20) in Brazil and 2.17 (95% CI: 1.91-2.43) in Argentina and dmft in Brazil was 3.37 (3.01-3.72) and in Argentina was 5.56 (5.04-6.07). The Care Index was low. **Conclusions:** In both countries, the proportion of children with caries experience was high. Concentration of burden and caries activity was found in 'polarization' groups. It is noteworthy that caries in the primary dentition is a relevant problem that needs targeted efforts in both countries.

**Keywords:** Dental Caries. Students. Public Health. Uses of Epidemiology.

### INTRODUÇÃO

Por considerar a escola um equipamento social privilegiado para a construção da cidadania, estabelecimento de hábitos saudáveis<sup>1</sup> e por objetivar o fortalecimento da ação comunitária em diferentes contextos sociais, as Faculdades de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (Brasil) e da *Universidad Nacional de Córdoba* (Argentina)

vêm desenvolvendo ações de promoção da saúde sistemáticas em escolas de Belo Horizonte e Córdoba, respectivamente. O projeto de extensão Escolas Saudáveis é caracterizado por atuar vinculado ao ensino e à pesquisa, envolvendo estudantes da graduação e pós-graduação. Esse projeto apresenta, como principal parceira, a Secretaria Municipal de Educação de Belo

**Correspondente:** Viviane Elisângela Gomes. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Social e Preventiva. Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP: 31270 - 901. Telefone: 031 3409 2457. vivianegomes@ufmg.br

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido 6 Mar 2019; Revisado: 20 Mar 2019; Aceito: 28 Mar 2019

Horizonte e tem realizado ações multiprofissionais que visam ao empoderamento e à autonomia dos atores das comunidades escolares para que eles possam tornar-se sujeitos ativos de transformação de suas realidades<sup>2</sup>. Na mesma direção, com o intuito de fortalecer a relação dialógica da universidade com a sociedade, valorizando os diferentes saberes, a equipe interdisciplinar do PROCON (*Promoción Contextualizada - Equipo de Investigación Interdisciplinaria*) junto a escolas de Córdoba compartilham o planejamento e a implementação de diversos projetos de pesquisa, extensão e voluntariado universitário<sup>3</sup>.

Na América Latina, foi verificada uma tendência de declínio na prevalência e gravidade da cárie dentária nas dentições decídua e permanente<sup>4</sup>. Entretanto, a despeito das ações de promoção da saúde<sup>5</sup> e políticas públicas vigentes no Brasil<sup>6,7</sup>, com base nos estudos desenvolvidos por Seabra et al.<sup>8</sup> e Melo et al.<sup>9</sup>, a cárie dentária ainda é considerada um problema que ocorre com frequência preocupante nos dentes decíduos de crianças de algumas escolas de Belo Horizonte, e esses achados são condizentes com a realidade nacional<sup>10,11</sup>.

Na Argentina, o primeiro estudo epidemiológico de base populacional envolveu 2.279 crianças e revelou diferenças significativas na prevalência de cárie dentária entre as crianças das diferentes regiões do país associadas à etnia e aos fatores socioeconômicos. Verificou, ainda, que a experiência de cárie era menor entre as crianças que viviam em áreas com água, naturalmente, fluoretada<sup>12</sup>. Os autores ressaltaram na discussão de que a prevalência de cárie (ceod e CPOD) encontrada era menor que a do Brasil na época. Não foram localizados estudos recentes sobre cárie dentária em população escolar em Córdoba; entretanto, Azcurra et al.<sup>13</sup> relataram diferenças na experiência de cárie em dentes decíduos e permanentes de crianças de duas regiões da cidade com diferentes concentrações de flúor na água de abastecimento durante os anos 1990.

Alguns autores têm considerado que populações socialmente vulneráveis ainda concentram os piores índices para cárie dentária e são mais propensas a apresentar lesões de cárie não tratadas<sup>10,14</sup>. A presença de lesões de cárie não tratadas em dentes permanentes foi a condição de saúde mais prevalente em todo o mundo em 2010, afetando 2,4 bilhões de pessoas, e representando 10ª condição mais prevalente ocorrida em dentes decíduos, afetando 621 milhões de crianças. Ressalta-se que essas lesões representam limitações na vida diária dos indivíduos<sup>15</sup>.

Neste contexto, incluir a avaliação de atividade de cárie (lesões localizadas em esmalte)<sup>16</sup> nos levantamentos com finalidade de planejamento de serviços de saúde seria relevante, uma vez que se poderia realizar o diagnóstico precoce e eleger estratégias efetivas para o controle das lesões iniciais, evitando que estas venham a se tornar lesões cavitadas mais severas, envolvendo dentina<sup>17</sup>. Para que ações contextualizadas e efetivas de controle da cárie dentária possam ser implementadas, é fundamental conhecer a realidade das condições de saúde

bucal dos escolares. Este estudo teve como objetivo determinar e comparar a proporção de cárie dentária, sua gravidade e atividade, bem como o acesso a serviços odontológicos entre escolares brasileiros e argentinos.

## MÉTODOS

Este trabalho corresponde a uma das etapas do projeto de intervenção “Promoção da saúde contextualizada em comunidades escolares e seu entorno: a autonomia para a saúde” que objetivou contribuir para a melhoria da saúde das comunidades envolvidas no projeto, nas cidades de Córdoba (Argentina) e Belo Horizonte (Brasil), a partir da geração de conhecimentos para a construção de estratégias de monitoramento das condições de saúde bucal e enfrentamento dos problemas em cada realidade. No contexto deste projeto, como uma etapa de planejamento das intervenções, foi realizado um levantamento epidemiológico para avaliar a cárie dentária entre escolares de Belo Horizonte e Córdoba.

Belo Horizonte é a capital do estado de Minas Gerais, localizada na região Sudeste do Brasil; possui 2.375.151 milhões de habitantes<sup>18</sup>. A porcentagem de pessoas que vivem em domicílios com abastecimento de água e saneamento, em 2010, foi de 85%. O Índice de Desenvolvimento Humano é 0,77419.

Córdoba está localizada a cerca de 700 km da capital da Argentina e tem uma população de 1.282.569 habitantes (Observatório Urbano Córdoba, 2014). Considerando as condições de moradia em 2001, 90,53% tinham acesso a saneamento e, em 2003, 95,28% da população tinham acesso à água, e o Índice de Desenvolvimento Humano é 0,86220. Ambas as cidades têm abastecimento público de água fluoretada.

A amostra foi composta por escolares de 7 a 12 anos de idade residentes em Belo Horizonte e em Córdoba, que foram selecionados por conveniência. Escolas públicas incluídas neste estudo foram selecionadas por fazerem parte de campos de estágio e projetos das universidades (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG e Universidade Nacional de Córdoba - UNC, respectivamente). Essas escolas, quatro de Belo Horizonte e três de Córdoba, estão localizadas em áreas de vulnerabilidade social e constituem-se em cenários de ações sistemáticas de promoção da saúde realizadas junto às comunidades escolares por meio de disciplinas e projetos de extensão<sup>5</sup>.

Uma equipe formada por quatro cirurgiões-dentistas (estudantes da pós-graduação em Saúde Coletiva) e oito estudantes da graduação em odontologia participou do estudo no Brasil. Na Argentina, dois cirurgiões-dentistas, professores da UNC, realizaram a coleta de dados. Todos foram treinados e calibrados por quatro pesquisadores e realizaram exames clínicos para registro de cárie dentária. O treinamento e a calibração foram realizados nos dois países, seguindo a mesma metodologia. Exercícios teóricos e práticos de treinamento e calibração foram organizados, totalizando 36h, simulando diferentes condições e situações em que os examinadores encontrariam durante

a realização do trabalho de campo. Foi adotada a técnica do consenso. Durante o processo de calibração, as crianças foram examinadas duas vezes pelo mesmo examinador, com um intervalo de duas semanas entre cada exame, para avaliar a concordância intraexaminador. O valor de Kappa para concordância intraexaminador e interexaminador para cárie dentária variou de 0,63 a 0,75 e de 0,67 a 0,86, respectivamente. Os dados foram coletados por meio de exame clínico nas escolas, seguindo a metodologia proposta pela Organização Mundial da Saúde - OMS<sup>21</sup>. A prevalência e a gravidade da cárie dentária foram avaliadas pelos índices ceod e CPOD, de acordo com os critérios da OMS<sup>21</sup>. O terço da amostra que apresentou alta experiência de cárie foi identificado por meio do *Significant Caries Index* (SiC)<sup>22</sup>. Esse índice é calculado da seguinte forma: os indivíduos são ordenados de acordo com os valores do CPOD; o terço da população com as maiores taxas de cárie é selecionado, e o CPOD médio desse subgrupo é calculado. A atividade de cárie foi avaliada segundo a reflexão e a textura da superfície dentária. As lesões eram consideradas ativas quando as superfícies dentárias apresentaram-se rugosas, opacas e com aspecto de giz. Além desses sinais, foram consideradas a presença de placa bacteriana e/ou gengivite e a lesão de cárie aguda (aspecto claro e com descamação)<sup>16</sup>. O Índice de Cuidados também foi utilizado para analisar os resultados, quanto aos cuidados restauradores a que a população-alvo estava exposta, por meio da relação de dentes restaurados/CPO x 100<sup>23</sup>. Como o estudo incluiu a dentição mista, utilizaram-se a soma dos dentes decíduos e permanentes preenchidos no numerador e a soma ceod e CPOD no denominador.

Este estudo foi desenvolvido atendendo aos princípios da Declaração de Helsinque e aprovado pelos Comitês de Ética em

Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (CAEE 09921412.3.0000.5149) e da Universidade Nacional de Córdoba - UNC. Os participantes e seus responsáveis assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, e seus responsáveis, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, respectivamente. Os riscos envolvidos na pesquisa consistiram em riscos mínimos, assim como a mínima possibilidade de desconfortos e constrangimentos.

Análises descritivas dos dados foram realizadas com o cálculo de medidas de tendência central e variabilidade para as variáveis quantitativas (ceod/CPOD). Frequência relativa foi utilizada para sumarizar as variáveis categóricas. As análises foram realizadas para caracterizar o perfil epidemiológico de cada grupo separadamente (Brasil e Argentina) e foram desempenhadas no software SPSS 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS

Participaram do estudo 241 crianças na Argentina e 406 crianças no Brasil, sendo 53,9% e 49,1% do sexo feminino, respectivamente. A média de idade das crianças na Argentina foi de 8,93 anos (DP=2,19) e, no Brasil, de 9,21 (DP=1,78).

No Brasil, a frequência de crianças livres de cárie (ceod e CPOD = 0) foi 45,7% e, na Argentina, foi 19,9%. A atividade de cárie foi observada em 43,0% e 23,2% dos escolares brasileiros e argentinos, respectivamente. Entre os indivíduos com experiência de cárie (ceod > 1 e/ou CPOD > 1), a frequência de crianças com atividade de cárie foi 77,5% no Brasil e 26,4% na Argentina (tabela 1).

**Tabela 1.** Frequência de crianças com atividade de cárie (cárie em esmalte) segundo a experiência de cárie (CPO>1)

Experiência de cárie	Argentina		Brasil	
	% amostra total	Crianças com atividade de cárie	% amostra total	Crianças com atividade de cárie
CPOD=0 e ceod=0 (livres de cárie)	48 (19,9)	5 (10,4)	187 (45,7)	4 (2,1)
CPOD ≥ 1 e/ou ceod ≥ 1	193 (80,1)	51 (26,4)	222 (54,3)	172 (77,5)
<b>Total</b>	<b>241</b>	<b>56 (23,2)</b>	<b>409</b>	<b>176 (43,0)</b>

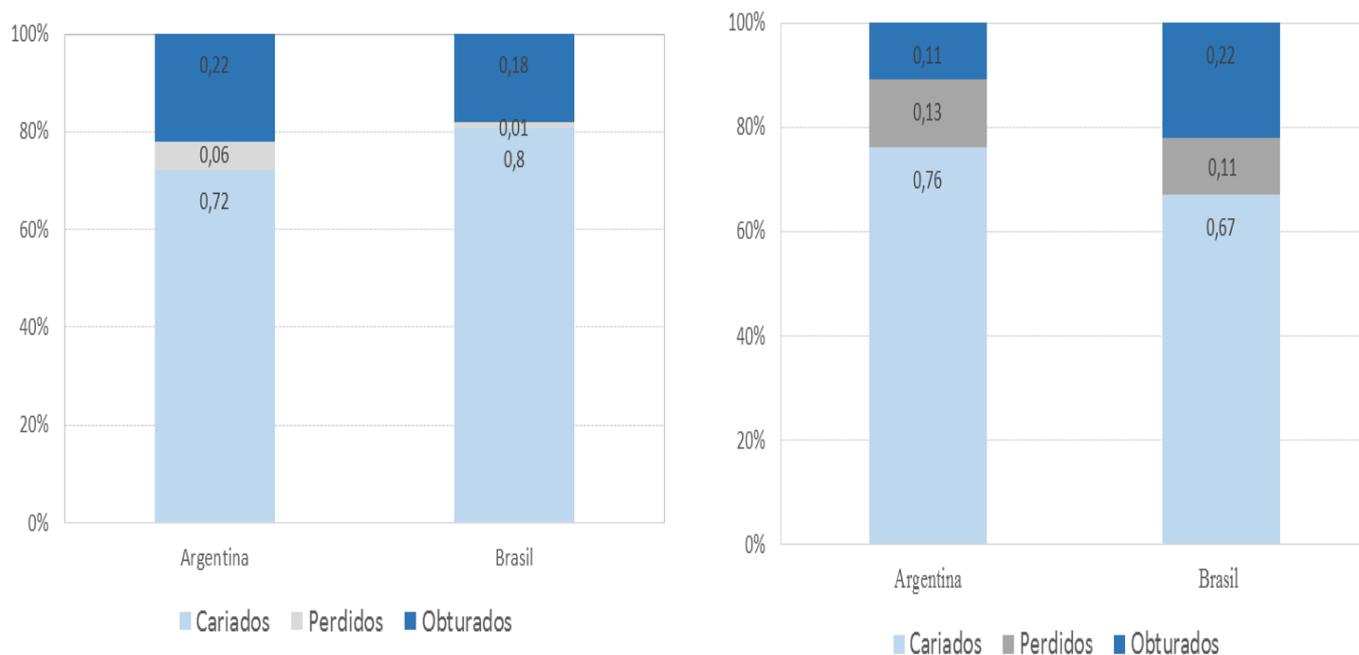
O ceod no Brasil foi 1,48 (95% IC: 1,26-1,71) e o CPOD foi 0,57 (95% IC: 0,45-0,68). Na Argentina, o ceod foi 2,38 (95% IC: 2,0-2,72), o CPOD foi 0,81 (95% IC: 0,63-0,96). No grupo SiC, o CPOD foi 2,20 (95% IC: 1,95-2,20) no Brasil e 2,17 (95% IC: 1,91-2,43) na Argentina. O ceod no grupo SiC no Brasil foi 3,37 (95% IC: 3,01-3,72) e na Argentina foi 5,56 (95% IC: 5,04-6,07). O número

médio de dentes decíduos e permanentes com experiência de cárie foi maior entre as crianças com atividade de cárie, nos dois países (tabela 2). Nos dois países, houve um predomínio do componente cariado, tanto na dentição decídua, como na permanente (gráfico 1). O Índice de Cuidados para a Argentina foi de 14,08% e, para o Brasil, foi de 20,91%.

**Tabela 2.** Média do ceod e CPOD e seus componentes entre as crianças do Brasil nos grupos com e sem atividade de cárie e no grupo SiC

	Argentina				Brasil			
	Total	Com atividade	Sem atividade	Grupo SiC	Total	Com atividade	Sem atividade	Grupo SiC
<b>CPOD</b>	0,81	<b>0,87</b>	0,79	<b>2,17</b>	0,57	<b>0,69</b>	0,47	<b>2,20</b>
	(0,63-0,96)	<b>(0,53-1,22)</b>	(0,58-0,95)	<b>(1,91-2,43)</b>	(0,45-0,68)	<b>(0,52-0,85)</b>	(0,32-0,62)	<b>(1,95-2,20)</b>
<b>Permanente Cariado</b>	0,58	0,73	0,53	1,58	0,46	0,56	0,38	1,78
	(0,45-0,71)-	(0,42-1,04)	(0,39-0,67)	(1,33-1,83)	(0,36-0,55)	(0,41-0,71)	(0,25-0,51)	(1,54-2,02)
<b>Permanente Perdido</b>	0,05	0,07	0,04	0,13	0,01	0,03	0,00	0,05
	(0,00-0,09)	(-0,01-0,16)	(-0,01-0,09)	(0,01-0,24)	(0,00-0,02)	(0,00-0,04)	(0,00-0,01)	(0,01-0,09)
<b>Permanente Obturado</b>	0,18	0,07	0,22	0,47	0,10	0,10	0,09	0,37
	(0,10-0,26)	(-0,01-0,16)	(0,11-0,32)	(0,26-0,67)	(0,05-0,14)	(0,05-0,16)	(0,02-0,16)	(0,21-0,53)
<b>ceod</b>	2,38	<b>2,57</b>	2,32	<b>5,56</b>	1,48	<b>3,23</b>	0,16	<b>3,37</b>
	(2,0-2,72)	<b>(1,78-3,22)</b>	(1,90-2,73)	<b>(5,04-6,07)</b>	(1,26-1,71)	<b>(2,86-3,60)</b>	(0,06-0,26)	<b>(3,01-3,72)</b>
<b>decíduo cariado</b>	1,82	2,05	1,75	4,35	0,99	2,23	0,05	2,25
	(1,50-2,13)	(1,41-2,70)	(1,38-2,11)	(3,80-4,89)	(0,81-1,17)	(1,89-2,59)	(0,01-0,09)	(1,92-2,58)
<b>decíduo extraído</b>	0,30	0,36	0,28	0,71	0,16	0,34	0,03	0,36
	(0,18-0,42)	(0,12-0,60)	(0,14-0,43)	(0,39-1,03)	(0,10-0,22)	(0,21-0,46)	(0,01-0,06)	(0,24-0,49)
<b>decíduo obturado</b>	0,26	0,16	0,29	0,50	0,33	0,66	0,08	0,76
	(0,17-0,35)	(0,03-0,29)	(0,18-0,41)	(0,27-0,73)	(0,25-0,42)	(0,49-0,84)	(0,02-0,14)	(0,58-0,93)

**Figura 1.** Distribuição percentual dos componentes do CPOD e ceod na Argentina e Brasil.



## DISCUSSÃO

Os resultados do estudo evidenciam a necessidade de estratégias adequadas ao perfil epidemiológico dos escolares de ambos os países. A cárie dentária foi escolhida como um dos elementos (indicador) para o planejamento das ações de intervenção a serem implementadas nas escolas de Belo Horizonte e Córdoba, por representar um problema de saúde pública que necessita de enfrentamento<sup>15</sup> e por estar associada a condições de desigualdade e vulnerabilidade social<sup>10,14</sup> que estão intimamente relacionados ao comportamento em saúde<sup>26</sup>.

Os resultados de Belo Horizonte evidenciam a polarização da cárie dentária, e, em Córdoba, observou-se maior gravidade da doença com distribuição mais homogênea entre as crianças. Ficou evidente que ambas as realidades exigem o desenvolvimento de ações estratégicas voltadas para a promoção da saúde articuladas a seus contextos. Pode-se chamar atenção para os momentos diferentes da organização das políticas públicas de saúde entre os países, já que o Brasil apresenta um sistema de saúde organizado em redes de atenção, tendo a equidade como um dos seus princípios doutrinários<sup>24</sup>, e a Argentina ainda não conta com um sistema de saúde universal e estruturado como o brasileiro.

Talvez o efeito das políticas e a organização do serviço tenha impactado nos resultados de saúde bucal dos escolares brasileiros<sup>24</sup>. Nos últimos anos, houve um esforço para a consolidação de estratégias populacionais, como a fluoretação das águas de abastecimento público e a distribuição de dentífrico fluoretado e escovas dentais, como parte da Política Nacional de Saúde Bucal<sup>11</sup> e outras ações voltadas à população escolar contempladas na Política Nacional de Promoção da Saúde<sup>7</sup> e o Programa Saúde na Escola<sup>6</sup>. Entretanto, em ambos os países, foi possível, por meio dos dados, identificar um grupo que ainda concentra a maior carga da cárie dentária, representado pelos grupos SiC. Cabe ressaltar que esses grupos populacionais merecem mais atenção, uma vez que as estratégias vigentes não estão sendo suficientes para enfrentar o problema, sendo necessárias estratégias singulares<sup>25</sup> em função da vulnerabilidade social e da determinação social da cárie dentária<sup>26</sup>.

Houve predominância do componente cariado, achado que evidencia a falta de acesso aos serviços de saúde bucal pelas crianças e corrobora os dados mundiais acerca das altas taxas de lesões de cárie não tratadas<sup>15</sup>. A presença de lesões de cárie não tratadas impacta, negativamente, a vida dos indivíduos, uma vez que está associada à dor e à dificuldade para se alimentar<sup>27</sup>.

O Índice de Cuidados reforçou a falta de acesso/uso dos serviços de saúde bucal, pois foi muito baixo nos dois países. O baixo uso dos serviços de saúde bucal entre crianças tem sido atribuído ao nível socioeconômico<sup>28</sup> e à renda familiar<sup>29</sup>. O percentual de crianças brasileiras que nunca tiveram acesso a uma consulta odontológica é alto<sup>30</sup> e, entre as mais vulneráveis beneficiárias

de programa de transferência de renda, a chance de acessar o serviço é ainda menor<sup>31</sup>. Esses resultados evidenciam uma fragilidade na abordagem dos serviços quanto ao cuidado integral e das ações intersetoriais, que poderiam incluir o setor educação, por exemplo, para o desenvolvimento de ações preventivas no ambiente escolar.

O presente estudo contribuiu para um diagnóstico inicial da realidade das escolas, de ambos os países, no sentido de fomentar o planejamento das futuras intervenções por meio do indicador cárie dentária. Ressalta-se a importância da aplicação da epidemiologia para o planejamento, uma vez que os dados epidemiológicos revelaram contextos de cada uma das realidades e desvelaram desafios colocados pela dificuldade de se trabalhar ações intersetoriais que consigam vencer as iniquidades e superar a complexa determinação social do processo saúde-doença<sup>32</sup>. Verificou-se que ambos os países terão de enfrentar o mesmo problema (cárie dentária) que difere apenas em gravidade. No Brasil, já houve um avanço em termos da estruturação da política pública de saúde; entretanto, permanece a falta de acesso aos serviços com altos índices de lesão de cárie não tratada entre as crianças.

O estudo apresenta limitações, visto que se optou por trabalhar com crianças de escolas que já faziam parte de atividades realizadas pelas universidades, não contou com amostra representativa dos escolares dos municípios que poderiam apresentar condições de saúde bucal diferentes. Coloca-se, também, o desafio de alinhar um estudo dessa natureza, envolvendo equipes de dois países diferentes em diversos aspectos, tais como a concordância diagnóstica e o idioma.

## CONCLUSÃO

Nos dois países, a prevalência de experiência de cárie dentária foi alta entre as crianças, e um dado preocupante é o baixo percentual de livres de cárie. A concentração de carga e a atividade de cárie foram encontradas em grupos de polarização, tanto para dentes decíduos, quanto permanentes. Cabe ressaltar que a cárie na dentição decídua é um problema que necessita de esforços direcionados no Brasil e na Argentina. Além disso, tornou-se evidente que o acesso a cuidados restauradores é muito baixo nos dois países. Recomenda-se que as medidas de controle populacional da cárie dentária e as políticas públicas de saúde sejam intensificadas e articuladas com cada contexto.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, por financiar esta pesquisa, pelo apoio financeiro para intercâmbio e apoio à participação em eventos no exterior. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela concessão de bolsas. Às professoras Irma Alicia Moncunill e Elena Ilas, da *Universidad Nacional de Córdoba*, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa em Córdoba. Às alunas de doutorado Andreia Maria Araújo Drummond e pós-doutorado Suely Maria Rodrigues,

do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da área de Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio na coleta de dados e

desenvolvimento da pesquisa em Córdoba. Às escolas e a toda a comunidade envolvida pela parceria.

## REFERÊNCIAS

- Figueiredo TAM, Machado VLT, Abreu MMS. A saúde na escola: um breve resgate histórico. *Ciênc. Saúde Coletiva* [Internet]. 2010 Mar [acesso 2019 Mar 6];15(2):397-402. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232010000200015&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232010000200015&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000200015>.
- Gomes VE, Vargas AMD, Ferreira EF. The academic dimension of university extension programs. *Braz. Oral Res.* [Internet]. 2013 Oct [acesso 2019 Mar 3];27(5):387-388. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-83242013000500387&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242013000500387&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242013000500001>.
- Bella M, Moncunill I, Hilas E, Gigena P, Agüero N, Herrera A et al. Responsabilidad Social Universitaria en la Promoción de la Salud. *Interfaces – Rev. de Extensão* [internet]. 2014 Jan/Jun [acesso 2019 Mar 3]; 2(2): 107-119. Disponível em: <https://www.ufmg.br/proex/revistainterfaces/index.php/IREXT/article/view/71/pdf>.
- Cleaton-Jones P, Fatti P, Bönecker M. Dental caries trends in 5- to 6-year-old and 11- to 13-year-old children in three UNICEF designated regions--Sub Saharan Africa, Middle East and North Africa, Latin America and Caribbean: 1970-2004. *Int Dent J.* 2006 Oct; 56(5): 294-300. PubMed PMID: 17069073.
- Gomes VE. Escolas Saudáveis: a busca pela excelência na extensão. *Interfaces - Revista de Extensão* [Internet]. 2013 Jul/Nov [acesso 2019 Mar. 3];1(1):48-55. Disponível em <https://www.ufmg.br/proex/revistainterfaces/index.php/IREXT/article/view/8/9>.
- Graciano AMC, Cardoso NMM, Mattos FF, Gomes VE, Borges-Oliveira AC. Promoção da Saúde na Escola: história e perspectivas. *J Health Biol Sci.* [Internet]. 2015 [acesso 2019 Mar 4]; 3(1): 34-38. Disponível em: <http://periodicos.unichristus.edu.br/index.php/jhbs/article/view/110/100>. doi: <http://dx.doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v3i1.2015>.
- Malta DC, Morais OLN, Silva MMA, Rocha D, Castro AM, Reis AAC et al. Política Nacional de Promoção da Saúde (PNPS): capítulos de uma caminhada ainda em construção. *Ciênc. saúde coletiva* [Internet]. 2016 Jun [acesso 2019 Mar 6]; 21(6): 1683-1694. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232016000601683&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232016000601683&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232016000601683>.
- Seabra LCSR, Melo RR, Gomes VE, Oliveira AC, Ferreira EF. Fatores sociais, comportamentais e biológicos associados à presença de placa dentária na superfície oclusal de primeiros molares permanentes. *Arq Odontol* [Internet]. 2012 Out/Dez [acesso 2019 Mar 5]; 48(4): 211-217. Disponível em: <https://periodicos.ufmg.br/index.php/arquivoemodontologia/article/view/3612/2377>.
- Melo RR, Rezende JS, Gomes VE, Ferreira EF, Oliveira AC. Sociodemographic, biological and behavioral risk factors associated with incidence of all stages of dental caries in first permanent molars: a 3 year follow-up. *Europ J Paediatric Dentistry.* 2013 Mar;14(1): 8-12.
- Antunes JLF, Peres MA, Mello TRC. Determinantes individuais e contextuais da necessidade de tratamento odontológico na dentição decídua no Brasil. *Ciênc. saúde coletiva* [Internet]. Mar 2006 [acesso 2019 Mar 5]; 11(1): 79-87. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232006000100015&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232006000100015&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232006000100015>.
- Pucca GAJ, Costa JFR, Chagas LD, Sivestre RM. Oral health policies in Brazil. *Braz. oral res.* [Internet]. 2009 Jun [acesso 2019 Mar 6]; 23(Suppl1): 9-16. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-83242009000500003&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242009000500003&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242009000500003>.
- de Muñiz BR. Epidemiologic oral health survey of Argentine children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1985 Dec;13(6): 328-33. PubMed PMID: 3866653.
- Azcurrea AI, Battellino LJ, Calamari SE, Dorronsoro STC, Kremer M, Lamberghini FC. Estado de salud bucodental de escolares residentes en localidades abastecidas con agua de consumo humano de muy alto y muy bajo contenido de fluoruros. *Rev. Saúde Pública* [Internet]. Out 1995 [acesso 2019 Mar 6]; 29(5): 364-375. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89101995000500005&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101995000500005&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101995000500005>.
- Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica* [Internet] Jun 2006 [acesso 2019 Mar 5]; 19(6): 385-393. Disponível em: [https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource\\_ssm\\_path=/media/assets/rpsp/v19n6/30519.pdf](https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpsp/v19n6/30519.pdf). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892006000600004>.
- Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2015 May; 94(5): 650-8. PubMed PMID: 25740856.
- Nyvad B, Machiulskiene V, Baelum V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res.* 1999 Jul/Aug; 33(4):252-60. PuMed PMID: 10343087.
- Rihs LB, Sousa MLR, Cypriano S, Abdalla NM, Guidini DDN, Amgarten C. Atividade de cárie na dentição decídua, Indaiatuba, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. 2007 Mar [acesso 2019 Mar 5]; 23(3): 593-600. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2007000300018&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2007000300018&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007000300018>.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Belo Horizonte. Rio de Janeiro: IBGE; 2018 [acesso 2019 Mar 28]. Disponível em <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=310620&search=minas-gerais|belo-horizonte>.
- Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento Brasil. 2012 [acesso 2019 Mar 28]. Disponível em [http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/perfil\\_rm/belo-horizonte](http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/perfil_rm/belo-horizonte).
- Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo en Argentina. Buenos Aires: PNUD; 2013 [acesso 2019 Mar 28]. Disponível em <http://hdr.undp.org/sites/default/files/pnudindh2013.pdf>.
- World Health Organization. Oral health surveys, basics methods. 4th ed. Geneva: WHO; 1997. 70p.
- Bratthall D. Introducing the *Significant Caries Index* together with a proposal for a new global oral health goal for 12-year-olds. *Int Dent J.* 2000 Dec; 50(6): 378-84. PubMed PMID: 11197197.
- Walsh J. International patterns of oral health care - the example of New Zealand. *N Z Dent J.* 1970 Apr; 66(304):143-52. PubMed PMID: 4392915.
- Paim J, Travassos C, Almeida C, Bahia L, Macinko J. The Brazilian health system: history, advances, and challenges. *Lancet.* 2011 May 21; 377(9779):1778-97. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60054-8. PubMed PMID: 21561655.
- Chor D, Faerstein E. Um enfoque epidemiológico da promoção da saúde: as ideias de Geoffrey Rose. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. Jan 2000 [2019 Mar 6];16(1): 241-244. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2000000100025&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2000000100025&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2000000100025>.

org/10.1590/S0102-311X2000000100025.

26. Holst D, Schuller AA, Aleksejuniene J, Eriksen HM. Caries in populations—a theoretical, causal approach. *Eur J Oral Sci.* 2001 Jun; 109(3): 143-8. PubMed PMID: 11456342.

27. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A et al. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: A Systematic Analysis. *J Dent Res.* 2013 Jul; 92(7):592-7. doi: 10.1177/0022034513490168. PubMed PMID: 23720570.

28. Machry RV, Tuchtenhagen S, Agostini BA, da Silva Teixeira CR, Piovesan C, Mendes FM, Ardenghi TM. Socioeconomic and psychosocial predictors of dental healthcare use among Brazilian preschool children. *BMC Oral Health* [Internet] Oct 2013 [2019 Mar 6]; 13: 60. Disponível em: <https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1472-6831-13-60> DOI <https://doi.org/10.1186/1472-6831-13-60>.

29. Baldani MH, Antunes JLF. Inequalities in access and utilization of dental services: a cross-sectional study in an area covered by the Family Health Strategy. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. 2011 [acesso 2019 Mar 5]; 27(Suppl2): s272-s283. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_)

arttext&pid=S0102-311X2011001400014&lng=en. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2011001400014>.

30. Paredes SO, Fernandes JRL, Fernandes JMFA, Menezes VA. Utilização dos serviços odontológicos por pré-escolares em um município de pequeno porte do Estado da Paraíba. *Rev. odontol. UNESP* [Internet]. June 2015 [acesso 2019 Mar 6]; 44(3): 181-187. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1807-25772015000300181&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-25772015000300181&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.1069>.

31. Oliveira LJC, Correa MB, Nascimento GG, Goettems ML, Tarquínio SBC, Torriani DD et al. Iniquidades em saúde bucal: escolares beneficiários do Bolsa Família são mais vulneráveis? *Rev. Saúde Pública* [Internet]. Dec 2013 [acesso 2019 Mar 6]; 47(6): 1039-1047. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-89102013000601039&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102013000601039&lng=en). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004688>.

32. Victora CG, Barreto ML, Leal MC, Monteiro CA, Schmidt MI, Pain J, et al. Health conditions and health-policy innovations in Brazil: the way forward. *Lancet.* 2011 Jun 11; 377(9782): 2042-53. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60055-X. PubMed PMID:21561659

#### Como citar este artigo/How to cite this article:

Gomes VE, Ferreira RC, Morais MAS, Chalub LLFH, Bella MI, Cornejo LS, et al. Cárie dentária na América do Sul: realidade entre escolares do Brasil e Argentina. *J Health Biol Sci.* 2019 Abr-Jun; 7(2):152-158.

# Avaliação da formação de smear layer no preparo químico mecânico realizado com solução ou gel de hipoclorito de sódio a 2,5%

## Evaluation of smear layer formation in mechanical chemical preparation performed with 2.5% sodium hypochlorite solution or gel

Luciana Batista Luz<sup>1</sup> , Ruth Marlene Campomanes Santana<sup>2</sup> , Amanda Prates<sup>3</sup> , Julia Froehlich<sup>4</sup> , Tiago André Fontoura de Melo<sup>5</sup> , Francisco Montagner<sup>5</sup> , Simone Bonato Luisi<sup>5</sup> 

1. Doutoranda em Odontologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. 2. Docente, Laboratório de Materiais Poliméricos – LAPOL – Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. 3. Acadêmica de Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. 4. Aluna do Curso de Especialização em Endodontia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. 5. Docente, Departamento de Odontologia Conservadora, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

### Resumo

**Introdução:** a formação de smear layer durante o preparo dos canais radiculares com o uso de hipoclorito de sódio solução já foi amplamente estudada; entretanto, na apresentação em gel não existem relatos na literatura. **Objetivo:** avaliar, em MEV, a formação de smear layer durante o preparo endodôntico, utilizando o NaOCl nas formas líquida e gel, associado ou não ao EDTA. **Métodos:** sessenta raízes palatinas de molares superiores ou distais de inferiores, com comprimento radicular padronizado em 15 mm, foram utilizadas. As amostras foram divididas em quatro grupos controle com n = 5 cada (soro fisiológico ou base gel, associados ou não ao EDTA) e quatro grupos testes com n = 10 cada, de acordo com a substância irrigadora empregada durante o preparo (solução ou gel de NaOCl a 2,5%, associados ou não ao EDTA). Os canais foram modelados e posteriormente clivados para análise em MEV (ampliação de 2000x). Imagens de eletromicrografias foram obtidas nos terços cervical, médio e apical. A presença e as características da smear layer formadas foram categorizadas. As imagens foram analisadas por dois avaliadores, previamente, calibrados. Após a análise de concordância (Kappa = 0,806) dos escores, os dados foram tratados com o uso do teste Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Comparações Múltiplas SNK. O nível de significância foi de 5%. **Resultados:** a utilização do soro fisiológico e do NaOCl líquido, associados à irrigação final com EDTA, apresentou os melhores resultados de limpeza. Com o uso do NaOCl gel e da base gel, sem associação ao EDTA, houve uma maior quantidade de resíduos sobre as paredes dentinárias. Além disso, independentemente da substância irrigadora testada, pode-se observar que houve uma melhor capacidade de remoção da smear layer no terço cervical em relação ao apical. **Conclusões:** observou-se formação de smear layer após o preparo do canal radicular associado ao NaOCl líquido ou gel. A aplicação de EDTA promoveu a remoção da smear layer produzida durante o preparo do canal.

**Palavras-chave:** Endodontia. Preparo de canal radicular. Hipoclorito de sódio. Microscopia Eletrônica de Varredura.

### Abstract

**Introduction:** the formation of smear layer during the preparation of root canals with the use of sodium hypochlorite solution has been widely studied; however, in the gel presentation there aren't reports in the literature. **Objective:** to evaluate, in SEM, the formation of smear layer during endodontic preparation, using NaOCl in liquid and gel forms, associated or not with EDTA. **Methods:** sixty palatal roots of maxillary molars or distal roots of lower molars, with a root length of 15 mm, were used. The samples were divided into four control groups with n = 5 each (saline or gel base, associated or not with EDTA) and four test groups (n = 10 each) according to the irrigation substance used during the preparation (2.5% NaOCl solution or gel, associated or not with EDTA). The root canals were instrumented and later split for SEM analysis (2000x magnification). Electromicrographic images were obtained from the cervical, middle and apical thirds. The presence and characteristics of the smear layer formed were categorized. The images were analyzed by two previously calibrated evaluators. After the Kappa analysis (0.806), the data were treated using the Kruskal-Wallis test, complemented by the SNK Multiple Comparison Test. The level of significance was 5%. **Results:** the use of saline and liquid NaOCl, associated with final rinsing with EDTA, showed the best cleaning results. With the use of NaOCl gel and gel base, with no EDTA association, there was a greater amount of residues on the dentin surfaces. In addition, despite the irrigation substance tested, it can be observed that there was a better capacity of removal of the smear layer in the cervical third in relation to the apical. **Conclusion:** root canal instrumentation associated with NaOCl solution or gel EDTA produced smear layer. Smear layer was removed with the use of EDTA as a final flushing.

**Key words:** Endodontics. Root canal preparation. Sodium hypochlorite. Scanning Electron

### INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos metabólicos são considerados os principais responsáveis pelo desenvolvimento e pela perpetuação das doenças pulpares e periapicais. Desse modo, a desinfecção do sistema de canais radiculares é parte essencial para que se atinja o sucesso do tratamento endodôntico. Embora existam variedades de técnicas e

**Correspondente:** Simone Bonato Luisi. Departamento de Odontologia Conservadora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2492 – Bairro Santana. CEP 90035-003. Porto Alegre, RS - Brazil E-mail: simone.luisi@ufrgs.br

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 14 Set 2018; Revisado em: 21 Jan 2019; 5 Feb 2019; Aceito em: 8 Feb 2019

métodos de instrumentação, é frequente a permanência de resíduos, microrganismos, restos de tecido pulpar e raspas de dentina, após a finalização do preparo químico mecânico<sup>1,2</sup>. Remanescentes de tecido necrótico no interior do canal radicular podem ser uma fonte de nutrição para os microrganismos sobreviventes<sup>3</sup>.

Em função da complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, aproximadamente 50% das paredes dos canais permanecem não instrumentadas durante o preparo, o que resulta em uma limpeza insuficiente<sup>4</sup>. Por essa razão, deve-se combinar o uso de substâncias químicas ao preparo mecânico, a fim de potencializar e complementar o processo de desinfecção. Os agentes químicos selecionados como substâncias irrigadoras devem apresentar algumas propriedades principais, como atividade antimicrobiana, poder de dissolução de matéria orgânica, baixa tensão superficial, ação lubrificante e devem ser atóxicos para tecidos periapicais<sup>5</sup>.

A substância irrigadora mais amplamente utilizada na endodontia é o hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0,5% a 6,0%, devido à sua ação antimicrobiana, pela formação de ácido hipocloroso e posterior liberação de cloro livre e sua capacidade de dissolução da matéria orgânica por meio da quebra de proteínas e aminoácidos<sup>6,7</sup>.

No entanto, existem algumas desvantagens quando do emprego do NaOCl como substância irrigadora. Além do odor e do sabor desagradável, a atividade citotóxica dessa substância pode causar lesões agudas, caso atinja a região periapical. Em contato com tecidos vitais, o NaOCl rapidamente oxida a matéria orgânica, levando a uma rápida hemólise e ulceração, inibição da migração de neutrófilos e destruição de células endoteliais e fibroblastos<sup>8,9</sup>.

A extrusão de NaOCl para os tecidos periapicais, durante o tratamento endodôntico, provoca sintomas agudos imediatos, potencialmente graves e com riscos de sequelas<sup>10-12</sup>. Segundo o estudo de Kleier et al. (2008), sobre a ocorrência de acidentes com NaOCl por endodontistas da American Board, quase metade dos profissionais relataram a ocorrência de pelo menos um acidente com NaOCl durante o tratamento endodôntico<sup>13</sup>.

Por esta razão, muitas tentativas têm sido feitas para encontrar outras formulações de substâncias irrigadoras eficientes, com uma elevada ação antimicrobiana, que apresentem baixo poder de toxicidade<sup>14</sup>.

As substâncias utilizadas durante o preparo químico mecânico são geralmente líquidas. A utilização de uma substância irrigadora mais viscosa pode ser interessante para evitar ou reduzir o risco da sua penetração nos tecidos periapicais<sup>5,14</sup>.

Ferraz et al. (2001) mostraram que a clorexidina quando utilizada na forma de gel a 2%, devido à sua viscosidade, promove uma melhor ação no interior do canal radicular, removendo dentina e tecidos remanescentes quando associado ao ato

de instrumentação. Essa condição permite que a clorexidina ultrapasse a sua incapacidade de dissolver tecidos orgânicos<sup>14</sup>. Considerando os aspectos levantados, o NaOCl, na forma de gel, pode ser uma boa opção como auxiliar químico no preparo dos canais radiculares. O produto preservaria as suas propriedades químicas e biológicas associadas à ação mecânica do gel. Além disso, segundo o estudo de Zand et al. (2010), o uso de gel de NaOCl pode ser eficaz, também, na remoção da *smear layer*<sup>9</sup>.

Para Poggio et al. (2010), a utilização de bases viscosas nas substâncias irrigadoras podem deixar resíduos, pouco solúveis em água, aderidos às paredes dentinárias, o que prejudica sua remoção<sup>5</sup>.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a formação de *smear layer* com a realização do preparo químico-mecânico, utilizando o NaOCl nas formas líquida e gel, associado ou não à irrigação final com EDTA.

## MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da mesma instituição (Protocolo CAAE 68435317.1.0000.5347).

### Preparação do gel de hipoclorito de sódio a 2,5%

A base do gel foi produzida a partir de 10% de gel, com viscosidade de 450 centipoises, similar ao gel de clorexidina a 2% (Essential Pharma, Itapetinga, São Paulo, Brasil), a 25,9°C com um torque de 17,2% a 10 rotações por minuto (RPM). A base utilizada é um polímero sintético, solúvel em água, transparente, biocompatível, biologicamente inerte, não mutagênico, nem citotóxico, pois não tem atividade carcinogênica ou antigênica.

O gel ou solução de hipoclorito de sódio a 2,5% foi produzido pela fórmula:  $C1.V1 = C2.V2$  (concentração1 X volume1 = concentração2 X volume2), a partir de uma solução concentrada de NaOCl, previamente denominada (Mediquímica Indústria Ltda., Porto Alegre, Brasil).

### Preparo das amostras

Sessenta raízes distais de molares inferiores ou palatinas de molares superiores humanos foram divididas em quatro grupos-teste (solução de NaOCl a 2,5% ou gel, associado ou não à solução EDTA a 17%) e em quatro grupos-controle (soro fisiológico ou gel, associado ou não ao EDTA a 17%). Para padronizar o comprimento em 15 mm, as coroas dos dentes foram removidas na junção amelocementária.

A exploração inicial do canal radicular foi realizada com um instrumento endodôntico manual de aço inoxidável tipo K #15 (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça), penetrando gradualmente até que a ponta do instrumento ficasse justaposta

à saída foraminal. Então, 1 mm foi deduzido, determinando o comprimento de trabalho (CT). O diâmetro na região apical dos canais foi padronizado com o instrumento tipo K #20, e canais com diâmetros menores ou maiores que este foram excluídos do estudo.

Previamente, a realização dos protocolos de tratamento, com o auxílio de um disco diamantado dupla face (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, São Paulo, Brasil), em baixa-rotação, foram realizados sulcos de orientação na face externa das raízes, no sentido longitudinal das faces vestibular e lingual, com o cuidado para não atingir o interior do canal radicular. Esse procedimento foi realizado a fim de facilitar a clivagem das amostras após a realização dos protocolos de tratamento nos grupos experimentais.

Inicialmente, os canais foram explorados no CT com instrumentos endodônticos tipo K #10 e #15 (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Para o preparo dos canais radiculares, foram utilizados instrumentos endodônticos tipo K, primeira e segunda séries, seguindo a técnica de step-back com recuo progressivo e programado. Como instrumento memória foi padronizado o #35, o escalonamento foi realizado até o instrumento #50.

Antes do uso de cada instrumento, o canal radicular foi preenchido em toda a sua extensão com irrigantes testes ou controles. Após o uso de cada instrumento, foi feita a irrigação do canal radicular, a 4 mm aquém do CT, com 2 mL de soro fisiológico visando à remoção de resíduos do material excisado e do irrigante.

Metade das amostras recebeu toaleta final de solução de EDTA a 17% (Iodontec Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda., Porto Alegre, Brasil) por 3 minutos. O quelante foi colocado no interior do canal radicular, agitado com o instrumento memória, permanecendo por 3 minutos.

### **Análise da formação da *smear layer***

Após a realização dos protocolos, as amostras foram clivadas e analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (JEOL JSM 6060, JEOL, Akishima, Japão) com um aumento de 2000 vezes, seguindo o protocolo descrito por Ahmetoglu et al. (2014)<sup>15</sup>.

Micrografias eletrônicas foram realizadas em três zonas de cada hemisseção dentária. A zona mais cervical localizava-se nos 3 mm iniciais do canal radicular, a região mais apical nos 3 mm finais e a região do meio localizada no espaço entre as duas medidas anteriores. Todas as micrografias foram salvas em arquivo digital (CD-ROM, CD-R Maxell®) com resolução (600 dpi). As imagens foram codificadas com o objetivo de cegar os grupos.

A análise das imagens das micrografias foi realizada por dois

avaliadores previamente calibrados, utilizando como critério os escores definidos pelo estudo anterior (Quadro 1)<sup>16</sup>.

Previamente à análise estatística, foi determinada a concordância entre os escores atribuídos às amostras pelos dois avaliadores que participaram deste estudo, por meio do Teste Kappa. O valor Kappa obtido foi de 0,806.

**Quadro 1.** Tabela descritiva dos escores.

<b>Escores</b>	<b>Descrição dos escores</b>
Escore 0	Ausência de <i>smear layer</i> . Túbulos dentinários abertos e livres de debris.
Escore 1	<i>Smear layer</i> moderada. Contorno dos túbulos dentinários visíveis ou parcialmente preenchidos com detritos.
Escore 2	Espessa camada de <i>smear layer</i> . Túbulos dentinários obliterados.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o apoio do Statistical Package for the Social Sciences - SPSS versão 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). A hipótese nula foi que não há diferença estatística na formação da *smear layer* promovida pelos auxiliares químicos testados (teste de Kruskal Wallis, SNK Multiple Comparison Test).

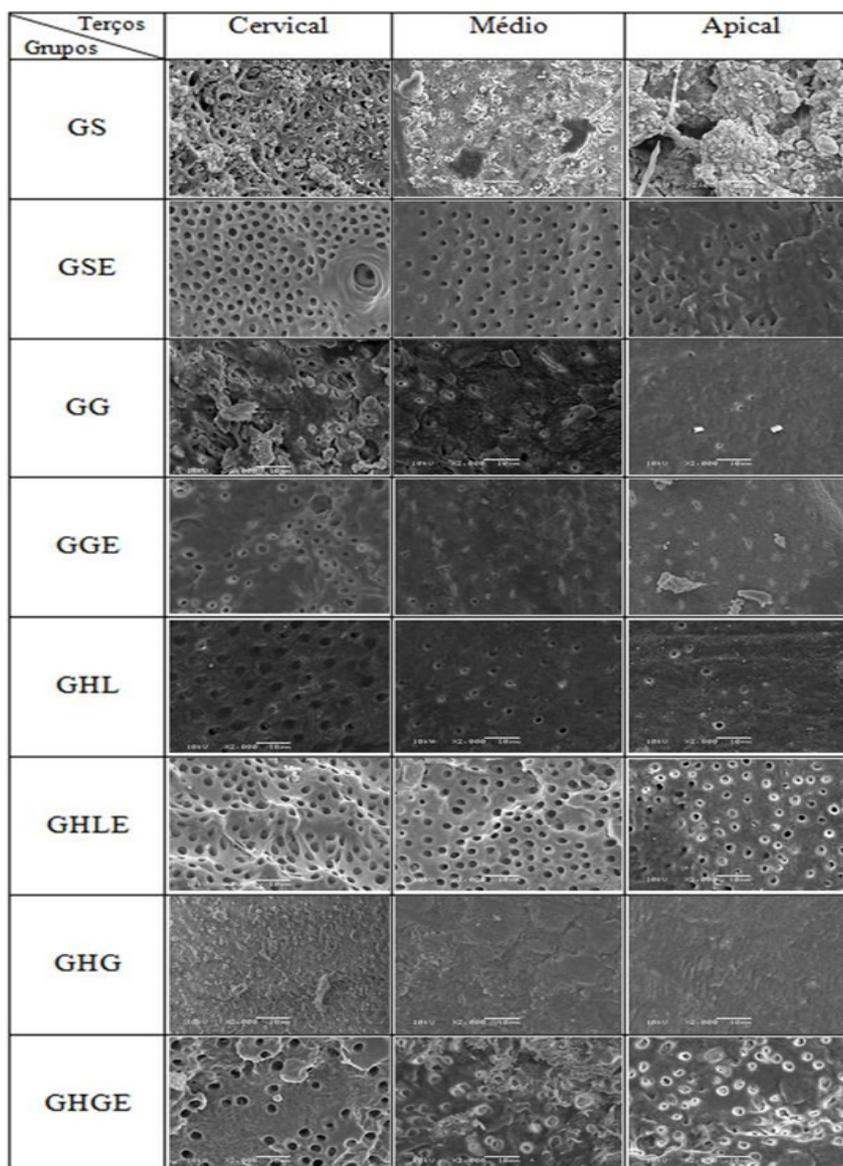
### **RESULTADOS**

Os resultados para os grupos experimentais em cada terço radicular estão expressos na tabela 1. Comparando os grupos da mesma substância irrigadora, com e sem associação de EDTA, pode-se verificar que os melhores resultados de limpeza da parede dentinária e a presença de túbulos dentinários abertos nos três terços do canal radicular estavam nos grupos que utilizavam o EDTA. A única exceção foi nos grupos de controle de gel. Observou-se, também, que nos grupos que utilizaram soro fisiológico ou solução de NaOCl, associados ao toaleta final com EDTA, obtiveram os melhores resultados de limpeza nos três terços radiculares em relação aos demais grupos testados. Os piores resultados, com diferença estatisticamente significativa, foram verificados nos grupos que utilizaram o NaOCl gel e os grupos controle com gel e soro fisiológico, todos sem associação com EDTA. A comparação entre os três terços radiculares em cada um dos grupos experimentais é mostrada também na tabela 1. Pode-se verificar que o terço cervical apresentou os melhores resultados de limpeza da parede dentinária e a presença de túbulos dentinários abertos em todos os grupos testados, quando comparados ao apical terço do canal (Figura 1), com diferença estatística significativa nos grupos soro fisiológico (GS), Gel + EDTA (GGE), Solução de NaOCl + EDTA (GHLE), Gel de NaOCl (GHG) e Gel de NaOCl + EDTA (GHGE).

**Tabela 1.** Grau de presença de *smear layer* formada entre os grupos experimentais em relação a cada terço radicular.

Grupos Experimentais	Escores	Terços radiculares		
		Terço Cervical	Terço Médio	Terço Apical
Soro fisiológico	0	1	0	0
	1	3	1	0
	2	1	4	5
		AB a	A ab	A b
Soro fisiológico + EDTA	0	5	4	4
	1	0	1	1
	2	0	0	0
		A a	B a	C a
Gel	0	0	1	0
	1	3	1	0
	2	2	3	5
		B a	AB a	A a
Gel + EDTA	0	3	1	0
	1	2	1	0
	2	0	3	5
		AB a	AB ab	A b
Solução de NaOCl	0	4	4	1
	1	6	6	8
	2	0	0	1
		AB a	AB a	B a
Solução de NaOCl + EDTA	0	8	5	1
	1	2	5	9
	2	0	0	0
		A a	B ab	BC b
Gel de NaOCl	0	0	0	0
	1	7	4	1
	2	3	6	9
		B a	A ab	A b
Gel de NaOCl + EDTA	0	4	0	1
	1	4	6	2
	2	2	4	7
		AB a	AB ab	AB b

**Nota:** Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença estatística significativa no mesmo terço radicular para os diferentes grupos (teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo Teste de Comparação Múltipla SNK). Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença estatística significativa entre os diferentes terços radiculares, considerando o mesmo irrigante (teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo SNK Multiple Comparison Test). O nível de significância foi de 5%.

**Figura 1.** Micrografias obtidas por MEV dos três terços radiculares dos diferentes grupos experimentais.

## DISCUSSÃO

O uso do NaOCl gel pode ser eficaz na remoção da *smear layer* e ainda eliminar os efeitos colaterais da solução de hipoclorito de sódio<sup>9</sup>. A *smear layer* dificulta o contato da solução irrigadora com a superfície dentinária, afetando, negativamente, o processo de desinfecção do sistema de canais radiculares, além de reduzir os níveis de resistência de união dos materiais seladores à dentina e favorecer a microinfiltração coronária<sup>17</sup>. O gel de clorexidina, por exemplo, como auxiliar químico intracanal, no estudo de Gonçalves et al. (2014)<sup>18</sup> mostrou ação antimicrobiana em microrganismos como *Enterococcus faecalis* e sua viscosidade produziu excelente ação conjunta no processo de limpeza mecânica do sistema de canais radiculares.

A hipótese nula de que não haveria diferença estatística na formação da *smear layer* promovida pelos auxiliares químicos testados foi rejeitada. No estudo, pode-se observar que a limpeza da parede dentinária, com a presença de mais túbulos

dentinários abertos, foi melhor quando da utilização do soro fisiológico e do NaOCl líquido como substâncias irrigadoras, ambos associados à irrigação final com EDTA. Essa constatação também foi obtida no estudo de Menezes et al. (2003)<sup>19</sup>. Por outro lado, os grupos que utilizaram o NaOCl na forma de gel e controle de base gel, ambos sem uso do EDTA, demonstraram os resultados com maior frequência de escores elevados para a presença de *smear layer*. Nascimento et al. (2015) observaram que as substâncias irrigadoras na forma de gel testadas (NaOCl a 5%, Clorexidina a 2% e EDTA a 24%) permaneceram aderidas às paredes do canal<sup>20</sup>.

No estudo de Zand et al. (2010), não se verificou diferença entre os grupos de NaOCl na forma de gel e líquido, ambos com uso de EDTA<sup>9</sup>. A associação do NaOCl gel e EDTA, no nosso estudo, apresentou um resultado melhor que sem a associação desse quelante, embora sem diferença estatística. Os túbulos

dentinários ainda apresentavam resíduos sobre a sua superfície.

Comparando a mesma substância irrigadora, com e sem associação do quelante, pode-se verificar que os melhores resultados nos três terços radiculares de limpeza da parede dentinária e presença de túbulos dentinários abertos foram nos grupos que utilizaram o EDTA. Esses achados estão de acordo com os obtidos nos estudos de Yamashita et al. (2003)<sup>21</sup> e Vasconcelos et al. (2007)<sup>22</sup>.

A associação da substância irrigadora que, no caso do estudo, é o NaOCl, ao EDTA tende a promover um maior poder de limpeza nas paredes dentinárias durante o preparo pelo fato de a substância irrigadora ser um agente halógeno e do ácido etilenodiamino tetra-acético ser um quelante; combinação que promove uma ação mais eficaz nas porções orgânicas e inorgânicas da *smear layer*.

Na comparação da limpeza dentinária entre os três terços radiculares, pode-se verificar que o terço cervical apresentou os melhores resultados em todos os grupos testados quando

comparados ao terço apical do canal, assim como nos estudos de Yamashita et al. (2003)<sup>21</sup>, Carvalho et al. (2008)<sup>23</sup> e Kumar et al. (2015)<sup>24</sup>. Somente o estudo de Mônica e Fröner (2006)<sup>25</sup> não observou diferença entre os três terços radiculares.

Segundo Carvalho et al. (2008)<sup>23</sup>, a obtenção de um melhor poder de limpeza no terço cervical, seguido do médio e apical deve-se à facilidade de execução do procedimento de irrigação e aspiração; somado a isso, um maior volume de substância irrigadora que circula nessa região mais cervical do canal radicular.

## CONCLUSÕES

De acordo com o estudo, independentemente dos auxiliares químicos testados, a associação do toailete final com EDTA promoveu uma maior limpeza da parede dentinária. O soro fisiológico e o NaOCl líquido a 2,5%, associados ao EDTA, apresentaram os resultados mais favoráveis para a limpeza das paredes do canal radicular. Independentemente do auxiliar químico, houve uma melhor capacidade de remoção da *smear layer* no terço cervical em relação ao apical.

## REFERÊNCIAS

- Machado M, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J*. 2013 Nov; 46(11): 1083-7. doi: 10.1111/iej.12108.
- Raut AW, Mantri V, Palekar A, Gadodia R, Kala S, Raut RA. Comparative analysis of cleaning ability of three nickel-titanium rotary systems: protaper universal, k3 and mtwo: an in vitro scanning electron microscopic study. *Niger Postgrad Med J*. 2016 Oct-Dec; 23(4):221-6. doi: 10.4103/1117-1936.
- Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004 Nov; 30(11):785-7.
- Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod*. 2001 Jan; 27(1):1-6.
- Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Chiesa M, Sforza D, Visai L. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite-based irrigating solutions. *Int J Artif Organs*. 2010 Sep; 33(9):654-9.
- Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006 May; 32(5):389-98.
- Jayasimha RU, Mylswamy S. The Effect of 4% Lignocaine gel, 5% Amiloride HCl and 10% Chlorpromazine on *E.faecalis*. *J Conserv Dent*. 2011 Apr; 14(2):160-3. doi: 10.4103/0972-0707.82623.
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod*. 1985 Dec; 11(12):525-8. doi: 10.1016/S0099-2399(85)80197-7.
- Zand V, Lotfi M, Rahimi S, Mokhtari H, Kazemi A, Sakhmanesh V. A comparative scanning electron microscopic investigation of the smear layer after the use of sodium hypochlorite gel and solution forms as root canal irrigants. *J Endod*. 2010 Jul; 36(7): 1234-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.033.
- Bosch-Aranda ML, Canalda-Sahli C, Figueiredo R, Gay-Escoda C. Complications following an accidental sodium hypochlorite extrusion: a report of two cases. *J Clin Exp Dent*. 2012 Jul; 4(3):e194-e198. doi: 10.4317/jced.50767.
- Kandian S, Chander S, Bishop K. Management of sodium hypochlorite extrusion beyond the root apex during root canal treatment: a case report. *Prim Dent J*. 2014 Feb; 3(1):72-5. doi: 10.1308/205016814812135805.
- Guivarc'h M, Ordioni U, Ahmed HM, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review. *J Endod*. 2017 Jan; 43(1):16-24. doi: 10.1016/j.joen.2016.09.023.
- Kleier DJ, Averbach RE, Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: experience of diplomates of the american board of endodontics. *J Endod*. 2008 Nov; 34(11):1346-50. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.02.
- Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001 Jul; 27(7):452-5.
- Ahmetoglu F, Keles A, Yalcin M, Simsek N. Effectiveness of different irrigation systems on smear layer removal: A scanning electron microscopic study. *Eur J Dent*. 2014 Jan-Mar; 8(1):53-7. doi: 10.4103/1305-7456.126241.
- Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod*. 2003 Mar; 29(3):170-5. doi:10.1097/00004770-200303000-00002.
- Prado M, Assis DF, Simão RA. Efeito de diferentes soluções utilizadas como irrigante final na superfície dentinária: análise de rugosidade. *Rev Odontol UNESP*. 2014; 43(1):36-40. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1807-25772014000100006.
- Gonçalves L, Silva-Sousa YT, Raucci Neto W, Teixeira CS, Sousa-Neto MD, Alfredo E. Effect of different irrigation protocols on the radicular dentin interface and bond strength with a metacrylate-based endodontic sealer. *Microsc Res Tech*. 2014 Jun; 77(6):446-52. doi: 10.1002/jemt.22365.
- Menezes AC, Zanet CG, Valera MC. Smear layer removal capacity of disinfectant solutions used with and without edta for the irrigation of canals: a sem study. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Out-Dez; 17(4): 349-55. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S1517-74912003000400010.

20. Nascimento AL, Busanello FH, Só MV, Kuga MC, Pereira JR, Grecca FS. Residues of different gel formulations on dentinal walls: a sem/eds analysis. *Microsc Res Tech*. 2015; 78(6):495-9. doi: 10.1002/jemt.22500.
21. Yamashita JC, Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *Int Endod J*. 2003 Jun; 36(6):391-4.
22. Vasconcelos BC, Luna-Cruz SM, De-Deus G, Moraes IG, Maniglia-Ferreira C, Gurgel-Filho ED. Cleaning ability of chlorhexidine gel and sodium hypochlorite associated or not with EDTA as root canal irrigants: a scanning electron microscopy study. *J Appl Oral Sci*. 2007 Oct;15(5): 387-91.
23. Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod*. 2008 Nov; 34(11):1396-1400. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.012.
24. Kumar P, Prasad N, Darawade A, Bhagat SK, Narayana N, Darawade P. The effect of four commonly used root canal irrigants on the removal of smear layer: an in-vitro scanning electron microscope study. *J Int Oral Health*. 2015 Sep; 7(9):88-93.
25. Mônica CM, Fröner IC. A scanning electron microscopic evaluation of different root canal irrigation regimens. *Braz Oral Res*. 2006 Jul-Sep; 20(3): 235-40.

**Como citar este artigo/How to cite this article:**

Luz LB, Santana RMC, Prates A, Froehlich J, Melo TAF, Montagner F, Luisi SB. Avaliação da formação de smear layer no preparo químico mecânico realizado com solução ou gel de hipoclorito de sódio a 2,5%. *J Health Biol Sci*. 2019 Abr-Jun; 7(2):159-165

# Avaliação do conhecimento das famílias sobre a higienização bucal e o uso domiciliar de fluoretos em crianças de uma faculdade particular do Espírito Santo

## Evaluation of household knowledge about oral hygiene and home use of fluoride in children of a Private College in Espírito Santo

Ive Barteli Camatta<sup>1</sup>, Carolina Steiner-Oliveira<sup>2</sup>

1. Pós-graduanda em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil. 2. Docente do curso de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), Piracicaba, SP, Brasil.

### Resumo

**Introdução:** cárie dentária é um problema de saúde pública e compromete a qualidade de vida dos indivíduos. O uso de dentifícios fluoretados associado à escovação mecânica vem sendo bastante estudado como controle da doença. **Objetivo:** avaliar o conhecimento dos pais e/ou responsáveis por crianças frequentadoras da Clínica Odontológica da Faculdade Faesa (ES), sobre a higienização bucal e o uso de dentifício fluoretado. **Métodos:** foram analisados 46 questionários, contendo 12 questões objetivas. **Resultados:** a análise estatística descritiva dos dados demonstrou que 78,3% das crianças utilizavam dentifício fluoretado, 93,5% dos pais não sabiam a concentração de fluoreto presente no creme dental das crianças, desconheciam o momento para se introduzir o dentifício fluoretado; 60,9% dos pais não sabiam o que poderia ocorrer a partir da ingestão do dentifício fluoretado e 71,4% responderam que a função do fluoreto era prevenir a cárie. Para 50,0% das famílias, a introdução do creme dental fluoretado foi apenas a partir do segundo ano de vida e apenas 4,4% sabiam que as lesões de cárie se iniciam pela presença de uma mancha branca. **Conclusão:** pais e/ou responsáveis possuem conhecimento sobre a função do fluoreto, a quantidade de dentifício que deve ser utilizada em cada faixa etária; porém, desconhecem a concentração de fluoreto presente no creme dental, não sabem o momento correto para introduzir o dentifício fluoretado ou os riscos de desenvolvimento de fluorose dentária.

**Palavras-chave:** Cárie dentária. Dentifícios. Fluoretos.

### Abstract

**Introduction:** Caries is considered a public health problem that compromise individual's quality of life. The use of fluoridated dentifrices together with mechanical brushing have been widely studied as a control of the disease. This research evaluated the level of knowledge of parents and/or guardians of children attending the Dental Clinic of Faesa College (Vitória, ES), regarding information about dental hygiene, use of toothpaste. **Methods:** We analyzed 46 questionnaires, containing 12 objective questions. **Results:** The descriptive statistical analysis showed that 78.3% of the children used fluoride dentifrice, 93.5% of the parents did not know the fluoride concentration present in the children's toothpaste, they did not know when to introduce the fluoride dentifrice, 60.9% of the parents did not know what could occur from the ingestion of the fluoride dentifrice and 71.4% answered that fluoride function was to prevent caries. For 50.0% of the families, the introduction of the fluoride toothpaste was only from the second year of life and only 4.4% knew that the caries lesions are initiated by the presence of a white spot. **Conclusion:** Parents and/or caregivers have knowledge about the function of fluoride, the amount of toothpaste that should be used in each age group; however, are unaware of the fluoride concentration present in the toothpaste, do not know the correct time to introduce the fluoride dentifrice or the risks of developing dental fluorosis.

**Key words:** Dental caries. Dentifrices. Fluorides

### INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada um problema de saúde pública e continua comprometendo a qualidade de vida dos indivíduos<sup>1</sup>. Ela é provocada por bactérias que estão presentes na cavidade bucal e, para ocorrer, depende da presença do biofilme e do açúcar. A correta higienização, com o objetivo de desorganizar o biofilme, é necessária para prevenir essa doença que é bastante frequente em crianças pré-escolares<sup>2</sup>.

A prevalência de cárie tem diminuído com o passar dos anos no Brasil, porém o SB Brasil 2010 apontou que o índice de dentes

ceo-d (dentes cariados, extraídos e obturados) em crianças de 5 anos de idade passou de 2,8 em 2003, para 2,3 em 2010, uma redução de apenas 17,0%, com 80,0% desses dentes não tratados<sup>3</sup>. Por esse motivo, o uso de dentifícios fluoretados, juntamente com a escovação mecânica, vêm sendo bastante estudados como forma de controle da doença cárie.

Para que o dentifício fluoretado seja eficaz, ele precisa possuir concentração mínima de 1.000 ppm F (mg F/Kg) e a escovação

**Correspondente:** Profa. Dra. Carolina Steiner-Oliveira, Departamento de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 52, 13414-903, Piracicaba, SP, Brasil, e-mail: csteiner@unicamp.br

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido 22 Jan 2019; Revisado: 6 Fev 2019; 21 Fev 2019; Aceito: 22 Fev 2019

deve ser realizada pelo menos duas vezes por dia, de acordo com a melhor evidência científica atual<sup>4</sup>. Porém, é necessário que as crianças, principalmente em idade pré-escolar, tenham acompanhamento dos pais ou responsáveis durante a higienização, visto que a maioria delas ainda não possui todos os reflexos totalmente desenvolvidos e podem deglutir o dentífrico<sup>5</sup>, além da falta de destreza manual para executar a tarefa de maneira satisfatória. O dentífrico fluoretado pode ser considerado um veículo de efeito preventivo-terapêutico, anticariogênico e, por essa razão, deve ser utilizado de maneira correta obedecendo a suas indicações para promover seu benefício de redução de cárie com pouco efeito adverso<sup>6</sup>.

Quando utilizado de forma indevida e deglutido de forma crônica, os dentífricos fluoretados podem ser atribuídos ao desenvolvimento da fluorose dentária. A crescente popularidade de dentífricos aromatizados, coloridos e com apelos comerciais, tendo as crianças como público-alvo, tornou necessário conhecer a relação entre os dentífricos e sua ingestão, bem como o conhecimento dos pais e/ou responsáveis diante da técnica de escovação e uso dos cremes dentais fluoretados. Uma higienização inadequada poderia resultar em um aumento significativo e preocupante na ingestão de flúoreto durante a escovação e possivelmente contribuir para um futuro aumento na prevalência de fluorose dentária<sup>7,8</sup>.

A literatura mostra que muitos pais têm dificuldade para evitar a ocorrência da cárie dentária em idade precoce, apesar de possuir o conhecimento a respeito dos benefícios associados à utilização do flúoreto, mas ainda desconhecer o risco de desenvolvimento de fluorose dentária, caso ele seja utilizado indiscriminadamente<sup>1,9</sup>. Além disso, o limitado conhecimento parental e atitudes precárias em relação à saúde bucal são associados à maior experiência de cárie em lactentes e em crianças jovens<sup>9</sup>. Os dentífricos indicados para crianças são diversos, possuem muitas características distintas, deixando os pais em dúvida durante a escolha do melhor produto. Por essa razão, é necessário saber qual o tipo de informação que os pais possuem sobre os dentífricos, a correta forma de higienização e de controle da doença cárie dentária.

Dessa forma, o objetivo, deste estudo, foi avaliar o nível de conhecimento dos pais e/ou responsáveis por crianças de 01 a 10 anos, frequentadoras da Clínica Odontológica da Faculdade Faesa (ES), sobre a higienização bucal e o uso de dentífrico fluoretado.

## MÉTODOS

### Aspectos Éticos

Como a realização desta pesquisa incluiu experimentos em humanos, o estudo foi conduzido após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas em coparticipação com as Faculdades Integradas Espírito-Santenses (FAESA) (CAAE 97317018.7.0000.5418). Todos os responsáveis

pelos participantes assinaram o “Termo de consentimento livre e esclarecido”, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 466/2012).

### Seleção da amostra

A coleta de dados ocorreu na Clínica Odontológica do campus Faculdades Integradas São Pedro (FAESA), Vitória (ES) na disciplina de Odontopediatria I e II em que pais e/ou responsáveis por crianças que frequentam a referida clínica foram convidados a participar do estudo. A abordagem foi feita na sala de espera da clínica no período entre fevereiro de 2018 a junho de 2018.

### Crítérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão, foram inseridos pais e/ou cuidadores de crianças com idades de 01 a 10 anos que concordassem em participar da pesquisa.

### Delineamento experimental

Este foi um estudo transversal-observacional de uma amostra de conveniência de 46 participantes com idade estimada entre de 18 e 50 anos, pais e/ou responsáveis por crianças de 1 a 10 anos que frequentaram a Clínica de Odontopediatria das Faculdades Integradas São Pedro (FAESA), Vitória (ES). Todos os pais e/ou responsáveis que atendiam ao critério de inclusão foram abordados e os que consentiram participar do estudo preencheram um questionário contendo 12 questões, conforme seguem abaixo

1. Seu filho (a) usa pasta de dente com flúor?
2. Qual idade seu filho (a) começou a usar pasta de dente com flúor?
3. Você sabe qual a quantidade de flúor presente na pasta de dente que seu filho (a) usa?
4. Se seu filho (a) FAZ uso da pasta de dente com flúor, quem indicou?
5. Se seu filho (a) NÃO faz uso de pasta de dente com flúor, qual o motivo?
6. O que você acha que pode acontecer se seu filho (a) engolir a pasta de dente?
7. Quem é responsável pela higiene bucal da criança?
8. Quem é responsável por colocar a pasta de dente na escova da criança?
9. Qual quantidade de pasta de dente é colocada na escova?
10. Você sabe a função do flúor?
11. Você sabe como surge a cárie?
12. Para você, qual é a maneira mais eficaz de controlar a doença cárie?

### Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica Microsoft Excel e, em seguida, a análise descritiva com distribuição das

frequências entre as variáveis coletadas foi avaliada, utilizando-se o software Biostat 5,0 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM).

## RESULTADOS

Quarenta e seis questionários foram respondidos por pais e/ou responsáveis por crianças de 01 a 10 anos. A média de idade das crianças foi de 6,1 anos, as características de sexo e as porcentagens de cada resposta aos questionamentos estão descritos na tabela 1. Com respeito a informações adicionais relacionadas ao uso do creme dental fluoretado, 15 (33,3%) pais responderam ter iniciado a usar por conta própria ou por costume de todos utilizarem e, alguns responderam que

não sabiam quem havia indicado; 14 (31,1%) responderam ser indicação de amigos ou familiares, 11 (24,4%) relataram ter sido indicação do dentista (Odontopediatra) e 05 (11,1%) informaram usar dentifrício fluoretado, pois o médico pediatra havia indicado. Para as crianças que não utilizavam creme dental com fluoreto, foi perguntado o motivo pela escolha e 17 (85,0%) pais responderam não saber o motivo, ou ter lido na embalagem do produto que para crianças com idade entre 0 e 2 anos era indicado pasta sem fluoreto ou os pais acharam que não deveriam usar; 02 (10,0%) pais reponderam ter sido indicação do médico pediatra e apenas 01 (5,0%) dos pais respondeu ter medo de o filho desenvolver fluorose.

**Tabela 1.** Conhecimento dos pais em relação à higiene bucal dos filhos, ao uso de fluoreto, risco de fluorose e doença cárie, Vitória, ES, 2018 (n = 46).

Variáveis	Número	Porcentagem %
<b>Sexo</b>		
Feminino	18	39,1
Masculino	28	60,9
<b>1. Uso de dentifrício fluoretado</b>		
Sim	36	78,3
Não	04	8,7
Não sei	06	13,0
<b>2. Idade que a criança começou a usar dentifrício fluoretado</b>		
A partir do nascimento do primeiro dente	02	4,4
Com 01 ano de vida ou mais	13	28,3
Com 02 anos de vida ou mais	23	50,0
Não sei	08	17,4
<b>3. Quantidade de fluoreto presente no dentifrício</b>		
500 ppm	03	6,5
1100 ppm	00	0,0
Não sei	43	93,5
<b>4. Quem indicou o dentifrício fluoretado?</b>		
Médico pediatra	05	11,1
Amigos ou familiares	14	31,1
Dentista (Odontopediatra)	11	24,4
Mídias sociais (Facebook, Instagram, etc...)	00	0,0
Outros (decisão familiar)	15	33,3
<b>5. Motivo de não usar dentifrício fluoretado</b>		
Indicação do médico pediatra	02	10,0
Medo de desenvolver fluorose	01	5,0
Outros (decisão familiar)	17	85,0
<b>6. Riscos após deglutição de dentifrício fluoretado</b>		
Vai passar mal	04	8,7
Manchas brancas nos dentes permanentes	02	4,4
Nada	12	26,1

Variáveis	Número	Porcentagem %
Não sei	28	60,9
<b>7. Responsável pela higiene bucal da criança</b>		
A criança somente	00	0,0
Os pais ou algum responsável	10	21,7
Os pais e a criança	36	78,3
<b>8. Responsável por colocar o dentifrício na escova da criança</b>		
A criança somente	12	28,3
Os pais ou algum responsável	34	71,7
<b>9. Quantidade de dentifrício na escova da criança</b>		
Sentido longitudinal da escova	10	21,7
Sentido transversal da escova	09	19,6
Tamanho de uma ervilha	27	58,7
<b>10. Qual a função do fluoreto?</b>		
Deixar os dentes fortes	02	4,4
Deixar os dentes brancos	01	2,1
Prevenir a cárie	33	71,7
Não sei	12	26,0
<b>11. Conhecimento sobre surgimento da doença cárie</b>		
Uma mancha branca	02	4,4
Um ponto preto	17	36,7
Uma mancha amarela	12	26,0
Um buraco no dente	03	6,5
Não sei	14	30,4
<b>12. Qual a maneira mais eficaz de controlar a doença cárie?</b>		
Reduzir a quantidade de consumo de açúcar	14	30,4
Escovar os dentes	34	73,9
Usar pasta de dentes com flúor	08	17,4
Não sei	04	8,7

## DISCUSSÃO

Existem no mercado inúmeras marcas de dentifrícios infantis e, por esse motivo, a população pode ficar em dúvida sobre qual o melhor e mais indicado para cada faixa etária. É necessário entender o nível de conhecimento dos pais e/ou responsáveis em relação ao uso de dentifrício fluoretado, o que pode ocorrer devido a sua ingestão, qual a concentração de fluoreto presente no creme dental utilizado pelas crianças, bem como é importante saber os hábitos domiciliares com a saúde bucal. A partir das respostas do presente estudo, foi possível conhecer como essa população-alvo compreende esses temas para, futuramente, promover ações que possam melhorar a atitude dos pais em face das deficiências de conhecimento sobre saúde bucal que foram encontradas.

Entre os pais entrevistados, 36 (78,3%) afirmaram que os filhos utilizavam pasta de dente com fluoreto, resultado semelhante ao estudo de Huebner et al. (2013)<sup>10</sup>, em que os autores também

observaram que a maior parte dos pais responderam que os filhos faziam uso de creme dental com fluoreto. Porém, no presente estudo, quando os pais foram perguntados a respeito da concentração de fluoreto que estava presente na pasta de dente dos filhos, 43 (93,5%) pais não souberam responder. Prabhu et al. (2013)<sup>9</sup> encontraram um resultado semelhante, em que 74,6% dos pais também não sabiam a concentração de fluoreto presente no creme dental dos filhos. Esse é um fato relevante, pois, por mais que a criança faça uso de dentifrício fluoretado, dependendo da concentração presente no creme dental, ela estará suscetível ao desenvolvimento de cárie, visto que a recomendação atual é que seja utilizada a quantidade de, pelo menos, 1.000 ppm F (mg F/Kg), 2 vezes ao dia<sup>4</sup>.

Bennadi et al. (2014)<sup>11</sup>, avaliaram que os pais sabiam a função do dentifrício fluoretado, porém não possuíam conhecimento sobre a fluorose. O fluoreto atua no processo de desmineralização e

remineralização. A remineralização ocorre quando os níveis de fluoreto na saliva e no biofilme se encontram supersaturados em relação ao esmalte, mesmo em pH crítico<sup>12</sup>. A presença constante do fluoreto (principalmente o fluoreto presente no creme dental) é responsável pela formação de fluoreto de cálcio, que atuará nas superfícies do esmalte, dentina e cimento durante o processo de desmineralização e remineralização<sup>13,14</sup>. Já a fluorose decorre da ingestão crônica de fluoreto ao longo do período de formação do esmalte dental de dentes permanentes incisivos e molares homólogos, geralmente entre o segundo e terceiro anos de vida<sup>15,16</sup>. O fluoreto em excesso incorpora-se à estrutura do esmalte e isso é, clinicamente visível, em níveis de comprometimento, dependendo da quantidade ingerida<sup>17</sup>. Os tipos mais comumente diagnosticados são a fluorose muito leve e leve, com características clínicas de estrias esbranquiçadas opacas nos dentes anteriores (incisivos centrais e laterais) e pontas de cúspides esbranquiçadas nos dentes posteriores (molares e pré-molares), comprometendo pouco menos de 25,0 a 50,0% do dente<sup>18</sup>. Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Bennadi et al. (2014)<sup>11</sup>, em que 33 (71,7%) pais sabiam que a função do fluoreto era prevenir a cárie, porém 28 (60,9%) pais não sabiam o que poderia acontecer caso o filho fizesse a ingestão do creme dental.

Nosso estudo também evidenciou que grande parte dos pais (71,7%) era responsável por colocar a pasta de dente na escova e que aproximadamente 60% relataram utilizar o tamanho de um grão de ervilha, com o que concordam outros autores 8,9. Apesar de não termos categorizado a idade da criança versus a quantidade de dentifício a ser utilizada, metade das crianças iniciaram o uso da pasta fluoretada somente a partir dos 2 anos, e a escolha dos responsáveis, que começam a se conscientizar sobre a relativa pouca quantidade (equivalente ao tamanho de um grão de ervilha) adotada por 58,7% das famílias, supera às maiores quantidades questionadas (sentido transversal ou longitudinal da escova), que somadas referem-se a 41,3%. Não obstante, os pais como responsáveis pela colocação do dentifício na escova, é considerado um fator importante, pois pode diminuir a quantidade de creme dental deglutido pelas crianças e, conseqüentemente, reduzir o risco de fluorose dentária.

De acordo com Ferreira et al. (2011)<sup>2</sup> os pais e as crianças eram responsáveis pela higienização na maior parte dos casos (76,2%). Um resultado semelhante foi encontrado neste trabalho, em que 36 (78,3%) dos pais responderam que tanto a criança quanto os pais eram responsáveis pela higiene bucal. Além disso, no estudo de Ferreira et al. (2011)<sup>2</sup> 63,4% dos pais relataram que a escovação dentária das crianças iniciou antes de 1 ano de idade, diferente dos resultados encontrados neste estudo, em que metade dos pais responderam que a higienização iniciou a partir dos 2 anos de idade. A recomendação é que a higienização com uso de escova e dentifício fluoretado seja feita a partir do momento em que ocorre a erupção do primeiro dente decíduo na cavidade bucal<sup>19</sup>. Outro fator relevante é que o controle da escovação por um adulto é indispensável para desorganizar ou

remover o biofilme dentário<sup>20</sup>.

No presente estudo, 17 (36,7%) pais responderam que a cárie surgia como um ponto preto nos dentes e apenas 2 (4,4%) pais responderam que a cárie surgia por meio de uma mancha branca. Além disso, foi perguntado aos pais a maneira mais eficaz de controlar a doença cárie e 34 (73,9%) responderam ser por meio da escovação e 14 (30,4%) pela redução da quantidade do consumo de açúcar. Esses resultados corroboram o estudo de Massoni et al. (2010)<sup>21</sup> em que 89,8% dos pais citaram que a forma mais eficaz de prevenir a cárie dentária era por meio da escovação. Uma das hipóteses para essas respostas seria de que os pais/responsáveis pelas crianças ainda desconhecem que a lesão de cárie se inicia pelo surgimento de uma mancha branca, o que pode refletir dois aspectos: um a falta de informação das famílias e também a possível falta de atualização de alguns cirurgiões-dentistas que ainda não repassam essa informação à população ainda que o público alvo também desconheça que a exposição frequente ao açúcar<sup>22</sup>, juntamente com o biofilme persistente na superfície dentária, sejam os principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença cárie. Além disso, existe um forte apelo industrial para o consumo de produtos açucarados (personagens infantis, cores e sabores) que chama atenção das crianças<sup>6</sup>.

Com relação ao responsável por indicar o uso de dentifício fluoretado, 33,3% dos pais responderam que teria sido indicação própria ou pelo costume de todos utilizarem e alguns pais não sabiam o motivo. Uma pergunta semelhante foi feita no estudo de Prietto et al. (2015)<sup>1</sup>, cujos critérios mais citados em relação à escolha do dentifício foram as imagens ou as ilustrações presentes na embalagem do creme dental. Quanto ao motivo para não utilizarem dentifício fluoretado nas crianças 85,0% dos pais responderam que achavam o fluoreto 'forte', outros achavam que não deveriam utilizar ou leram na embalagem que para crianças entre 0 e 2 anos a pasta de dente era sem flúor e alguns pais não sabiam o motivo. Essa alta porcentagem serve de alerta para que novas políticas de ampliação da informação atualizada sobre a recomendação do uso de fluoreto, bem como sua concentração para efeito anticariogênico; além disso, informações sobre as quantidades adequadas para cada idade com intuito de reduzir desenvolvimento de fluorose, noções de agentes etiológicos e aspectos clínicos das lesões de cárie devem ser revistas para melhor informar tanto cirurgiões-dentistas, como a população responsável pelos cuidados infantis.

Como limitações do estudo, podemos relatar o número reduzido de participantes (46), mesmo sendo uma amostra de conveniência, assim como falta de informações demográficas como idade dos pais e/ou responsáveis, grau de escolaridade materno e renda familiar, que são pontos intimamente relacionados aos fatores determinantes da cárie dentária.

Portanto, é necessário criar ações para melhorar a atitude dos pais frente à utilização dos dentifícios fluoretados para se obter o melhor efeito anticárie com reduzido risco ao desenvolvimento de fluorose, além de informações a respeito

da etiologia e controle da doença cárie.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, neste estudo transversal, foi possível concluir que, para a população estudada, a maioria

dos pais e/ou responsáveis utiliza dentifrício com fluoreto na escovação das crianças, mas desconhecem a quantidade desse íon presente no creme dental. Também possuem conhecimento a respeito da função do fluoreto e a quantidade de dentifrício que deve ser utilizada em cada faixa etária; porém, não se atentam ao risco de desenvolvimento de fluorose dentária.

## REFERÊNCIAS

- Prietto NR, Portela AR, Almeida LH, Possebon APR, Azevedo MS, Torriani DD. Atitudes e conhecimento dos pais quanto ao uso de dentifrícios fluoretados em crianças de um a 65 meses de idade. *RFO UPF*. 2015 Maio-Ago; 20(2):216-221.
- Ferreira JMS, Bezerra IF, Cruz RES, Vieira ITA, Menezes VA, Granville-Garcia AF. Prática de pais sobre a higiene bucal e dieta de pré-escolares da rede pública. *RGO - Rev Gaúcha Odonto*. 2011 Abr-Jun; 59(2): 265-270.
- Ministério da Saúde (BR). SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
- Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan; 20(1): CD007868. doi:10.1002/14651858.CD007868.pub2. PubMed PMID: 20091655.
- Bentley EM, Ellwood RP, Davies RM. Fluoride ingestion from toothpaste by young children. *Br Dent J*. 1999 May 8;186(9):460-2. PubMed PMID: 10365494.
- Lima NHL, Martins CC, Paiva SM. Apresentação comercial de dentifrícios convencionais e infantis presentes no mercado brasileiro. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2005 Maio-Ago; 5(2):141-9.
- Adair SM, Piscitelli WP, McKnight-Hanes C. Comparison of the use of a child and an adult dentifrice by a sample of preschool children. *Pediatr Dent*. 1997 Mar-Apr;19(2):99-103. PubMed PMID: 9106870.
- Oliveira MJ, Paiva SM, Martins LH, Ramos-Jorge ML, Lima YB, Cury JA. Fluoride intake by children at risk for the development of dental fluorosis: comparison of regular dentifrices and flavoured dentifrices for children. *Caries Res*. 2007;41(6):460-6. Epub 2007 Sep 7. PubMed PMID: 17823508.
- Prabhu A, Rao AP, Reddy V, Ahamed SS, Muhammad S, Thayumanavan S. Parental knowledge of pre-school child oral health. *J Community Health*. 2013 Oct; 38(5):880-4. doi: 10.1007/s10900-013-9693-x.
- Huebner CE, Thomas A, Scott J, Lin JY. Parents' interpretation of instructions to control the dose of fluoridated toothpaste used with young children. *Pediatr Dent*. 2013 May-Jun; 35(3): 262-6. PubMed PMID: 23756312.
- Bennadi D, Kshetrimayum N, Sibyl S, Reddy CV. Toothpaste Utilization Profiles among Preschool Children. *J Clin Diagn Res*. 2014 Mar; 8(3): 212-5. doi: 10.7860/JCDR/2014/7309.4165.
- Kusano SC, Tenuta LM, Cury AA, Cury JA. Timing of fluoride toothpaste use and enamel-dentin demineralization. *Braz Oral Res*. 2011 Sep-Oct; 25(5): 383-7. PubMed PMID: 22031049.
- Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Rational use of fluorides in caries prevention. A concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontol Scand*. 1981;39(4):241-9.
- Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res*. 2010; 24(Suppl 1): 9-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242010000500003>.
- Burt BA, Keels MA, Heller KE. The effects of a break in water fluoridation on the development of dental caries and fluorosis. *J Dent Res*. 2000 Feb; 79(2): 761-9. doi: 10.1177/00220345000790021001. PubMed PMID: 10728978.
- Hong L, Levy SM, Broffitt B, Warren JJ, Kanellis MJ, Wefel JS, Dawson DV. Timing of fluoride intake in relation to development of fluorosis on maxillary central incisors. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2006 Aug; 34(4):299-309. doi: 10.1111/j.1600-0528.2006.00281.x. PubMed PMID: 16856950.
- Cangussu MC, Narvai PC, Castellanos Fernandez R, Djehizian V. [Dental fluorosis in Brazil: a critical review]. *Cad Saude Publica*. 2002 Jan-Feb;18(1):7-15. Review. Portuguese. PubMed PMID: 11910420.
- Organização Mundial da Saúde. Levantamento epidemiológico básico da saúde bucal. 4. ed. São Paulo: Santos; 1999.
- Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. *Pediatr Dent*. 2017 Sep 15; 39(6):59-61. PubMed PMID:29179321.
- Wapniarska K, Buła K, Hilt A. Parent's pro-health awareness concerning oral health of their children in the light of survey research. *Przegl Epidemiol*. 2016; 70(1):59-63, 137-40.
- Massoni ACDLT, Paulo SFD, Forte FDS, Freitas CHSDM, Sampaio FC. Saúde bucal infantil: Conhecimento e interesse de pais e responsáveis. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2010 Maio-Ago; 10(2):257-264. doi: 10.4034/1519.05 01.2010.0102.0019.
- Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res*. 2015 Oct; 94(10): 1341-7. doi: 10.1177/0022034515590377.

### Como citar este artigo/How to cite this article:

Camatta IB, Steiner-Oliveira C. Avaliação do conhecimento das famílias sobre a higienização bucal e o uso domiciliar de fluoretos em crianças de uma faculdade particular do Espírito Santo. *J Health Biol Sci*. 2019 Abr-Jun; 7(2): 166-171.

# Avaliação clínica, radiográfica e tomográfica de fraturas radiculares: série de casos

## Clinical, radiographic and tomographic evaluation of root fractures: case series

Roberta Basañez Aleluia Costa<sup>1</sup> , Ivson Wasley Fernandes Coelho<sup>2</sup> , Fabíola Bastos de Carvalho<sup>3,4</sup> , Iêda Crusoé-Rebello<sup>4</sup> , Frederico Sampaio Neves<sup>4</sup> 

1. Mestranda em Odontologia e Saúde pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil. 2. Discente do curso de Odontologia pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil. 3. Docente do Curso de Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 4. Docente do curso de Odontologia pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

### Resumo

**Introdução:** o diagnóstico de fratura radicular é difícil, pois não há sinais/sintomas clínicos e características radiográficas patognomônicas, podendo ser confundido com um insucesso no tratamento endodôntico e até mesmo com doença periodontal. **Objetivo:** descrever as características clínicas, radiográficas e tomográficas em dentes com suspeita de fratura radicular. **Métodos:** a amostra foi composta por seis indivíduos cujos dados clínicos foram coletados, realizados testes de percussão vertical e horizontal, verificando se o dente apresentava mobilidade dentária e bolsa periodontal. Achados radiográficos e tomográficos foram avaliados em relação à presença de fratura radicular e de lesão periapical e/ou perda óssea associada ao terço apical/lateral da raiz para se obter o diagnóstico complementar da fratura radicular. **Resultados:** os achados clínicos mais prevalentes foram percussões vertical e horizontal positivos seguidos de dor e mobilidade. Os exames por imagem evidenciaram que todos os casos de suspeita de fratura radicular estavam relacionados a dentes com pino metálico. Em apenas um caso, não foi possível visualizar a lesão periapical e/ou perda óssea e a fratura na radiografia periapical, sendo detectadas nas imagens tomográficas. **Conclusões:** os achados clínicos de suspeita de fraturas radiculares são muito variáveis, necessitando correlacioná-los com exames de imagem. A TCFC se mostrou mais eficaz que a radiografia periapical na detecção da linha de fratura, porém esses dois exames podem ser utilizados para complementar o exame clínico e alcançar um diagnóstico mais acurado.

**Palavras-chave:** Tomografia computadorizada de feixe cônico. Endodontia. Fratura radicular. Radiografia dentária.

### Abstract

**Introduction:** the diagnosis of dental fracture is usually difficult because there are no pathognomonic clinical signs/symptoms and radiographic characteristics, and may be mistaken for failure of endodontic treatment and even periodontal disease. **Purpose:** to describe clinical, radiographic and tomographic characteristics in teeth with suspected root fracture. **Methods:** the sample consisted of 06 individuals and their clinical data were collected. Vertical and horizontal percussion tests were performed, verifying tooth mobility and periodontal pocket. In relation to radiographic and tomographic findings, the presence of root fracture and periapical lesion and/or bone loss associated with the apical/lateral third of the root were evaluated in order to obtain the diagnosis of root fracture. **Results:** the most prevalent clinical findings were positive vertical and horizontal percussions followed by pain and mobility. Imaging tests showed that all cases of suspected root fracture were related to teeth with metallic post. In only one case, it was not possible to visualize the periapical lesion and/or bone loss and fracture in the periapical radiography, being detected in tomographic images. It's possible to conclude with the analysis of some clinical cases that cone-beam computed tomography favors accuracy and precision regarding the visualization, location and extension of root fracture, as well as periapical alterations. **Conclusions:** the clinical findings of suspected root fractures are very variable, requiring to correlate them with imaging exams. The CBCT was more effective than the periapical radiography in the detection of the fracture line, but these two exams can be used to complement the clinical examination and reach a more accurate diagnosis.

**Key words:** Cone-beam computed tomography. Endodontics. Root fracture. Dental radiograph.

### INTRODUÇÃO

A avaliação de fraturas radiculares é um desafio para o cirurgião-dentista quanto à sua detecção precoce e conduta terapêutica. O diagnóstico, geralmente, torna-se difícil, pois não há sinais, sintomas e características radiográficas exatas, podendo ser confundido com um insucesso no tratamento endodôntico e até mesmo com uma doença periodontal<sup>1-4</sup>.

A suspeita acerca da presença da fratura radicular é obtida quando há a combinação dos sinais e sintomas clínicos, em que os mais evidentes são história de desconforto associado à

infecção crônica, dor à mastigação, edema, fístula, presença de bolsa periodontal profunda e estreita, além de dor à percussão e/ou à palpação. Radiograficamente, alguns sinais como espessamento da lâmina dura e uma área radiolúcida periapical e/ou lateral à raiz podem sugerir um diagnóstico de fratura radicular<sup>1,2,5-7</sup>.

O diagnóstico das fraturas radiculares exige um acurado método de localização para determinar sua extensão e, assim, as possibilidades terapêuticas. Na realização do diagnóstico,

**Correspondente:** Frederico Sampaio Neves. Universidade Federal da Bahia (UFBA), Canela, Salvador - BA, CEP: 40.170-115, Brasil, email: fredsampai@yahoo.com.br

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 15 Set 2018; Revisado em: 4 Jan 2019; 23 Jan 2019; Aceito em: 28 Jan 2019

devem estar incluídos uma avaliação completa do histórico do caso, um exame clínico, assim como uma avaliação da estrutura dentária e óssea. Para tanto, faz-se necessário o apoio de uma técnica radiográfica adequada, já que, muitas vezes, devido à inclinação da fratura ou ao deslocamento dos fragmentos, a sua localização é identificada depois de repetidas incidências radiográficas<sup>1-4</sup>.

A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) está sendo cada vez mais indicada para localização de fratura radicular, pois confere uma imagem tridimensional de alta resolução, possibilitando a visualização das linhas de fratura não detectadas na radiografia periapical<sup>8</sup>.

Devido à dificuldade de chegar a um diagnóstico clínico e radiográfico preciso das fraturas radiculares, o objetivo do presente estudo foi descrever as características clínicas, radiográficas e tomográficas em dentes com suspeita de fratura radicular.

## MÉTODOS

O presente estudo foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FO/UFBA). Todos os indivíduos participantes assinaram, previamente, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A amostra foi composta por seis pacientes atendidos no Serviço de Endodontia da FO/UFBA, no período compreendido entre fevereiro de 2017 e janeiro de 2018, que apresentaram suspeita clínica de fratura radicular. Foram incluídos, no estudo, indivíduos maiores de 18 anos; rizogênese completa e dentes com tratamento endodôntico e/ou pino intrarradicular.

Durante a anamnese, foram coletados os dados referentes à presença/ausência de dor (ao frio e ao quente), supuração, gosto ruim na boca e sangramento gengival. O exame clínico foi realizado seguindo o protocolo de atendimento da Disciplina de Endodontia da FO/UFBA, iniciando-se pela inspeção intrabucal

dos tecidos moles à procura de sinais como fístula (na sua presença era realizado o rastreamento, inserindo-se o cone de guta percha no trajeto fistuloso e, em seguida, realizando-se uma radiografia periapical) e sangramento gengival, seguindo-se da inspeção do dente. Na avaliação dentária, foram realizados os testes de percussão vertical e horizontal (cuja sensibilidade positiva seria sugestiva de processo inflamatório/infeccioso na região periapical e no periodonto lateral respectivamente), de mobilidade dentária e sondagem periodontal à procura de bolsa estreita.

Os exames radiográficos foram realizados no aparelho radiográfico de alta frequência Gendex 765DC (Gendex Dental Systems, Dentsply\_International, IL, USA), operando com 65kV, 7mA e tempo de exposição de 0,25 segundos. O sistema digital intrabucal em que a imagem obtida foi o aparelho VistaScan (Dürr Dental, Beitigheim-Bissingen, Alemanha).

As imagens tomográficas foram adquiridas no aparelho Kodak K9000 (Kodak Dental Systems, Carestream Health, Rochester, NY, USA), com protocolo de aquisição de imagens de 74kV, 10mA, tempo de aquisição de 14 segundos e FOV de 50x38mm. As imagens radiográficas e tomográficas foram avaliadas por um radiologista maxilofacial com experiência em TCFC, sem o conhecimento prévio da sintomatologia clínica dos indivíduos, e por meio de suas avaliações, foi determinada a presença ou a ausência de fratura radicular. Nas imagens tomográficas, caso houvesse uma expressiva formação de artefatos devido à presença do material intracanal (artefatos de endurecimento do feixe) que degradassem significativamente a imagem, o diagnóstico incerto poderia ser aplicado.

## RESULTADOS

Na tabela 1, estão sumarizados os dados referentes aos achados clínicos. Nota-se que, em todos os casos, os testes de percussão vertical e horizontal foram positivos, e que dor e mobilidade estiveram presentes em 66% dos casos. Apenas o caso 01 apresentou fístula e secreção purulenta. Em relação à bolsa periodontal, dois casos (1 e 3) apresentaram profundidade de sondagem maior que 03mm.

**Tabela 1.** Características clínicas dos dentes com suspeita de fratura radicular.

Paciente	Coroa protética	Edema	Fistula	Secreção purulenta	Dor	Bolsa estreita	Percussão vertical +	Percussão horizontal+	Mobilidade	Restauração	Palpação apical +
1	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
2	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
3	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
4	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não
5	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não
6	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim

Na tabela 2, estão sumarizados os dados referentes aos achados radiográficos e tomográficos. Pode-se observar que, apenas no caso quatro, o diagnóstico de fratura radicular (horizontal e por vestibular) e de lesão periapical e/ou perda óssea foi obtido apenas na TCFC, não sendo detectados na radiografia periapical. Em nenhum caso, foi constatado o diagnóstico de

fratura, lesão periapical e/ou perda óssea apenas na radiografia periapical. Nota-se também que todos os casos com fratura radicular foram associados a dentes que apresentavam pino metálico, sendo, em sua totalidade, diagnosticados por meio da TCFC.

**Tabela 2.** Características radiográficas e tomográficas dos dentes com suspeita de fratura radicular.

Paciente	Fratura na TCFC	Fratura na radiografia periapical	Material intracanal	Tipo de fratura	Lesão periapical e/ou perda óssea na radiografia periapical	Lesão periapical e/ou perda óssea na TCFC
1	Sim	Sim	PINO METÁLICO	VERTICAL	Sim	Sim
2	Não	Não	GUTA PERCHA	AUSÊNCIA	Sim	Sim
3	Sim	Sim	PINO METÁLICO	VERTICAL	Sim	Sim
4	Sim	Não	PINO METÁLICO	HORIZONTAL	Não	Sim
5	Não	Não	PINO METÁLICO	AUSÊNCIA	Sim	Sim
6	Não	Não	GUTA PERCHA	AUSÊNCIA	Não	Não

## DISCUSSÃO

Ainda existe uma grande dificuldade de se estabelecer o diagnóstico precoce das fraturas radiculares, e grande parte dessa dificuldade parece estar relacionada com o pouco valor dado ao exame clínico<sup>1,3-4,9</sup>. No presente estudo, foi utilizado um protocolo estabelecido pela Disciplina de Endodontia da FO/UFBA, em que se avaliaram, criteriosamente, os dentes e os tecidos circunjacentes. Diante dos casos 01, 03 e 04, que apresentaram fratura radicular, observou-se que os sinais clínicos mais prevalentes foram dor, presença de coroa protética, testes de percussão vertical e horizontal positivos e mobilidade.

Segundo a literatura, alguns aspectos clínicos, como dor durante a mastigação, abcesso gengival com períodos de exacerbação e remissão, bolsa periodontal, fistula, mobilidade dental, sensibilidade à percussão e palpação, sensibilidade térmica (em dentes com vitalidade pulpar) podem auxiliar no diagnóstico diferencial<sup>3-4,9,10-11</sup>. Os sinais clínicos são variáveis, mas, na maioria das vezes, o paciente, com fratura vertical, apresenta dor moderada a suave por um longo período e sensibilidade à mastigação. É também comum em dentes com fraturas verticais, o desenvolvimento de bolsas periodontais isoladas, profundas e estreitas, geralmente adjacentes à linha de fratura. Um dente com fratura radicular vertical possui sinais e sintomas típicos de lesão periapical e/ periodontal, dificultando o diagnóstico. No presente estudo, as percussões vertical e horizontal positivas foram detectadas em 100% dos casos, seguidas de mobilidade e dor, que foram sinais encontrados em 66% dos casos.

O diagnóstico de fratura radicular através da radiografia periapical, apesar de ser o exame por imagem mais utilizada pelos dentistas, é bastante limitado porque a projeção é influenciada por dois fatores: direção do feixe central dos raios X em relação ao plano da fratura e a inclinação do plano de fratura em relação ao receptor de imagem. Nos casos de fraturas horizontais, a sua visualização é mais fácil pelo fato do feixe de raio-X e a linha de fratura serem perpendiculares ao longo eixo do dente, o que permite uma maior definição da linha da fratura, facilitando o seu diagnóstico. Já nos casos de fraturas oblíquas e verticais, torna-se difícil a coincidência do feixe de raios X com o plano de fratura, formando, na maioria das vezes, um ângulo entre eles, o que diminui a nitidez da imagem<sup>1,3,4,9,12-13</sup>. Entretanto, no caso 04, a fratura radicular horizontal não pôde ser visualizada

na radiografia periapical. Isso se deve ao fato de a incidência do feixe de raios X ser oblíqua em relação à fratura (foi realizada uma radiografia periapical pela técnica da bisettriz e em apenas uma incidência) e devido à sobreposição da linha de fratura (que estava por vestibular) com o pino metálico intracanal (que possui alta radiopacidade), o que terminou mascarando o seu diagnóstico.

Em relação à utilização da TCFC, segundo as diretrizes do SEDENTEXCT (2012), é apenas indicada em casos de suspeita de fratura radicular quando a radiografia intrabucal não fornecer adequada informação para o plano de tratamento<sup>14</sup>. Alguns estudos<sup>9,15-26</sup> compararam a radiografia periapical e a TCFC no diagnóstico de fratura radicular, evidenciando uma melhor acurácia de diagnóstico em comparação ao exame bidimensional. No presente estudo, observou-se que, apenas no caso 04, a visualização da linha de fratura só foi possível através da TCFC, não sendo detectada na radiografia periapical.

Entretanto, como desvantagem a TCFC apresenta uma dose maior de radiação em comparação à radiografia, além da produção de artefatos de endurecimento do feixe (beam hardening artifacts), sendo uma limitação inerente à técnica. Isso ocorre quando um material de alta densidade está presente no volume escaneado, como restaurações metálicas, guta-percha e pinos metálicos (altamente associados à fraturas radiculares), produzindo assim uma redução da qualidade geral da imagem, podendo dificultar ou impossibilitar a visualização de estruturas anatômicas e o diagnóstico tomográfico<sup>1-4,9,12,27-29</sup>. De modo geral, artefatos são induzidos por discrepâncias entre as reais condições físicas e a formatação matemática utilizada para fazer a reconstrução em três dimensões<sup>12</sup>. Os artefatos, nas imagens de TCFC surgem da natureza policromática inerente à projeção do feixe de raios X, que resultam no que é conhecido como endurecimento do feixe, que significa o aumento da energia média do feixe devido à absorção dos fótons de baixa energia. Isto resulta na formação de dois tipos de artefatos: distorção de estruturas metálicas devido à absorção diferencial (cupping artifacts) e estrias e bandas hipodensas entre dois objetos de alta radiodensidade (streaking artifacts)<sup>30</sup>.

Sabe-se que, devido ao seu alto módulo de elasticidade, o pino metálico concentra estresse na raiz e promove uma alta

incidência de fraturas radiculares<sup>31</sup>. Isso foi corroborado no presente estudo, em que todos os casos com fratura radicular foram associados a dentes que apresentavam pino metálico. Mesmo na presença do pino metálico, que poderia dificultar a visualização da linha de fratura, todos os casos de fraturas radiculares foram visualizados na TCFC. Entretanto, o diagnóstico deve ser realizado com cautela, havendo a grande necessidade de considerar os sinais e sintomas para a confirmação diagnóstica<sup>1,9</sup>. É de extrema importância que dados clínicos em casos de suspeita de fraturas radiculares sejam fornecidos pelo clínico ao radiologista, pois auxilia sobremaneira no diagnóstico do caso.

## CONCLUSÃO

Diante da análise da série de casos com suspeita de fratura

radicular, pode-se concluir que os achados clínicos são muito variáveis, necessitando correlacioná-los com os exames de imagem (2D e/ou 3D). A TCFC se mostrou mais eficaz que a radiografia periapical na detecção da linha de fratura, porém esses dois exames devem ser complementares ao exame clínico, para assim se alcançar um diagnóstico mais acurado.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

## REFERÊNCIAS

- Andrade PBV, Barbosa GLR, Neves FS. A tomografia computadorizada de feixe cônico no diagnóstico de fraturas radiculares. *Revista ABRO* 2012 Jul-Dez; 13(2):43-54.
- Neves FS. Influência dos tipos de escaneamento da tomografia computadorizada de feixe cônico e do material intracanal no diagnóstico de fratura radicular vertical [tese]. Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2013.
- Chavda R, Mannocci F, Andiappan M, Patel S. Comparing the In Vivo Diagnostic Accuracy of Digital Periapical Radiography with Cone-beam Computed Tomography for the Detection of Vertical Root Fracture. *J Endod*. 2014 Oct; 40(10): 1524–1529. doi: 10.1016/j.joen.2014.05.011.
- Ozer SY, Unlu G, Deger Y. Diagnosis and Treatment of Endodontically Treated Teeth with Vertical Root Fracture: three Case Reports with two-year follow-up. *J Endod*. 2011 Jan; 37(1): 97–102. doi: 10.1016/j.joen.2010.09.002.
- Moule AJ, Kahler B. Diagnosis and management of teeth with vertical root fractures. *Aust Dent J*. 1999 Jun; 44(2):75-87.
- Edlund M, Nair MK, Nair UP. Detection of vertical root fractures by using cone-beam computed tomography: a clinical study. *J Endod*. 2011 Jun; 37(6):768-72. doi: 10.1016/j.joen.2011.02.034.
- Metska ME, Aartman IHA, Wesselink PR, Ozok AR. Detection of vertical root fractures in vivo in endodontically treated teeth by cone-beam computed tomography scans. *J Endod*. 2012 Oct; 38(10): 1344–1347. doi: 10.1016/j.joen.2012.05.003.
- Mansini R, Akabane CE, Fukunaga D, Baratella T, Turbino ML, Camargo SCC. Utilização da tomografia computadorizada no diagnóstico de fraturas radiculares verticais. *Rev Gaúcha Odontol*. 2010 Abr-Jun; 58(2):185-90.
- Bernardes RA, Moraes IG, Duarte MAH, Azevedo BC, Azevedo JR, Bramante CM. Use of cone-beam volumetric tomography in the diagnosis of root fractures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Aug; 108(2): 270-277. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.01.017.
- Tang L, Zhou XD, Wang Y, Zhang L, Zheng QH, Huang DM. Detection of vertical root fracture using cone beam computed tomography: report of two cases. *Dent Traumatol*. 2011 Dec; 27(6): 484-8. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01030.x.
- Kajan ZD, Taromsari M. Value of cone beam CT in detection of dental root fractures. *Dentomaxillofac Radiol*. 2012 Jan; 41(1): 3–10. doi: 10.1259/dmfr/25194588.
- Schulze R, Heil U, Gross D, Bruellmann DD, Dranischnikow E, Schwanecke U, Schoemer E. Artefacts in CBCT: a review. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011 Jul; 40(5): 265-73. doi: 10.1259/dmfr/30642039.
- Neves FS, Barbosa JP, Crusoé-Rebello I. Utilização da tomografia computadorizada de feixe cônico na endodontia. *ClipeOdonto* 2013; 5(1):58-64.
- SEDENTEXT guidelines. Safety and Efficacy of a New and Emerging Dental X-ray Modality. Radiation protection no. 172: cone beam CT for dental and maxillofacial radiology (evidence-based guidelines). 2012 [cited 2018 10 10]. Available at: [http://www.sedentext.eu/files/radiation\\_protection\\_172.pdf](http://www.sedentext.eu/files/radiation_protection_172.pdf).
- Bornstein MM, Wölner-Hanssen AB, Sendi P, von Arx T. Comparison of intraoral radiography and limited cone beam computed tomography for the assessment of root-fractured permanent teeth. *Dent Traumatol*. 2009 Dec; 25(6): 571-7. doi: 10.1111/j.1600-9657.2009.00833.x.
- Likubo M, Kobayashi K, Mishima A, Shimoda S, Daimaruya T, Igarashi C, et al. Accuracy of intraoral radiography, multidetector helical CT, and limited cone-beam CT for the detection of horizontal tooth root fracture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Nov; 108(5): e70-74. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.07.009.
- Hassan B, Metska ME, Ozok AR, van der Stelt P, Wesselink PR. Detection of vertical root fractures in endodontically treated teeth by a cone beam computed tomography scan. *J Endod*. 2009 May; 35(5): 719-22. doi: 10.1016/j.joen.2009.01.022.
- Wenzel A, Haiter-Neto F, Frydenberg M, Kirkevang LL. Variable-resolution cone-beam computerized tomography with enhancement filtration compared with intraoral photostimulable phosphor radiography in detection of transverse root fractures in an in vitro model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Dec; 108(6):939-45. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.07.041.
- Kamburoğlu K, Murat S, Yüksel SP, Cebeci AR, Horasan S. Detection of vertical root fracture using cone-beam computerized tomography: an in vitro assessment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Feb; 109(2):74-81. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.09.005.
- Özer SY. Detection of vertical root fractures of different thicknesses in endodontically enlarged teeth by cone beam computed tomography versus digital radiography. *J Endod*. 2010 Jul; 36(7): 1245-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.021.
- Varshosaz M, Tavakoli MA, Mostafavi M, Baghban AA. Comparison of conventional radiography with cone beam computed tomography for detection of vertical root fractures: an in vitro study. *J Oral Sci*. 2010 Dec; 52(4): 593-7.
- Wang P, Yan XB, Lui DG, Zhang WL, Zhang Y, Ma XC. Detection of dental root

- fractures by using cone-beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2011 Jul; 40(5):290-8. doi: 10.1259/dmfr/84907460.
23. Gunduz K, Avsever H, Orhan K, Çelenk P, Ozmen B, Cicek E, Egrioglu E, Karaçaylı Ü. Comparison of intraoral radiography and cone-beam computed tomography for the detection of vertical root fractures: an in vitro study. *Oral Radiol.* 2013 Jan; 29(1): 6-12.
24. Khedmat S, Rouhi N, Drage N, Shokouhinejad N, Nekoofar MH. Evaluation of three imaging techniques for the detection of vertical root fractures in the absence and presence of gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2012; 45(11):1004-9. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02062.x.
25. Patel S, Brady E, Wilson R, Brown J, Mannocci F. The detection of vertical root fractures in root filled teeth with periapical radiographs and CBCT scans. *Int Endod J.* 2013 Dec; 46(12):1140-52. doi: 10.1111/iej.12109.
26. Silveira PF, Vizzotto MB, Liedke GS, da Silveira HL, Montagner F, da Silveira HE. Detection of vertical root fractures by conventional radiographic examination and cone beam computed tomography - an in vitro analysis. *Dent Traumatol.* 2013 Feb; 29(1):41-6. doi: 10.1111/j.1600-9657.2012.01126.x.
27. Vidigal BCL, Abreu SG, Silva FA, Moreira GP, Manzi FR. Uso da tomografia Cone Beam na avaliação de fraturas radiculares. *Rev. bras. odontol.* 2014 Jul-Dez; 71(2):152-5.
28. Pulcino MM, Popolim IN, Picoli F. Uso de tomografia computadorizada no diagnóstico de fraturas radiculares. *Investigação.* 2016; 15(1):110-13.
29. Garib DG, Raymundo R Jr., Raymundo MV, Raymundo DV, Ferreira SN. Tomografia computadorizada de feixe cônico Cone beam): entendendo este novo método de diagnóstico por imagem com promissora aplicabilidade na Ortodontia. *Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2007 Mar-Abr; 12(2):139-56. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-54192007000200018>.
30. Scarfe WC, Farman AG. What is cone-beam CT and how does it work? *Dent Clin North Am.* 2008 Oct; 52(4):707-30. doi: 10.1016/j.cden.2008.05.005.
31. Zhou L, Wang Q. Comparison of fracture resistance between cast posts and fiber posts: a meta-analysis of literature. *J Endod.* 2013 Jan; 39(1):11-5. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.026.

**Como citar este artigo/How to cite this article:**

Costa RBA, Coelho IWF, Carvalho FB, Crusoé-Rebello I, Neves FSN. Avaliação clínica, radiográfica e tomográfica de fraturas radiculares: série de casos. *J Health Biol Sci.* 2019 Abr-Jun; 7(2): 172-176.

# Eficácia de diferentes processos de desinfecção em turbinas de alta rotação

## Effectiveness of different disinfection processes in high speed turbines

Igor Alcântara<sup>1</sup> , Renato Daniel de Freitas<sup>1</sup> , Ludimila Gomes Pinheiro<sup>2</sup> , Andrine Tavares Pereira Felipe<sup>3</sup> , Pedro Diniz Rebouças<sup>4</sup> , Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santo 

1. Discente do curso de Odontologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, CE, Brasil. 2. Engenheira de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 3. Enfeira graduada pela Universidade Vale do Acaraú (UVA), Fortaleza, CE, Brasil. 4. Pós-graduando em Odontologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 5. Docente do curso de Odontologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Sobral, CE, Brasil.

### Resumo

**Introdução:** a contaminação cruzada pode ocorrer na prática odontológica, e a correta descontaminação das Turbinas de Alta Rotação (TAR) é um passo importante no controle desse tipo de infecção. **Objetivo:** determinar o protocolo de uso do detergente enzimático na limpeza das TARs que promova a maior redução microbiana da superfície do instrumento no menor tempo. **Métodos:** este estudo contou com uma amostra de 21 turbinas de alta rotação (n=3). O experimento foi dividido em cinco fases sequenciais: contaminação inicial, limpeza das turbinas, contagem microbiológica inicial, esterilização das turbinas e contagem microbiológica final. As amostras foram divididas em seis grupos: grupo (1): as turbinas foram envolvidas por 8 minutos em gaze embebida em detergente enzimático seguida por fricção mecânica; grupo (2): de forma semelhante ao grupo (1) pelo tempo de 4 minutos. No grupo (3), as turbinas foram, imediatamente, friccionadas com gaze embebida em detergente enzimático seguida de 8 minutos de espera, nos grupos (4) e (5), de forma semelhante ao grupo (3), pelo tempo de 4 minutos e zero minuto, respectivamente. No grupo (6), (controle negativo) não houve contaminação das TARs, e foram aguardados 8 minutos sem realização de nenhum protocolo de descontaminação, enquanto no grupo (7) (controle positivo), houve contaminação pelo pool salivar, mas nenhum protocolo de descontaminação foi realizado. **Resultados:** após segunda coleta, apenas o grupo (2) foi estatisticamente significante, mostrando-se como melhor protocolo de descontaminação das TARs. **Conclusões:** dessa forma, sugerimos a utilização de gaze embebida em detergente enzimático por 4 minutos, seguida de fricção mecânica com a gaze previamente ao procedimento de esterilização física por calor sob pressão, como protocolo de biossegurança.

**Palavras-chave:** Esterilização. Odontólogos. Bactérias.

### Abstract

**Introduction:** cross contamination can occur the dental practice and the correct decontamination of high-speed turbines (HST) is an important step in the control of this type of infection. **Objective:** to determine the protocol of use of the enzymatic detergent in the cleaning of the TARs that promotes a greater microbial reduction of the surface of the instrument in the shortest time. **Methods:** This study had a sample of 21 high-speed turbines (n=3). The experiment was divided into 5 sequential phases (initial contamination, turbine cleaning, initial microbiological counting, turbine sterilization and final microbiological counting). The samples were divided into six groups: group (1) the turbines were wrapped for 8 minutes in gauze soaked in enzymatic detergent followed by mechanical friction, group (2) in a similar way to group (1) in the time of 4 minutes. In group (3) the turbines were immediately frictioned with gauze soaked in enzymatic detergent followed by 8 minutes of waiting, in groups (4) and (5) similarly to group (3) for the time of 4 minutes and zero minutes, respectively. In group (6) (negative control) there was no contamination of the HST and 8 minutes were awaited without any decontamination protocol, whereas in the group (7) (positive control) there was contamination by the salivary pool, but no decontamination protocol was performed. **Results:** After second collection, only group (2) was statistically significant, showing itself as the best decontamination protocol for HST. **Conclusions:** we suggest the use of gauze soaked in enzymatic detergent for 4 minutes followed by mechanical friction with the gauze prior to the procedure of physical sterilization by heat under pressure as a biosafety protocol.

**Key words:** Sterilization. Dentists. Bacteria.

### INTRODUÇÃO

A prática odontológica apresenta uma série de peculiaridades que constituem fator de risco para a ocorrência de contaminação cruzada, seja entre pacientes, seja entre paciente e equipe de saúde bucal. Entre esses fatores, pode-se citar o contato direto dos instrumentos e profissionais com fluidos corporais, como saliva e sangue; a formação de aerossóis durante a utilização da turbina de alta rotação ou da seringa tríplice e também devido ao fato de muitos instrumentos serem pontiagudos e perfuro cortantes<sup>1</sup>.

Inegavelmente, os instrumentos odontológicos são potenciais

fontes de contaminação e disseminação microbiana entre pacientes, ao albergar e carrear um universo de microrganismos, o que justifica o gerenciamento seguro em seu processamento<sup>1, 2, 3, 4</sup>. Esse processamento deve ser realizado a fim de eliminar todas as formas de vida microbiana da superfície dos instrumentos, tornando-os seguros para serem utilizados nos pacientes, sem, no entanto, danificar os instrumentos<sup>1</sup>.

Entretanto, segundo Pinto, 2013 uma lacuna nos conhecimentos atuais em controle de infecção cruzada na prática odontológica relacionada a produtos refere-se à discussão de métodos e

**Correspondente:** Iriana Carla Junqueira Zanin dos Santos. Endereço: Rua Conselheiro José Júlio, s/n – Centro, Sobral, Ceará. E-mail: irianazanin@gmail.com

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido 24 Jan 2019; Revisado: 11 Fev 2019; 12 Mar 2019; Aceito: 16 Mar 2019

técnicas para a descontaminação das Turbinas de Alta Rotação (TAR)<sup>5</sup>. Esses equipamentos consistem em produtos de alto custo que possuem sistemas de rolamento interno. Esses fatores contribuem para que o processo de descontaminação das TARs seja, ainda, um desafio, uma vez que deve associar-se à segurança da descontaminação e à manutenção da integridade física do equipamento.

As TARs são utilizadas em diversos tipos de procedimentos na prática odontológica, que apresentam diversos graus de complexidade e de contato com material contaminante, como preparo de cavidades para restaurações, acesso coronário, osteotomias e odontoseções. Pelos diversos procedimentos e de acordo com o objetivo de seu uso, a TAR é classificada como um material crítico ou semicrítico<sup>5</sup>.

Dentro da classificação de risco em causar infecção, a recomendação oficial pelas sociedades científicas para descontaminação segura da TAR consiste na limpeza prévia com água, detergente e fricção mecânica, e posterior esterilização por autoclavagem<sup>6,7</sup>. A realização da limpeza prévia é um quesito primordial para a obtenção de uma completa esterilização do instrumental, uma vez que o vapor sob pressão só é capaz de esterilizar superfícies, não sendo capaz de penetrar no interior de sujidades. Sendo assim, a limpeza deve ser realizada minuciosamente, garantindo a remoção da sujidade e contribuindo para a redução da contaminação microbiana<sup>7</sup>.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é determinar o protocolo de uso do detergente enzimático na limpeza das TARs que promova a maior redução microbiana da superfície do instrumento no menor tempo.

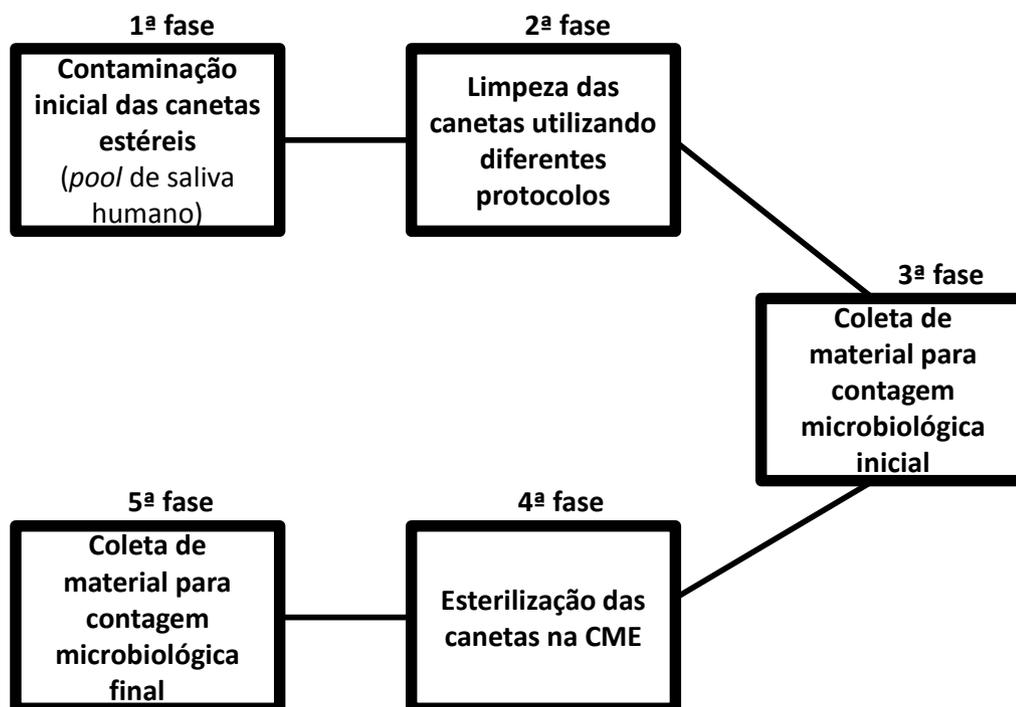
## MÉTODOS

Este estudo contou com uma amostra de 30 turbinas de alta rotação (n = 5 por grupo). Todas as canetas utilizadas foram, previamente, processadas na Central de Material Esterilizado (CME) do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral e entraram no experimento esterilizadas por método físico de vapor sob pressão em autoclave, seguindo todas as normativas de biossegurança da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA<sup>8</sup>.

Para assegurar o mesmo nível de contaminação microbiana das amostras, um pool de saliva humana foi utilizado para contaminar todas as canetas de maneira idêntica. Para tanto, 20 ml de saliva humana foram coletados de três voluntários saudáveis, em jejum e com supressão de higiene oral por 12h, totalizando um volume de 60 ml de saliva coletada. Para a coleta, o fluxo salivar foi estimulado com a mastigação de um filme plástico (Parafilm M® Pechiney Plastic Packaging, Akron, Ohio, EUA), a saliva produzida durante o primeiro minuto foi deglutida para, então, ser coletada em tubos tipo Falcon de 50 ml estéreis até o volume individual de 20 ml. A seguir, as salivas dos três voluntários foram misturadas para formar um pool de saliva humana. A essa amostra foram adicionados 60 ml de tampão de adsorção (KCl 50 mM, KPO4 1,0 mM, CaCl2 2H2O 1,0 mM, MgCl2 6H2O 0,1mM, pH = 6,5) para assegurar a sua preservação, e o material foi mantido em gelo até o momento da contaminação das canetas.

O experimento foi dividido em 5 fases sequenciais conforme descrito abaixo

Figura 1. Fases sequencias do experimento



### Contaminação inicial das canetas estéreis com pool de saliva humana

Sobre um campo estéril em câmara de fluxo laminar (TROX® TECHNIK, série 2030, Curitiba, Brasil), o operador realizou a abertura do pacote de papel grau cirúrgico estéril vindo da CME de maneira asséptica para prevenir contaminação da amostra. Sempre que havia a necessidade de repousar a amostra sobre a bancada, ela era mantida sobre a face interna do lado plástico do papel grau cirúrgico.

A contaminação foi limitada à metade superior da turbina, sendo delimitada pelo código de impressão existente na turbina de alta rotação, ficando a parte inferior para que o operador realizasse a sua apreensão. Para a realização da contaminação, a TAR foi dividida em cinco partes, sendo quatro localizadas representativas de cada uma das quatro faces da turbina, e a quinta parte representada pela cabeça da turbina. Para a contaminação das amostras, o swab estéril (ABSORVE®, Jlangsu Rongye Technology, China) foi emergido uma única vez no pool de saliva humana, retirado e friccionado com quatro movimentos repetitivos em cada uma das cinco partes da caneta, a fim de garantir a contaminação uniforme da amostra. Após realização da contaminação de todas as faces, o swab foi descartado, e a amostra passou para a fase de limpeza das turbinas de alta rotação, seguindo diferentes protocolos de desinfecção.

### Limpeza das canetas utilizando diferentes protocolos

A amostra foi dividida, igualmente, em seis grupos com cinco turbinas de alta rotação em cada um deles (n=5). Cada grupo representou uma técnica de limpeza das turbinas, utilizando solução de detergente enzimático (PODEROSO DETERGENTE MULTIENZIMÁTICO®, Kelldrin, Anápolis, Goiás) empregado em tempo e condições distintas, sendo eles:

GRUPO 1 (8min EM): turbina envolvida em gaze embebida em detergente enzimático por 8 minutos, seguida por fricção mecânica com a gaze.

GRUPO 2 (4min EM): turbina envolvida em gaze embebida em detergente enzimático por 4 minutos, seguida por fricção mecânica com a gaze.

GRUPO 3 (8min ES): turbina imediatamente friccionada com gaze embebida em detergente enzimático seguida de 8 minutos de espera sem a gaze.

GRUPO 4 (4min ES): turbina imediatamente friccionada com gaze embebida em detergente enzimático seguida de 4 minutos de espera sem a gaze.

GRUPO 5 (0min ES): turbina foi imediatamente friccionada com gaze embebida em detergente enzimático sem nenhum tempo de espera.

GRUPO 6 (CN): controle negativo - turbina não foi contaminada, aguardaram-se 8 minutos na bancada, sem que nenhum protocolo de descontaminação fosse realizado e, então, foi realizado enxague com água.

GRUPO 7 (CP): controle positivo - turbina foi contaminada pelo

pool salivar aguardaram-se 8 minutos na bancada, sem que nenhum protocolo de descontaminação fosse realizado.

Após a limpeza das turbinas de alta rotação, utilizando os diferentes protocolos de descontaminação descritos, as turbinas foram repassadas para outro operador treinado, o qual realizou sua lavagem. Para isso, uma gaze estéril foi embebida em água e friccionada pelo corpo da turbina, assegurando a remoção de todo o detergente enzimático, conforme protocolo de enxágue descrito pelo fabricante. Vale destacar que os operadores apreenderam a caneta apenas pela extremidade inferior, para evitar a contaminação da parte da turbina em estudo.

### Coleta de material para contagem microbiológica inicial

Após o enxágue, a amostra retornou para o fluxo laminar em que a coleta para análise microbiológica foi realizada. Para tanto, microtubos para centrifuga estéreis foram previamente preparados e identificados para cada amostra correspondente ao puro e às diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. O tubo correspondente ao puro continha 1 ml de solução de NaCl 0,89% estéril, e os demais continham 900 µl da mesma solução a fim de permitir a realização das diluições seriadas. Dessa forma, um novo swab estéril foi emergido uma única vez no tubo puro, contendo NaCl 0,89%, retirado e friccionado com quatro movimentos repetitivos em cada uma das cinco partes da caneta a fim de garantir a coleta uniforme da amostra. Ao final da coleta, o swab foi seccionado próximo à sua extremidade, dentro do microtubo identificado como puro. Realizou-se a agitação em vortex (VORTEX MIXER®, Velp Científica, Usmate, Itália) por 10 segundos seguidos da diluição seriada. O plaqueamento foi realizado em triplicada, em placas de petri, contendo 60ml de meio de cultura de BHI Ágar – Brain Heart Infusion Ágar (Kasvi®, Itália). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48h. Em seguida, o número de unidades formadoras de colônia por ml de amostra (UFC/ml) foi estabelecido.

### Esterilização das canetas na CME

Após a coleta ter sido realizada em toda a superfície estudada da caneta, elas foram secas com gaze estéril e foram reembaladas em papel grau cirúrgico identificado com o grupo do estudo ao qual pertenciam e foram esterilizados em autoclave (PHOENIX® LUFERCO, Araraquara, Brasil) a 121°C por 15 minutos, segundo protocolo utilizado na CME. Após a esterilização, as canetas retornaram ao laboratório e foram submetidas à nova coleta para contagem microbiológica, conforme descrito no item 2.3.

### Análise estatística

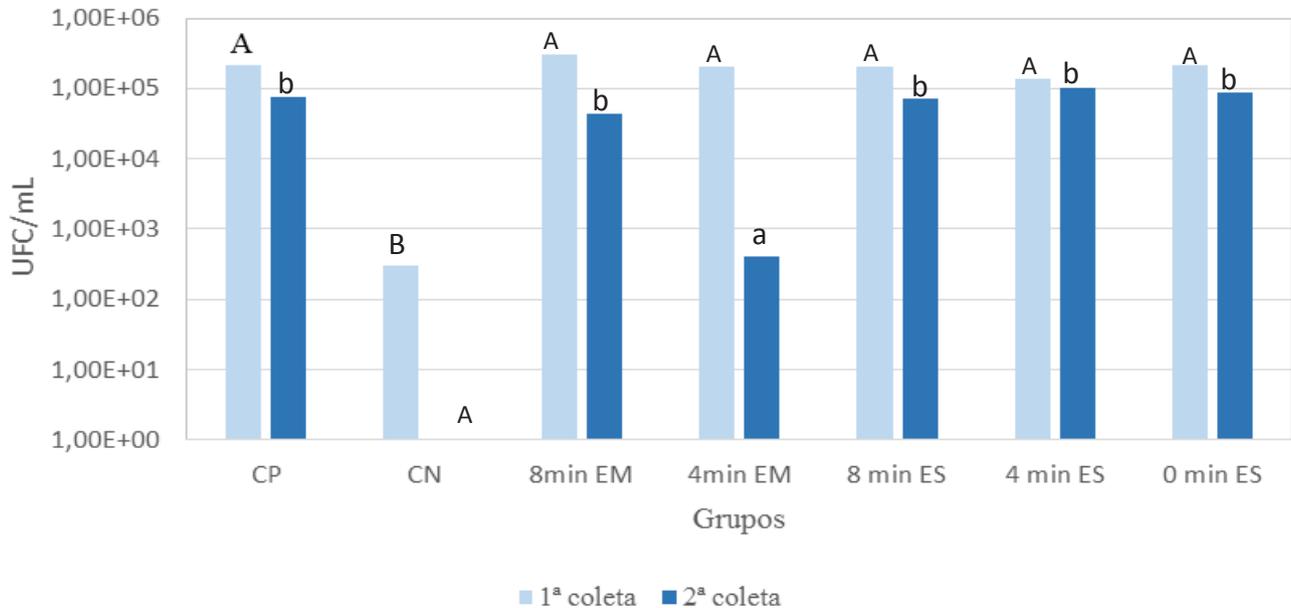
Os dados foram obtidos e tabulados no programa Excel 2013 e submetidos à análise descritiva. Para a análise estatística, foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (Mamirauá, Pará, Brasil), em que a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Análise da Variância (one-way ANOVA) com post-hoc de Bonferroni, considerando um nível de significância de 5%, foi utilizado.

## RESULTADOS

Os resultados do estudo podem ser observados na figura 2. Foi notória a maior eficácia dos processos que utilizaram a associação de envolver a turbina de alta rotação em gaze embebida com detergente enzimático, seguido pela fricção mecânica com gaze, sendo esses processos decisivos para menor contagem de UFC/mL-1. Após a segunda coleta, todos

os grupos apresentaram diminuição da quantidade de UFC/mL quando comparado à contagem inicial. A comparação dos tratamentos evidenciou que apenas o grupo utilizando turbina envolvida em gaze, embebida em detergente enzimático por 4 minutos, seguida por fricção mecânica com a gaze, diferiu, estatisticamente, dos demais nas duas coletas microbiológicas realizadas, se mostrando como melhor protocolo de descontaminação das turbinas de alta rotação entre os testados.

**Figura 2.** Resultados em UFC/mL de primeira e segunda coleta após descontaminação das turbinas de alta rotação (TAR).



Médias das contagens microbiológicas em UFC/ml da primeira coleta (após limpeza) e da segunda coleta (após limpeza seguida de esterilização em autoclave) das turbinas de alta rotação. Letras maiúsculas comparam os resultados obtidos nos diferentes tratamentos na primeira coleta, e letras minúsculas comparam os resultados obtidos na segunda coleta (n=3).

## DISCUSSÃO

A necessidade deste estudo surgiu da dúvida do melhor, mais eficiente e mais rápido protocolo para descontaminação das turbinas de alta rotação por professores e alunos do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral e foi realizado a fim de estabelecer o protocolo de descontaminação das turbinas de alta rotação a ser adotado no curso.

É de suma importância definir que essas coletas tiveram por objetivo esclarecer a necessidade do protocolo que melhor leva à desinfecção. Se todos ficassem em condições de uso após a esterilização, poderíamos optar pelo protocolo menos complicado e mais rápido; mas, a partir da segunda coleta microbiológica, foi possível perceber, ainda, um residual de contaminação dos materiais analisados.

A cavidade bucal abriga mais de 700 micro-organismos diferentes em sua flora<sup>9</sup>, muitos dos quais podem contaminar pacientes e profissionais por transferência de saliva, de sangue, do fluido crevicular gengival e até das secreções respiratórias

do paciente, com possibilidade de causar patologias que vão da tuberculose ao herpes, de um leve resfriado a uma pneumonia, atuando como meios efetivos de transmissão e infecção de doenças<sup>10</sup>. As peças de mão e as cadeiras odontológicas obtiveram um índice de maior contaminação, sendo mais prevalente nas TARs a ocorrência de cocos e bastonetes gram-positivos e diplococos gram-negativos<sup>11</sup>.

A esterilização, há bastante tempo, vem sendo discutida, sempre preconizada com o máximo rigor, a fim de garantir que um artigo não crítico ou semicrítico não se torne crítico durante o procedimento por uma errada descontaminação e/ou esterilização prévia<sup>12</sup>. O protocolo de biossegurança inclui o uso de equipamentos de proteção individual, como máscaras descartáveis, óculos e luvas descartáveis, os quais são considerados eficientes e diminuem, significativamente, os níveis de contaminação<sup>13,14</sup>. Entre os processos de esterilização, o processo físico pode ser efetuado por meio de vapor saturado sob pressão e calor a seco<sup>15</sup>, sendo o processo por vapor saturado sob pressão aquele que oferece maior segurança e economia<sup>16</sup>.

Uma limpeza prévia nos instrumentos antes da esterilização final é necessária e fundamental para garantir a efetividade do método de esterilização e total biossegurança, pois diminui a carga microbiana e as sujidades. Considerando que o método de vapor sob pressão só funciona sobre superfícies e que ele não tem ação em profundidade, é fundamental que crostas, sangue e outras substâncias sejam removidas em etapa prévia à esterilização, para que o vapor possa entrar em contato direto com a superfície do instrumental a ser esterilizado. Quanto mais bem feita a limpeza, haverá maior chance de eficácia no processo de esterilização, e, caso não haja uma limpeza adequada, haverá uma elevação nos números de insucessos

em relação à eliminação de patógeno ao final do processo de esterilização<sup>17</sup>.

O detergente enzimático já demonstrou, previamente, sua eficácia em artigos, utilizando sangue e sujidades<sup>17</sup>. Os resultados de nosso estudo corroboram esses achados, apresentando a necessidade de ação inicial do detergente enzimático por 4 minutos, seguida de fricção mecânica da gaze como a melhor técnica de desinfecção das turbinas de alta rotação previamente à lavagem e à sua esterilização em autoclave, o que também vai de acordo com as instruções de uso do produto utilizado.

## REFERÊNCIAS

- Jorge AOC. Princípios de biossegurança em Odontologia. Rev Biocienc. 2002 Jan-Jun; 8(1): 7-17.
- Rutala WA, Weber DJ, HICPAC Members. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. EUA; 2017.
- Rutala WA, Weber DJ. Sterilization, High-Level Disinfection, and Environmental Cleaning. Infect Dis Clin N Am. 2011 Mar; 25(1):45-76. doi: 10.1016/j.idc.2010.11.009.
- Alvarenga CF, Reis C, Tipple AFV, Paiva EMM, Sasamoto SAA. Efetividade de um protocolo de processamento na esterilização de canetas de alta rotação em autoclave gravitacional. Rev Eletr Enf. 2011Jul-Set;13(3):560-5.
- Pinto FMG. Desinfecção das canetas de alta rotação com álcool 70% p/v sem limpeza prévia: avaliação dos riscos de infecção cruzada [tese]. São Paulo (SP): USP; 2013.
- ADA Council on Access, Prevention and interprofessional Relations; ADA Council on Scientific Affairs. Using mouth guards to reduce the incidence and severity of sports-related oral injuries. J Amer Dent Assoc, 2006 Dec;137(12): 1712-20.
- CDC. Guidelines for infection control in dental health-care settings. USA, 2003. [acesso 2019 Jan 15]; Disponível em: <https://www.cdc.gov/oralhealth/infectioncontrol/pdf/safe-care-checklist.pdf>.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005 Nov; 43(11):5721-32.
- Pereira RS, Tipple AFV, Reis C, Cavalcante FO, Belo TKAMC. Análise microbiológica de canetas odontológicas de alta rotação submetidas à descontaminação com álcool etílico a 70%. ROBRAC. 2008;17(44):124-132.
- Rodrigues KA, Lima IF, Silva AK, Sotte DMKS, Silva JS. Análise de contaminantes microbiológicos em consultório odontológico. Pens@r Acadêmico. 2018; 4(1)1-6.
- Chinellato LEM, Scheidt W. A. Estudo e avaliação dos meios de biossegurança para o cirurgião-dentista e auxiliares contra doenças infecto-contagiosas no consultório odontológico. Revista da FOB. 1993;1(1/4):59-66.
- Bulgarelli AF, Torquato TM, Costa LSS, Ferreira ZA. Avaliação das medidas de biossegurança no controle de infecção cruzada durante tratamento periodontal básico. RBO. 2001 Jan; 58(3):188-190.
- Gonçalves ES, Godoy SAL, Tripodi J. Manual de Biossegurança. 2. ed. Bauru: USP; 2014 [acesso 2019 Jan 10]. Disponível em: <http://www.youblisher.com/p/1157850-Manual-de-Biosseguranca-FOB-USP/>.
- Biachi EC, Silva EJ, Cezar FAG, Aguiar PR, Bianchi ARR, Freitas CA, Riehl H. Aspectos Microscópicos da Influência dos Processos de Esterilização em Pontas Diamantadas. Mat. Res. 2003 Abr-Jun; 6(2):203-210. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-14392003000200015>.
- Gil RF, Camelo SH, Laus AM. Atividades do enfermeiro de centro de material e esterilização em instituições hospitalares. Acta Paul Enferm. 2007 Out-Dez; 20(4): 470-5.
- Schmidt DRS, Yonekura CSI, Gil RF. Instrumento para avaliação de detergentes enzimáticos. Rev esc enferm USP. 2008; 42(2): 282-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342008000200011>.

### Como citar este artigo/How to cite this article:

Alcântara I, Freitas R, Pinheiro LG, Felipe ATP, Rebouças PD, Santos JZ. Eficácia de diferentes processos de desinfecção em turbinas de alta rotação. J Health Biol Sci. 2019 Abr-Jun; 7(2):177-181.

# Ácido tânico como agente biomodificador de dentina

## Tanic acid as biomodificator of collagen dentin

Talita Arrais Daniel Mendes<sup>1,2</sup> , Samuel Chillavert Dias Pascoal<sup>3</sup> , Marcelo Victor Sidou Lemos<sup>1</sup> , Sérgio Lima Santiago<sup>4</sup> ,  
Juliano Sartori Mendonça<sup>4</sup> 

1. Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 2. Docente do Curso de Odontologia do Centro Universitário Unicatólica (Unicatólica), Quixadá, CE, Brasil. 3. Discente do Curso de Odontologia pela Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 4. Docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil

### Resumo

**Introdução:** a utilização de diferentes polifenóis no aumento das propriedades mecânicas do colágeno dentinário tem sido bastante empregada, sendo o ácido tânico um polifenol com propriedade biológica bastante pronunciada. **Objetivo:** avaliar o potencial biomodificador do ácido tânico (AT) em diferentes concentrações em colágeno dentinário. **Métodos:** os fatores sob investigação foram módulo de elasticidade, mensurado por meio de um ensaio de flexão de três pontos (n=10) e variação de massa (n=10), aferidos com uma balança de precisão, sendo, para tanto, avaliados os seguintes elementos: ácido tânico (0,1; 1 e 10%), proantocianidina (6,5%) e água destilada (controle). **Resultados:** quanto ao módulo de elasticidade, os grupos tratados com ácido tânico apresentaram valores, estatisticamente, superiores (p<0,05) aos demais grupos, não sendo observadas diferenças entre suas diferentes concentrações. Para os valores de variação de massa, os grupos que foram imersos em agentes biomodificadores apresentaram valores estatisticamente (p<0,05) superiores ao grupo controle. **Conclusão:** o ácido tânico se apresenta como um potencial agente biomodificador do colágeno dentinário, independente da concentração utilizada, aumentando o seu módulo de elasticidade e gerando um ganho de massa após uma hora de imersão.

**Palavras-chave:** Colágeno. Adesivos Dentinários. Polifenóis. Proantocianidinas.

### Abstract

**Introduction:** The use of different polyphenols in the increase of the mechanical properties of dentin collagen has been widely used, thus, tannic acid being a polyphenol with very pronounced biological proprieties. **Objective:** to evaluate the biomodifying potential of tannic acid (AT) in different concentrations in dentin collagen. **Methods:** the factors under investigation were modulus of elasticity, measured by a three-point bending test (n = 10), and mass variation (n = 10), measured by means of a precision scale, being the following substances evaluated: tannic acid (0.1, 1 and 10%), proanthocyanidin (6.5%) and distilled water (control). **Results:** As for the modulus of elasticity, the groups treated with tannic acid presented statistically higher values (p <0.05) in relation to the other groups, and no differences were observed between the different concentrations. For the values of mass variation, the groups that were immersed in biomodifiers showed statistically (p <0.05) values higher than the control group. **Conclusion:** tannic acid presents as a potential biomodifying agent of dentin collagen, regardless of the concentration used, increasing its modulus of elasticity and generating a mass gain after one hour of immersion.

**Key words:** Collagen. Dentin-Bonding Agents. Polyphenols. Proanthocyanidins

### INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios em Odontologia restauradora é o estabelecimento de uma união eficaz entre sistemas resinosos e estrutura dentária. Em longo prazo, essa união pode não ser tão eficaz, em substrato dentinário, quando se trata de sistemas adesivos convencionais, pois, na interface de união adesivo/restauração, podem ocorrer diversos mecanismos de degradação por ação de enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs) e cisteíno catepsinas (CTPs), além do processo de hidrólise, ocasionado por presença de água em excesso<sup>1,2,3</sup>. Já tem sido relatado, na literatura, que a taxa anual de falha de restaurações com resinas compostas varia em torno de 1 a 10%, sendo a principal causa a presença de cáries secundárias oriundas de falhas no procedimento restaurador/adesivo<sup>4</sup>. Visando minimizar danos decorrentes dessas degradações, a

literatura propõe a utilização de várias estratégias, como uso de inibidores de MMPs e CTPs, agentes remineralizadores, técnica úmida utilizando o etanol e os agentes biomodificadores (AB) ou de ligações cruzadas (ALC)<sup>5</sup>.

Os ALCs consistem em compostos químicos de origem natural ou sintética que irão interagir com o colágeno dentinário, formando ligações entre os aminoácidos presentes em sua estrutura tripla hélice, as quais podem ser tanto intrafibrilar como interfibrilar<sup>5</sup>. Por meio dessa ação, os ABs irão aumentar as propriedades mecânicas do colágeno da dentina, bem como inibir MMPs e CTPs<sup>5,6</sup>. Alguns ALCs não têm o seu mecanismo de ação bem descrito na literatura, como as proantocianidinas (PA), mas a hipótese mais bem aceita é que

**Correspondente:** Talita Arrais Daniel Mendes. Centro Universitário Unicatólica Rua Juvêncio Alves, 660 - Centro, Quixadá - CE, 63900-000. E-mail: talita\_arrais@hotmail.com

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido 25 Out 2018; Revisado: 21 Jan 2019; 25 Jan 2019; Aceito: 28 Jan 2019

o grupamento fenólico, presente em sua estrutura, irá interagir com os aminoácidos do colágeno<sup>5</sup>. Portanto, diversos outros compostos com característica semelhantes têm sido propostos como potenciais AB, sendo, em sua maioria, polifenóis. Tais compostos são descritos como moléculas fenólicas de origem natural, apresentando uma ou mais hidroxilas ligadas ao anel benzênico. São caracterizados por terem uma ampla atividade biológica, apresentando propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas e influenciando diretamente na atividade de algumas enzimas e proteínas<sup>7</sup>.

Quando esses compostos interagem com o ácido gálico, por meio de uma reação de esterificação, irão formar ésteres que possuem atividade bem mais pronunciada<sup>8</sup>. Existem proposições de que a presença de grupamentos galoil em polifenóis melhora a capacidade de estabilização do colágeno, justificado pela maior quantidade de hidroxilas, as quais irão fornecer mais sítios reativos para que ocorra uma melhor reticulação do colágeno, podendo ocasionar sua maior rigidez, melhorando suas propriedades mecânicas<sup>9</sup>. Essa atividade biomodificadora melhorada irá depender, também, da posição e distribuição dos grupamentos galoil na molécula 10. Dessa forma, moléculas como o ácido tânico (AT), polifenol da família dos galotaninos, que apresentam cinco grupamentos galoil em sua estrutura, podem ser um potencial ALC de colágeno, tendo em vista as ótimas propriedades biológicas já conhecidas em sua molécula, excelente capacidade de inibição enzimática e reatividade biológica, eliminando radicais livres<sup>7</sup>.

A atividade dessas moléculas depende tanto da posição dos grupos galoil em sua estrutura, como de sua quantidade 9. Dessa forma, o presente estudo objetiva avaliar a capacidade biomodificadora do ácido tânico, em diferentes concentrações no colágeno dentinário. As hipóteses do estudo foram (1) quanto maior a concentração do ácido tânico, mais irá aumentar as propriedades mecânicas do colágeno tipo I e (2) conforme o aumento da concentração desse agente, maior será o ganho de massa após o tratamento do colágeno.

## MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (sob o número de protocolo 2439067). Trata-se de um estudo laboratorial *in vitro*, em que foram utilizados terceiros molares humanos livres de cárie para avaliar a dentina pré-tratada com AT 0,1 p/p% (pó, Ácido Tânico, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) [TA0,1]; AT 1p/p% [TA1]; AT 10p/p% [TA10]; extrato de uva contendo incorporação de PA 6,5% (90% PA, *Vitis vinifera*, Gold Mega-Natural, polifenóis, Madera, USA) [PA6,5] e água destilada [AD].

### Preparo das amostras

Foram realizados cortes de dentina média de modo a obterem-se barras com as dimensões de 1,7 X 0,5 X 6 (±0,1) mm<sup>3</sup>. Esse corte foi realizado com o auxílio de uma cortadeira metalográfica sob constante refrigeração (Isomet 4000; Buehler, Lake

Bluff, Estados Unidos). As amostras foram desmineralizadas completamente em solução de ácido fosfórico a 10% durante o período de 5 horas, em temperatura ambiente sob agitação. Todos os agentes de biomodificação foram diluídos em água deionizada na concentração pertinente a cada grupo com o auxílio de um agitador magnético até sua completa diluição, seguido de filtragem da solução. As barras de dentina foram distribuídas, aleatoriamente, em seus cinco grupos distintos (n=10) e mantidas em suas respectivas soluções por um período de uma hora 10.

### Módulo de elasticidade (ME)

O ME foi determinado em um ensaio de flexão de três pontos com uma célula de carga de 5,0 N montada em uma máquina de ensaios mecânicos universal (EMIC DL 2000, São José dos Pinhais, Brasil), utilizando-se a velocidade de 0,5 mm/min. Os dados foram expressos em Megapascal (MPa), sendo o aumento do ME calculado entre a razão do valor final (após a biomodificação da dentina nos respectivos grupos) e os valores iniciais ("baseline")<sup>10,11</sup>.

### Variação de massa (VM)

Foram aferidas as massas dos espécimes antes (M1) e após (M2) a utilização dos agentes de biomodificação, com uma balança analítica de precisão de cinco casas decimais (0,00001g). As amostras foram dessecadas a vácuo, durante 24 horas, à temperatura ambiente. A avaliação da variação de massa (VM%) foi determinada como a porcentagem de ganho ou perda de base de cada amostra com base na seguinte fórmula:

$$VM\% = \left( \frac{M2 \times 100}{M1} \right) - 100$$

em que M1 é a massa matriz de dentina desmineralizada antes da biomodificação dentinária e M2 é a massa de matriz da dentina biomodificada 10.

### Análise estatística

Realizou-se um teste de normalidade Shapiro-Wilk tanto para ME, como para VM. Na avaliação do ME, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn's. Enquanto, para a VM, foi realizada uma análise de variância a um critério (ANOVA) seguido de pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado para as duas análises foi de 5% (p<0,05).

## RESULTADOS

Na análise de ME, pode-se observar que houve diferença estatística entre os grupos testados (p<0,001), em que se pode observar que os grupos AT0,1; AT1 e AT10 apresentaram um ganho maior no ME quando comparados aos demais (tabela 1). Em relação à VM, pode-se observar que houve diferença estatística pelos grupos testados (p<0,001). O grupo AD mostrou ganho de massa reduzido, quando comparados aos demais que apresentaram um ganho significativo de massa (tabela 1).

**Tabela 1.** Dados expressos em médias das variações de massa (VM %) e módulo de elasticidade (ME) [ $\pm$  desvio-padrão] após desmineralização das barras de dentina seguidos pré-tratamento com as respectivas soluções por 1 hora.

Grupos	ME	VM
ATO,1	1,5 $\pm$ 0,9 A	6,9 $\pm$ 0,5 A
AT1	7,9 $\pm$ 6,5 A	8,5 $\pm$ 7,9 A
AT10	1,9 $\pm$ 1,5 A	10,5 $\pm$ 1,9 A
PA6,5	-16,3 $\pm$ 29,2 B	8,5 $\pm$ 2,3 A
AD	-23,4 $\pm$ 10,8 B	3,1 $\pm$ 1,3 B

\*Para o ME, foi realizado um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn's, e, para a VM, realizou-se uma análise de variância ANOVA a um critério seguido de um pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Nas letras maiúsculas - comparação entre colunas - observa-se diferença estatística significativa, em que o ácido tânico 0,1% (ATO,1), ácido tânico 1% (AT1), ácido tânico 10% (AT10%), proantocianidina 6,5% (PA6,5) e água destilada como controle.

## DISCUSSÃO

Não há um consenso na literatura a respeito do AB ideal para aumentar a durabilidade da interface adesiva, evitando a perda de restaurações em um curto período de tempo<sup>5,6,11</sup>. Mas é uma realidade o aumento da utilização de produtos naturais na melhora da camada híbrida<sup>5,6,8,10</sup>, sendo o AT encontrado em algumas plantas da família *Reaumuria* e *Tamarix*<sup>12</sup>. O AT é um polifenol que apresenta propriedades biológicas bastante pronunciadas, em virtude da presença dos grupamentos galoil em sua molécula<sup>6,7,12</sup>, o que o caracteriza como um potencial agente biomodificador de colágeno dentinário. Dessa forma, o seu uso nesse substrato ainda não foi bem elucidado na literatura.

O uso do AT em diferentes concentrações aplicados sob a dentina modificou, positivamente, o colágeno, aceitando a primeira hipótese do estudo. O AT, independentemente da sua concentração, foi mais eficaz no aumento do ME que a PA, que é "padrão ouro" entre os AB naturais<sup>5,13</sup>. As PAs já se mostram bastante eficazes na ligação com o colágeno tipo I presente na dentina, melhorando a conformação das fibrilas de colágeno, quando utilizada na concentração de 6,5%. Tais substâncias apresentam uma versatilidade na formação de ligações, que podem ser do tipo ponte de hidrogênio, tipo éster ou, até mesmo, formação covalente estável entres os aminoácidos constituintes da cadeia tripla-hélice do colágeno<sup>5,13</sup>. Sabe-se, também, que, além de todos esses mecanismos de interação, tais catequinas irão formar complexos de cálcio amorfo, mineralizando tal estrutura por meio da deposição de fosfato e cálcio, deixando mais resistente o sítio de inserção do material restaurador<sup>14</sup>.

Já foi testada diferentes concentrações de AT (1%, 10% e 20%) e observou-se que todas as concentrações influenciaram positivamente no módulo de elasticidade de colágeno dentinário quando aplicados por uma hora<sup>15</sup>. No entanto,

não se obtiveram comparações com a proantocianidina, que, até então, já está bem estabelecida como um dos melhores agentes de reticulação de colágeno de origem natural, em estudos laboratoriais. O presente estudo ainda demonstra que uma pequena concentração de AT, 0,1%, foi eficaz no aumento do módulo de elasticidade do colágeno dentinário, mostrando o grande potencial de formação de ligações químicas com a estrutura dental. Dessa forma, nossos achados vão de encontro com Bedran-Russo *et al* (2009) que mostrou que as propriedades mecânicas do colágeno é dependente do tempo de aplicação da concentração<sup>15</sup>.

Aydin *et al* (2018) demonstraram que a presença de grupamentos galoil na molécula de proantocianidina galoilada não tem influência no aumento da longevidade do ganho de propriedades mecânicas do colágeno tratado, sendo a PAC sem esses grupamentos mais eficaz nessa manutenção 16, dessa forma, o presente estudo analisou de maneira imediata esse colágeno pré-tratado, e os grupamentos galoil parecem ter sido relevantes na formação de ligações cruzadas no colágeno de dentina; no entanto, faz-se necessária uma avaliação em longo prazo para saber se essas ligações químicas possuem estabilidade com o passar o tempo .

Sendo assim, observou-se que o AT independente da concentração utilizada, foi mais eficaz que a PA, e isso pode ver-se pelo fato de a molécula do TA ter maior sítios de provável reticulação com o colágeno, apresentando uma ampla atividade biológica, bem como formar maior número de ligações cruzadas que irão inibir, de maneira mais efetiva, as MMPs e CTPs, preservando, efetivamente, a estrutura colágena<sup>6,7,11,15</sup>. Por ser uma complexa mistura de poligaloilglucose, terá, conseqüentemente, uma maior quantidade de hidroxilas disponíveis para interação com o grupamento amida, que são constituintes dos aminoácidos presentes na tripla hélice do colágeno dentinário, corroborando os achados que sugerem que a quantidade de hidroxilas está diretamente relacionada à reatividade e à interação dessa molécula na efetividade de ligações cruzadas<sup>8,15</sup>.

Quando analisamos os três grupos contendo AT, podemos observar que, na concentração de 10%, há um menor ganho desse ME, comparado aos demais. Isso pode dar-se pelo fato da não completa interação do substrato em questão, que apresenta, conseqüentemente, moléculas residuais que podem interferir em uma posterior ligação com sistemas adesivos. Isso pode ser observado nas PAs, que, por não apresentarem uma pureza total no extrato de uva, os resquícios existentes vão influenciar negativamente para o ganho de suas propriedades mecânicas.

Além do aumento do ME demonstrado no presente estudo, observa-se uma característica favorável para sua implementação na prática clínica, que é a influência na coloração, que as PAs pigmentam fortemente o substrato<sup>17</sup>, o que não é observado nos grupos usando TA, o que viabiliza o seu uso na odontologia estética, tornando-o bastante promissora a sua aplicabilidade.

Em relação à variação de massa, observou-se diferença significativamente estatística entre os grupos testados, aceitando a segunda hipótese do estudo. Já é bem estabelecida, na literatura, a bioatividade de algumas moléculas como taninos e flavonoides<sup>6,10,11</sup>, e isso pode ser comprovado pelo ganho de massa nos grupos AT0,1, AT1, AT10 e PA6,5, referente à formação de ligações cruzadas na estrutura colágena, comprovando a efetividade de AT com essa função para melhorar a interface adesiva.

Alguns achados, na literatura, já mostram que, na concentração 6,5%, a PA é mais eficaz na efetividade de melhora das propriedades mecânicas da dentina pré-tratada<sup>5,14,15</sup>, corroborando o presente estudo que mostrou um ganho significativo de massa equivalente à PA, elucidando a atividade de ALC desses. No entanto, o mecanismo de ação, o AT, ainda não está bem estabelecido, necessitando de maiores estudos acerca desse questionamento. Portando, acredita-se que o AT

vai melhorar o ME e o ganho de massa por meio de formação de ligações cruzadas.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o ácido tânico influencia, positivamente, no ganho de propriedades mecânicas do colágeno tipo I, presente na dentina, e aumenta, significativamente, a massa da dentina desmineralizada, independentemente da concentração utilizada, na aplicação de 1 hora, sendo então, eficaz para a formação de ligações cruzadas, podendo ser promissor na utilização perante o procedimento adesivo.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Universidade Federal do Ceará.

## REFERÊNCIAS

- Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* [Internet]. 2011 Jan [cited 2018 Out 21]; 27(1):1-16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21112620/>. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.016.
- Frasseto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability: A literature review. *Dent Mater* [Internet]. 2016 Feb [cited 2018 Out 22]. 32(2): 41-53. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109-5641\(15\)00465-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109-5641(15)00465-0). doi: 10.1016/j.dental.2015.11.007.
- Niu L, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen J, Tay FR. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater* [Internet]. . 2014 Jan [cited 2018 Out 22]30(1): 77-96. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109-5641\(13\)00175-9](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109-5641(13)00175-9). doi: 10.1016/j.dental.2013.07.013.
- Demarco FF, Corrêa MB, Cenci MS, Moraes RR, Opdam NJM. Longevity of posterior composite restorations: Not only a matter of materials. *Dent Mater* [Internet]. 2012 Jan [cited 2019 Jan 21]. 28(1): 87-101. Available from: [www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema](http://www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema). doi:10.1016/j.dental.2011.09.003.
- Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, Mcalpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater* [Internet]. . 2014 Out [cited 2018 Out 22]. 30(1): 62-76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24309436/>. doi: 10.1016/j.dental.2013.10.012.
- Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar R, Mcalpine JB, Napolitano JG, Chen SN, et al. Galloyl moieties enhance the dentin biomodification potential of plant-derived catechins. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Abr [cited 2018 Out 22]. 10(7): 3288-3294. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24721612/>. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.03.036.
- Karas D, Ulrichová J, Valentová K. Galloylation of polyphenols alters their biological activity. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2017 Jul [cited 2018 Out 22]. 105(12): 223-240. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278-6915\(17\)30188-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278-6915(17)30188-6). doi: 10.1016/j.fct.2017.04.021.
- Phansalkar RS, Nam JW, Chen SN, Mcalpine JB, Napolitano JG, Leme A, Vidal CMP, et al. A galloylated dimeric proanthocyanidin from grape seed exhibits dentin biomodification potential. *Fitoterapia* [Internet]. 2015 Dez [cited 2018 Out 22]. 101(2):168-178. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC25542682/>. doi: 10.1016/j.fitote.2014.12.006.
- He Q, Shi B, Yao K, Luo Y, Ma Z. Synthesis of gallotannins. *Carbohydr Res* [Internet]. 2001 Oct [cited 2018 Out 22]. 335(4): 245-250. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621501002361>. doi: 10.1016/S0008-6215(01)00236-1.
- Aguiar TR, Vidal CMP, Phansalkar RS, Todorova I, Napolitano JG, Mcalpine JB, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Dentin Biomodification Potential Depends on Polyphenol Source. *J Dent Res* [Internet]. 2014 Set [cited 2018 Out 22]. 93(4): 417-422. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24574140/>. doi: 10.1177/0022034514523783.
- Castellan CS, Pereira PNR, Viana G, Chen SN, Pauli GF, Bedran-Russo AK. Solubility study of phytochemical cross-linking agents on dentin stiffness. *J Dent* [Internet]. 2010 Feb [cited 2018 Out 22]. 38(5): 431-436. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20171257/>. doi: 10.1016/j.jdent.2010.02.002.
- Orabi MA, Yoshimura M, Amakura Y, Hatano T. Ellagitannins, gallotannins, and gallo-ellagitannins from the galls of *Tamarix aphylla*. *Fitoterapia* [Internet]. 2015 Jul [cited 2018 Out 22]. 104:55-63. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367-326X\(15\)30004-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367-326X(15)30004-6). doi: 10.1016/j.fitote.2015.05.008.
- Vidal CMP, Zhu W, Manhoar S, Aydin B, Keiderling TA, Messersmith PB, Bedran-Russo AK. Collagen-collagen interactions mediated by plant-derived proanthocyanidins: A spectroscopic and atomic force microscopy study. *Acta Biomater* [Internet]. 2016 May [cited 2018 Out 21]. 41:110-118. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27208639/>. doi: 10.1016/j.actbio.2016.05.026.
- Epasinge DJ, Burrow MF, Yiu KY. Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentin collagen. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 Out 22]. 84: 29-36. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003-9969\(17\)30283-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003-9969(17)30283-2). doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.09.012.
- Bedran-Russo AKB, Yoo KJ, Ema KC, Pashley DH. Mechanical Properties of Tannic-acid-treated Dentin Matrix. *J Dent Res* [Internet]. 2009 Sep [cited 2018 Oct 21]. 88(9): 807-811. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC19767576/>. doi: 10.1177/0022034509342556.
- Aydin B, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar RS, Nam JW, et al. Evidence to the role of interflavan linkages and galloylation of proanthocyanidins at sustaining long-term dentin biomodification. *Dent Mater* [Internet]. 2018 Dec

[cited 2019 Jan 21]. 35(2): 328-334. Available from: [www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema](http://www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema). doi: 10.1016/j.dental.2018.11.029.

17. Moreira MA, Souza NO, Sousa RS, Freitas DQ, Lemos MS, De Paula DM,

et al. 2017 Oct [cited 2018 Oct 21]. Efficacy of new natural biomodification agents from Anacardiaceae extracts on dentin collagen cross-linking. *Dent Mater [Internet]*. 33(10):1103-1109. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109-5641\(17\)30320-2/](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0109-5641(17)30320-2/). doi: 10.1016/j.dental.2017.07.003.

**Como citar este artigo/How to cite this article:**

Mendes TAD, Pascoal SCD, Lemos MVS, Santiago SL, Mendonça JS. Ácido tânico como agente biomodificador de dentina. *J Health Biol Sci*. 2019 Abr-Jun; 7(2):182-186

# Influência de soluções irrigadoras e de materiais obturadores na infiltração apical – análise pelo método de filtração de fluidos

## Influence of irrigating solutions and of root filling materials on apical leakage – Fluid filtration method analysis

George Tácio de Miranda Candeiro<sup>1</sup> , Horst Frischkorn<sup>2</sup> , Maria Caroline de Abreu Timbó<sup>3</sup> , Yhara Carvalho de Sousa<sup>3</sup> , Danna Mota Moreira<sup>1</sup> , Phillipe Nogueira Barbosa Alencar<sup>1</sup> , Mônica Sampaio do Vale<sup>4</sup> 

1 Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil. 2 Docente do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 3 Discente do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil. 4 Docente do Departamento de Clínica Odontológica do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

### Resumo

**Objetivo:** avaliar, por meio do método de filtração de fluidos, a influência da solução irrigadora e diferentes associações de materiais obturadores na infiltração apical. **Métodos:** foram utilizados 112 pré-molares inferiores extraídos, divididos em dois grupos controle (n=8) e oito grupos experimentais (n=12), de acordo com a solução irrigante: hipoclorito de sódio (H), vinagre de maçã (V), e, de acordo com o material obturador, gutta-percha/AH Plus (GA), Resilon/Epiphany (RE), gutta-percha/Epiphany (GE) e Resilon/AH Plus (RA). Os canais radiculares foram instrumentados e obturados pela técnica híbrida de Tagger. Em seguida, os canais foram desobturados nos terços médio e cervical, permanecendo apenas 4 mm do terço apical para a análise da infiltração pelo método de filtração de fluidos. Os dados foram analisados, estatisticamente, pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo considerado significativo quando  $P < 0,05$ . **Resultados:** as médias obtidas de infiltração apical ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) nos grupos foram: H/GA ( $0,03 \pm 0,09$ ), V/GA ( $0,04 \pm 0,05$ ), H/RE ( $0,06 \pm 0,13$ ), V/RE ( $0,10 \pm 0,20$ ), H/GE ( $0,08 \pm 0,18$ ), H/GE ( $0,16 \pm 0,21$ ), H/RA ( $0,40 \pm 0,63$ ) e V/RA ( $0,57 \pm 1,13$ ). Não foi observada diferença estatística quanto às soluções de irrigação aplicadas ( $P > 0,05$ ). No entanto, em relação aos materiais obturadores, verificou-se que os grupos obturados com a associação Resilon/AH Plus apresentaram, significativamente, maior infiltração que os demais grupos ( $P < 0,05$ ). **Conclusões:** a infiltração apical foi influenciada apenas pelos materiais obturadores, independentemente da solução de irrigadora.

**Palavras-chave:** Soluções irrigadoras. Materiais obturadores. Infiltração Apical. Obturação. Método de Filtração de Fluidos.

### Abstract

**Objective:** to evaluate by fluid filtration method, the influence of the irrigating solution and different root filling materials associations in the apical leakage. **Methods:** One hundred-twelve lower premolars extracted were divided in 2 control groups (n=8) and 8 experimental groups (n=12), according to the irrigation solution; sodium hypochlorite (H), apple vinegar (V), and according to the root canal filling material, gutta-percha/AH Plus (GA), Resilon/Epiphany (RE), gutta-percha/Epiphany (GE), Resilon/AH Plus (RA). The roots canals were instrumented and filled by Tagger's hybrid technique being removed from the filling material, having remained only 4 mm of apical root third to analyze the leakage through fluid filtration method. Data were analyzed by Kruskal-Wallis test and  $P < 0.05$  was considered significant. **Results:** The apical leakage means ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) observed in the groups were, H/GA ( $0.03 \pm 0.09$ ), V/GA ( $0.04 \pm 0.05$ ), H/RE ( $0.06 \pm 0.13$ ), V/RE ( $0.10 \pm 0.20$ ), H/GE ( $0.08 \pm 0.18$ ), H/GE ( $0.16 \pm 0.21$ ), H/RA ( $0.40 \pm 0.63$ ) e V/RA ( $0.57 \pm 1.13$ ). It was observed no statistical difference regarding the irrigation solutions applied ( $P > 0.05$ ), although the groups irrigated with sodium hypochlorite showed the best results. However, regarding the root canal filling material used, it was verified that the groups filled with Resilon/AH Plus association (H/RA e V/RA) have shown leakage higher significantly than other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The apical leakage was influenced only by the root filling materials, regardless the irrigation solution.

**Key words:** Irrigation Solutions. Root Canal Filling Materials. Apical Leakage. Obturation. Fluid Filtration Method.

### INTRODUÇÃO

Um dos objetivos mais importantes da obturação endodôntica é evitar a penetração das bactérias remanescentes do tecido periapical para o interior do canal radicular. Outro objetivo importante é bloquear essas bactérias após o tratamento endodôntico, a fim de evitar seu acesso às regiões apicais<sup>1</sup>. Sabe-se que o sucesso da terapia endodôntica está diretamente relacionado à qualidade da obturação<sup>2</sup>.

No entanto, muitos estudos têm atestado a existência de falhas na interface material obturador/dentina, pois a gutta-percha não

possui adesividade às estruturas dentinárias<sup>1,2</sup>. Novos materiais adesivos aplicados na obturação endodôntica têm surgido na tentativa de obter uma maior resistência adesiva.

O sistema Resilon/Epiphany apresentaria a capacidade de formar um “monobloco” entre a superfície radicular e o material obturador, resultando em um selamento ideal, representando, teoricamente, uma alternativa à gutta-percha<sup>1</sup>. Desde o lançamento no mercado do sistema Resilon/Epiphany, muitos pesquisadores avaliaram a eficiência de sua adesão às

**Correspondente:** Prof. Dr. George Tácio de Miranda Candeiro. Rua General Tertuliano Potiguara, 1313 apto 801A – Aldeota, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: georgecandeiro@hotmail.com

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido em: 19 Sep 2018; Revisado em: 27 Feb 2019; 18 Mar 2019; Aceito em: 19 Mar 2019

paredes dentinárias, influenciando a resistência das fraturas radiculares e do extravasamento apical<sup>3,4</sup>.

No entanto, não há consenso, na literatura, sobre o uso seguro de sistemas adesivos em endodontia. Tem havido uma preocupação com a qualidade do tratamento da parede dentinária devido ao fato de que esse tecido é, usualmente, encontrado com umidade, sendo difícil promover a adesão e formar essa camada híbrida<sup>5</sup>. Há um debate sobre a medida ideal para a remoção da smear layer, a fim de aperfeiçoar o uso de sistemas adesivos dentro do canal radicular<sup>6-8</sup>.

A solução irrigadora pode apresentar alguma influência na formação da camada híbrida e no processo de adesão. O hipoclorito de sódio é a principal solução irrigadora em tratamentos endodônticos, e recentes estudos verificaram uma possível influência negativa quando utilizados os sistemas adesivos<sup>7,8</sup>. O vinagre de maçã tem sido proposto como solução irrigante, possuindo uma biocompatibilidade adequada e considerável capacidade de remover a camada de smear layer presente na superfície dos túbulos dentinários<sup>9-11</sup>. No entanto, ainda não foi avaliado o efeito do vinagre de maçã como solução irrigadora no selamento apical, quando associado à guta-percha e ao sistema Resilon/Epiphany.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, usando o método de filtração de fluidos, a infiltração apical em dentes cujos canais radiculares foram irrigados com hipoclorito de sódio 2,5% e vinagre de maçã e obturados com cones Resilon e de guta-percha associados aos cimentos endodônticos Epiphany e AH Plus.

## MÉTODOS

A presente pesquisa foi submetida e aprovada ao Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará com o protocolo nº 183/09.

### Seleção dos Espécimes

Cento e doze pré-molares humanos inferiores recentemente extraídos foram selecionados, apresentando raiz reta e apenas um canal radicular, confirmado por radiografias periapicais. Após a extração, os dentes foram mantidos em solução fisiológica com 0,01% de Timol, por 30 dias e, posteriormente, armazenados em solução fisiológica, refrigerados até o seu uso.

### Preparação dos Espécimes e Distribuição de Grupos

Após a limpeza das superfícies radiculares com curetas periodontais, os dentes tiveram a coroa removida com discos de carborundum, utilizando irrigação com solução salina. As raízes foram colocadas no centro de tubos de PVC, com 12 mm de altura e 7 mm de diâmetro, com o objetivo de padronizar os diâmetros, realizando a inclusão das raízes em resina acrílica em que 2 mm apicais permaneciam fora do tubo de PVC.

Posteriormente, os espécimes selecionados foram distribuídos, randomicamente, em dois grupos-controle positivo e negativo (n = 8), para a obtenção das infiltrações máxima e mínima, respectivamente. Em seguida, foram distribuídos os demais espécimes em oito grupos experimentais (n = 12) atribuídos de acordo com a solução de irrigação e material obturador, conforme mostrado na tabela 1.

**Tabela 1.** Divisão dos grupos experimentais (n = 12), segundo a solução irrigadora e material obturador do canal radicular.

Grupo	Solução Irrigadora	Cone	Cimento	Abreviação
1	Hipoclorito de Sódio 2,5%	Guta-percha	AH Plus	H/GA
2	Vinagre de maçã	Guta-percha	AH Plus	V/GA
3	Hipoclorito de Sódio 2,5%	Resilon	Epiphany	H/RE
4	Vinagre de maçã	Resilon	Epiphany	V/RE
5	Hipoclorito de Sódio 2,5%	Guta-percha	Epiphany	H/GE
6	Vinagre de maçã	Guta-percha	Epiphany	V/GE
7	Hipoclorito de Sódio 2,5%	Resilon	AH Plus	H/RA
8	Vinagre de maçã	Resilon	AH Plus	V/RA

Fonte: Própria dos autores.

O preparo químico-cirúrgico foi realizado com o sistema ProTaper Universal (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) até o instrumento F5. O comprimento de trabalho foi estabelecido como 1 mm aquém do forame apical, mesmo que, em todos os espécimes, seja realizada a patência foraminal com o instrumento #30. Durante a troca de cada instrumento, os canais foram irrigados com 2 mL de solução de irrigação proposta para cada grupo.

Posteriormente, foram aplicados 2 mL de EDTA trisódico (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil), durante 3 minutos, seguido de irrigação com Hipoclorito de Sódio 2,5% nos dentes dos grupos 1, 3, 5 e 7, e com vinagre de maçã (Minhoto, São Paulo, Brasil) nos grupos 2, 4, 6 e 8. A irrigação final foi feita com 5 mL de solução fisiológica. Os espécimes tiveram seus canais secos com pontas de papel absorvente tamanho 50 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça)

no comprimento de trabalho.

Em seguida, os dentes foram obturados com os materiais propostos por cada grupo, sendo utilizada a Técnica Híbrida de Tagger. Radiografias periapicais foram feitas para verificar a qualidade das obturações. Após 30 dias, os canais radiculares tiveram os terços cervical e médio desobturados com brocas de Gates-Glidden, sendo mantidos apenas 4 mm do material obturador. Os canais foram levados com soro fisiológico e permaneceram em estufa 37°C e 100% de umidade até a realização do teste de filtração de fluidos.

Os dentes dos grupos-controle foram instrumentados, também, com os instrumentos ProTaper Universal até o instrumento F5. Os dentes do grupo controle negativo foram obturados com guta-percha/AH Plus e tiveram a coroa restaurada com resina composta e os dentes do grupo-controle positivo não foram obturados.

### Método de Filtração de Fluidos

Em seguida, os espécimes, previamente preparados com resina acrílica, foram ajustados em mangueiras plásticas (PVC Chrystal, Plasville Ltda, Joinville, Brasil) com, aproximadamente, 6,4 mm de diâmetro, em ambos os lados, utilizando cianoacrilato (Super Bonder®, Henkel Ltda, São Paulo, Brasil) e fios de aço 0,30 mm (Dental Morelli Ltda, Sorocaba, Brasil) para manter as mangueiras plásticas no espécime nas regiões cervical e apical. A estabilidade do sistema foi verificada com um compressor de ar conectado à mangueira ao lado da parte cervical da amostra, sendo imerso em água. Se houvesse algum vazamento ou falha na adaptação da mangueira, haveria bolhas de ar e uma nova adaptação era feita no espécime.

O método de filtração de fluidos foi baseado em descrições feitas por Wu et al.<sup>12</sup>. Foi utilizada uma pressão de 1,0 atm, empurrando a água destilada na direção cérvico-apical. Durante o experimento, todo o sistema foi mantido imerso em água deionizada, sob pressão constante, auxiliada por um redutor de pressão (Air Liquid, SA, Paris, França) e um manômetro industrial, com precisão de  $\pm 1\%$  (Zürich Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil). A infiltração apical foi medida a partir do deslocamento de uma bolha de ar injetada em uma micropipeta de vidro (Pyrex, Corning Incorporated, Lowell, MA, EUA) acoplada à mangueira na porção apical da amostra. As leituras da posição das bolhas foram feitas a cada 2 minutos de intervalo, com cinco repetições para estimar a média de deslocamento da bolha em  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### Análise Estatística

As médias de infiltrações apicais nos grupos experimentais foram analisadas estatisticamente por meio do programa SPSS 15.0, utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas pelo teste de Dunn. Diferenças significativas foram consideradas quando  $P < 0,05$ .

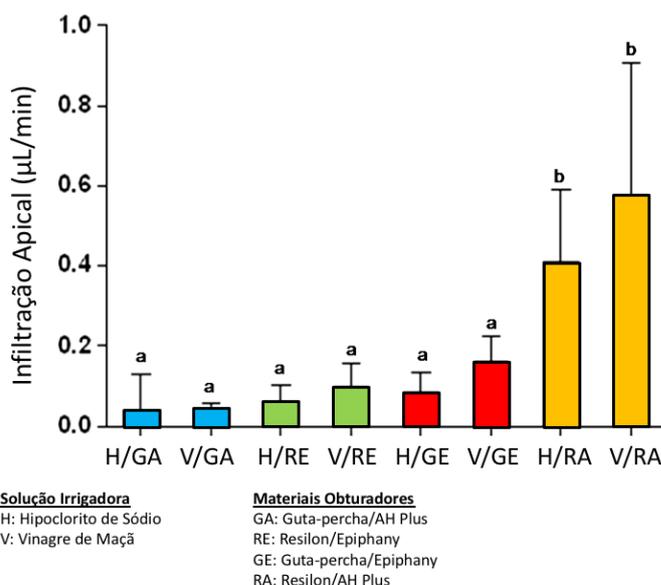
## RESULTADOS

Nos dentes do grupo-controle negativo, nenhuma infiltração não foi detectada, ao passo que todos os dentes do grupo-controle positivo tiveram infiltração excessiva, com difícil medição, devido à rapidez do movimento das bolhas.

Nos grupos experimentais, foi observado que todos os dentes apresentaram alguma infiltração, e que as médias obtidas de infiltração apical ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) nos grupos foram: H/GA ( $0,03 \pm 0,09$ ), V/GA ( $0,04 \pm 0,05$ ), H/RE ( $0,06 \pm 0,13$ ), V/RE ( $0,10 \pm 0,20$ ), H/GE ( $0,08 \pm 0,18$ ), H/GE ( $0,16 \pm 0,21$ ), H/RA ( $0,40 \pm 0,63$ ) e V/RA ( $0,57 \pm 1,13$ ). Não foi observada diferença estatística quanto às soluções de irrigação aplicadas ( $P > 0,05$ ), embora os grupos irrigados com hipoclorito de sódio tenham apresentado os melhores resultados.

No entanto, em relação aos materiais obturadores, verificou-se que os grupos obturados com a associação Resilon/AH Plus apresentaram infiltração significativamente maior que os demais grupos ( $P < 0,05$ ). A figura 1 mostra as médias das infiltrações apicais de cada grupo.

**Figura 1.** Médias  $\pm$  desvio-padrão ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) de infiltração apical, apresentadas em grupos experimentais.



Letras diferentes (a ou b) indicam a presença de diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Própria dos autores.

## DISCUSSÃO

A introdução de materiais obturadores adesivos em canais endodônticos ganhou maiores proporções com o surgimento do sistema Resilon/Epiphany, idealizado para manter o selamento apical e lateral, e, também, para reforçar a estrutura radicular<sup>1,3</sup>. No entanto, algumas pesquisas verificaram que o

sistema Resilon/Epiphany não apresenta diferenças nem no selamento nem na resistência a fraturas, quando comparado à guta-percha<sup>13-15</sup>.

O uso de materiais obturadores adesivos em canais radiculares implica um tratamento com soluções irrigantes e agentes quelantes antes da obturação, uma vez que a qualidade do preenchimento do canal está diretamente relacionada ao grau de desmineralização dentinária e a completa remoção da camada de smear layer<sup>7,16</sup>. Uma combinação entre soluções capazes de remover, completamente, os componentes inorgânicos da camada de smear layer é um procedimento interessante para promover um maior contato entre o material de preenchimento e as paredes do canal radicular<sup>11</sup>. Consequentemente, tem a desvantagem de descalcificar a dentina, o que pode prejudicar suas propriedades mecânicas<sup>6</sup>. Portanto, um aumento na área tubular da dentina, bem como uma consequente redução da dentina intertubular, uma vez promovida devido à forte ação quelante, não é favorável à sua adesão<sup>5</sup>. Assim, um efeito moderado de descalcificação pode representar uma boa escolha, preservando a dentina peritubular e intertubular<sup>7</sup>.

Embora o vinagre de maçã, quando utilizado como solução de irrigação, associado ao EDTA, apresente maior capacidade de remoção da smear layer do que o hipoclorito de sódio associado ao EDTA<sup>11</sup>, na presente pesquisa, a infiltração apical não foi influenciada significativamente pelas soluções irrigantes.

No presente estudo, utilizou-se o método de filtração de fluidos, que é baseado na penetração de água destilada sob pressão constante, dentro dos canais radiculares preenchidos, em que nenhum movimento de fluidos será detectado, se o sistema de canais radiculares estiver completamente vedado. Além disso, o método de filtração de fluidos quantifica a microinfiltração, sendo capaz de permitir medidas repetitivas, devido à falta de necessidade de cortar os espécimes para realizar a análise<sup>12</sup>. No entanto, todas as metodologias que avaliam a infiltração apresentam resultados questionáveis, devido a limitações dos métodos, não podendo ser comparados entre si<sup>17,18</sup>.

Alguns trabalhos ex vivo compararam as diferentes associações entre cones de guta-percha e Resilon com os cimentos endodônticos AH Plus e Epiphany, sob algumas metodologias, sendo observados resultados divergentes<sup>1,19-22</sup>.

Trabalhos prévios verificaram menor infiltração em dentes obturados utilizando o sistema Resilon/Epiphany do que guta-percha/AH Plus<sup>15,23,24</sup>. No entanto, na presente pesquisa, independentemente da solução de irrigação adotada, observou-se maior capacidade de seladora em raízes obturadas com cones de guta-percha e cimento AH Plus quando comparados aos espécimes preenchidos com o sistema Resilon/Epiphany,

concordando com outros autores<sup>14,19,21,25</sup>. Esse resultado pode ter ocorrido devido à excelente adesão do cimento AH Plus às paredes dentinárias. Também tem sido relatado que os materiais à base de metacrilato (cimento Epiphany, por exemplo) apresentam contração volumétrica durante o processo de polimerização, devido ao alto fator C no interior do canal radicular, aumentando as falhas entre as paredes dentinárias e o material obturador<sup>26,27</sup>. Portanto, a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre esses dois materiais é, em grande parte, devido à existência de uma forte interação do cimento Epiphany aos cones Resilon, criando uma estrutura com capacidade adequada de selamento, semelhante à associação guta-percha/AH Plus.

Os grupos que apresentaram maiores taxas de infiltração apical, com diferença estatisticamente significativa quando relacionados aos demais grupos, foram representados pela associação entre os cones Resilon e o cimento AH Plus, independentemente da solução irrigadora, concordando com algumas pesquisas<sup>19,20,22</sup>. Todos os resultados podem ser explicados devido à menor capacidade dos cones Resilon em preencher espaços, aliada à falta de interação deles com o cimento AH Plus<sup>20</sup>. No entanto, Kaya et al.<sup>20</sup>, utilizando o teste push-out, relataram que os melhores resultados com a associação Resilon/AH Plus, aplicando a técnica de condensação lateral, foram inferiores apenas à associação guta-percha/Epiphany quando submetidos a técnicas obturadoras com termoplastificação.

No presente trabalho, os dentes foram desobturados nos terços cervical e médio, com o objetivo de avaliar a infiltração da porção apical, pois é a parte mais crítica do tratamento endodôntico. O terço apical é mais difícil de ser desinfetado e de ser obturado também. Dentes preparados para a inserção de retentores intraradiculares podem apresentar falhas caso os cuidados adicionais não sejam atentados, como a utilização de isolamento absoluto, por exemplo<sup>28</sup>. Dessa forma, o selamento do terço apical apresenta imensa importância na manutenção da qualidade do tratamento endodôntico.

A obturação do canal radicular deve ser realizada com materiais que promovam um adequado selamento e que possibilitem o processo de reparo apical. Assim, o clínico precisa observar os resultados na literatura com cautela antes de fazer a escolha do material.

## CONCLUSÕES

A partir da metodologia empregada, concluiu-se que as obturações realizadas com guta-percha/AH Plus e com o sistema Resilon/Epiphany apresentaram similares capacidades de selamentos apicais. O uso do vinagre de maçã não influenciou o selamento apical

## REFERÊNCIAS

1. Shipper G, Ørstavik D, Teixeira FB, Trope M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon). *J Endod.* 2004 Maio; 30(5):342-7.

2. Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. Comparison between gutta-percha and Resilon removal using two different techniques in endodontic. *J Endod.* 2006 Abr; 32(4):362-4.

3. Tan M, Chai Z, Sun C, Hu B, Gao X, Chen Y, Song J. Comparative evaluation of the vertical fracture resistance of endodontically treated roots filled with Gutta-percha and Resilon: a meta-analysis of in vitro studies. *BMC Oral Health*. 2018 Jun 13;18(1):107. doi: 10.1186/s12903-018-0571-x.
4. Wedding JR, Brown CE, Legan JJ, Moore BK, Vail MM. An in vitro comparison of microleakage between Resilon and gutta-percha with a fluid filtration model. *J Endod*. 2007 Dez;33(12):1447-9.
5. Andriukaitiene L, Song X, Yang N, Lassila LVJ, Vallittu PK, Kerosuo E. The effect of smear layer removal on E. faecalis leakage and bond strength of four resin-based root canal sealers. *BMC Oral Health*. 2018 Dez 13;18(1): 213. doi: 10.1186/s12903-018-0655-7.
6. De-Deus G, Namen F, Galan Jr J, Zehnder M. Soft Chelating Irrigation Protocol Optimizes Bonding Quality of Resilon/Epiphany Root Fillings. *J Endod*. 2008 Jun; 34(6):703-5.
7. Seballos VG, Barreto MS, Rosa RAD, Machado E, Valandro LF, Kaizer OB. Effect of Post-Space Irrigation with NaOCl And CaOCl at Different Concentrations on the Bond Strength of Posts Cemented with a Self-Adhesive Resin Cement. *Braz Dent J*. 2018 Sep-Oct;29(5):446-451. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440201801955>.
8. Wang Y, Chen C, Zang HL, Liang YH. The recovery effect of proanthocyanidin on microtensile bond strength to sodium hypochlorite-treated dentine. *Int Endod J*. 2019 Mar; 52(3):371-376. doi: 10.1111/iej.13005.
9. Zandim DL, Corrêa FOB, Sampaio JEC, Rossa C Júnior. The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules: a SEM evaluation. *Braz Oral Res*. 2004 Jan-Mar;18(1):63-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242004000100012>.
10. Spanó JC, Silva RG, Guedes DF, Sousa MD Neto, Estrela C, Pécora JD. Atomic absorption spectrometry and scanning electron microscopy evaluation of concentration of calcium ions and smear layer removal with root canal chelators. *J Endod*. 2009 May; 35(5): 727-30. doi: 10.1016/j.joen.2009.02.008.
11. Candeiro GT, Matos IB, Costa CF, Fonteles CS, Vale MS. A comparative scanning electron microscopy evaluation of smear layer removal with apple vinegar and sodium hypochlorite associated with EDTA. *J Appl Oral Sci*. 2011 Nov-Dez; 19(6):639-43.
12. Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR, Moorer WR. Fluid transport and bacterial penetration along root canal fillings. *Int Endod J*. 1993 Jul; 26(4):203-8.
13. Tay FR, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, Pashley DH, Mak YF, et al. Ultrastructural evaluation of the apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material. *J Endod*. 2005 Jul; 31(7): 514-9.
14. Tunga U, Bodrumlu E. Assessment of the sealing ability of a new root canal obturation material. *J Endod*. 2006 Set; 32(9):876-8. doi: 10.1016/j.joen.2006.02.005.
15. Mishra P, Sharma A, Mishra S, Gupta M. Push-out bond strength of different endodontic obturation material at three different sites - In-vitro study. *J Clin Exp Dent*. 2017 Jun 1; 9(6): e733-e737.
16. García-Godoy F, Loushine RJ, Itthagarun A, Weller RN, Murray PE, Feilzer AJ, et al. Application of biologically-oriented dentin bonding principles to the use of endodontic irrigants. *Am J Dent*. 2005 Out;18(4): 281-90.
17. Jafari F, Jafari S. Importance and methodologies of endodontic microleakage studies: A systematic review. *J Clin Exp Dent*. 2017 Jun 1; 9(6): e812-e819. doi: 10.4317/jced.53604.
18. Moinzadeh AT, Mirmohammadi H, Hensbergen IA, Wesselink PR, Shemesh H. The correlation between fluid transport and push-out strength in root canals filled with a methacrylate-based filling material. *Int Endod J*. 2015 Feb; 48(2):193-8. doi: 10.1111/iej.12300.
19. Ungor M, Onay EO, Orucoglu H. Push-out bond strengths: the Epiphany-Resilon endodontic obturation system compared with different pairings of Epiphany, Resilon, AH Plus and gutta-percha. *Int Endod J*. 2006 Out; 39(8): 643-7.
20. Kaya BU, Kececi AD, Belli S. Evaluation of the sealing ability of gutta-percha and thermoplastic synthetic polymer-based systems along the root canals through the glucose penetration model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Dec;104(6): e66-73.
21. Verma D, Taneja S, Kumari M. Efficacy of different irrigation regimes on the push-out bond strength of various resin-based sealers at different root levels: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2018 Mar-Apr; 21(2): 125-129. doi: 10.4103/JCD.JCD\_337\_16.
22. Sarangi P, Mallick R, Satapathy SK, Sharma G, Kouser F, Mohapatra S. An In vitro Comparison of Pushout Bond Strength of Resilon with MetaSEAL and AH Plus Sealers. *Contemp Clin Dent*. 2017 Oct-Dec; 8(4):613-616. doi: 10.4103/ccd.ccd\_666\_17.
23. Sultana M, Musani MA, Ahmed IM. An in-vitro comparative study for assessment of apical sealing ability of Epiphany/AH Plus sealer with Resilon/gutta-percha root canal filling materials. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016 Jul-Aug; 6(4): 321-6. doi: 10.4103/2231-0762.186806.
24. Williamson AE, Marker KL, Drake DR, Dawson DV, Walton RE. Resin-based versus gutta-percha-based root canal obturation: influence on bacterial leakage in an in vitro model system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Out;108(2): 292-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.01.043.
25. Bergmans L, Moisiadis P, Munck J, Van Meerbeek B, Lambrechts P. Effect of polymerization shrinkage on the sealing capacity of resin fillers for endodontic use. *J Adhes Dent*. 2005; 7(4): 321-9.
26. Fisher MA, Berzins DW, Bahcall JK. An in vitro comparison of bond strength of various obturation materials to root canal dentin using a push-out test design. *J Endod*. 2007 Jul; 33(7): 856-8.
27. Gulsahi K, Cehreli GC, Onay EO, Tasman-Dagli F, Ungor M. Comparison of the Area of Resin-based Sealer and Voids in Roots Obturated with Resilon and Gutta-Percha. *J Endod*. 2007 Nov; 33(11): 1338-41. doi: 10.1016/j.joen.2007.06.015
28. Goldfein J, Speirs C, Finkelman M, Amato R. Rubber dam use during post placement influences the success of root canal-treated teeth. *J Endod*. 2013 Dec; 39(12):1481-4. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.036.

#### Como citar este artigo/How to cite this article:

Candeiro GTM, Frischkorns H, Timbó MCA, Sousa YC, Moreira DM, Alencar PNB, et al. Influência de soluções irrigadoras e de materiais obturadores na infiltração apical – análise pelo método de filtração de fluidos. *J Health Biol Sci*. 2019 Abr-Jun; 7(2):187-191.

# Ação do laser infravermelho em suspensões de *Streptococcus mutans*

## Infrared laser action on *Streptococcus mutans* suspensions

Smyrna Luiza Ximenes de Souza<sup>1</sup> , Stéfani Vasconcelos Santos<sup>2</sup> , Fernanda Freitas Sousa<sup>2</sup> , Ana Larissa Ximenes Batista<sup>2</sup> ,  
Lais Aragão Lima<sup>2</sup> , Ramille Araújo Lima<sup>3</sup> 

1. Mestranda em Ciências Odontológicas, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil. 2. Graduada em Odontologia, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil. 3. Docente do curso de Odontologia, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brasil.

### Resumo

**Introdução:** os benefícios do laser infravermelho no tratamento da mucosite oral e no controle da dor na disfunção da articulação temporomandibular são bem reconhecidos e já aplicados clinicamente. Porém, o efeito dessa terapia em bactérias da cavidade oral ainda é incerto. **Objetivo:** analisar o efeito do laser infravermelho Diodo de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) (LIV) nos níveis de suspensões de *Streptococcus mutans* UA159. **Método:** o laser de baixa potência infravermelho e comprimento de onda predominante de 880nm (Therapy XT-ESTM, DMC Equipamentos) foi utilizado com potência de 100mW e diâmetro da ponteira 0,0280 cm<sup>2</sup>. A suspensão bacteriana foi ativada em estufa bacteriológica a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, durante um período de 18 horas, ajustada para a concentração de 1-2 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). As suspensões foram submetidas aos seguintes protocolos experimentais e controle: grupo 1) LIV 30s; grupo 2) LIV 60s; grupo 3) LIV 90s; grupo 4) NaCl 0,9%. Em seguida, uma alíquota foi retirada para a diluição seriada e semeadura das amostras. As placas permaneceram em estufa bacteriológica a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante um período de 48 horas para posterior contagem das UFC/mL. O estudo foi conduzido em triplicata. **Resultados:** os resultados, a seguir, estão expressos em Log UFC/mL: grupo 1 (8,42±0,16); grupo 2 (8,41±0,03); grupo 3 (8,37±0,11); grupo 4 (8,37±0,16). Não foi observada diferença estatisticamente entre os grupos (p>0,05). **Conclusão:** o estudo mostrou que o laser infravermelho, nas condições experimentais usadas, não demonstrou ação na viabilidade de *S. mutans* presentes em suspensões *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Streptococcus mutans*. Cárie dentária. Terapia a laser de baixa intensidade. Laser. Odontologia.

### Abstract

**Introduction:** The benefits of infrared laser in the treatment of oral mucositis and pain control in temporomandibular joint dysfunction are well recognized and applied clinically. However, the effect of this therapy on oral cavity bacteria is still uncertain. **Objective:** Analyze the effect of infrared laser Gallium Arsenide Diode (AsGaAl) (LIV) on the levels of *Streptococcus mutans* UA159 suspensions. **Method:** Low-power infrared laser with predominant wavelength of 880nm (Therapy XT-ESTM, DMC Equipment) was used with 100mW output power and tip diameter 0.0280cm<sup>2</sup>. The bacterial suspension was activated in a bacteriological oven at 37 ° C and 5% CO<sub>2</sub> for a period of 18 h, adjusted to the concentration of 1-2 x 10<sup>8</sup> colony forming units / mL (CFU / mL). The suspensions were submitted to the following experimental protocols and control: Group 1) LIV 30s; group 2) LIV 60s; Group 3) LIV 90s; Group 4) saline solution. After that, an aliquot was taken for serial dilution and plating of the sample. The plates were kept in a bacteriological oven at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours for subsequent cfu/ml counts. The study was conducted in triplicates. **Results:** The following results are expressed in Log ufc/mL: Group 1 (8.42 ± 0.16); Group 2 (8.41 ± 0.03); Group 3 (8.37 ± 0.11); Group 4 (8.37 ± 0.16). There was no statistically significant difference between groups (p>0.05). **Conclusion:** In the experimental tested conditions, the study showed that the infrared laser had no action on the viability of *S. mutans* suspensions *in vitro*.

**Key words:** *Streptococcus mutans*. Dental Caries. Low-Level Light Therapy. Lasers. Dentistry.

### INTRODUÇÃO

A laserterapia de baixa intensidade (LBI) refere-se à aplicação da luz (geralmente entregue por meio de um laser de baixa potência diodo ou LED) para promover a reparação dos tecidos, reduzir a inflamação ou induzir analgesia<sup>1</sup>.

As atividades biológicas da LBI baseiam-se em um mecanismo de ação complexo, que pode ser explicado pela absorção de luz dentro das mitocôndrias<sup>2</sup>. A enzima citocromo c oxidase absorve luz vermelha e infravermelha, e essa transferência de luz, na forma de energia irá acarretar a liberação de óxido nítrico (ON) do centro catalítico do citocromo c oxidase (reação redox), formação de oxigênio singleto e aumento subsequente

da produção do ânion superóxido (geração de espécies reativas de oxigênio-ROS)<sup>3</sup>. Após a estimulação dos fotorreceptores, ocorre uma cascata de reações bioquímicas na célula que irão promover à liberação de fatores de crescimento por macrófagos, proliferação de queratinócitos, aumento da população e de granulação de mastócitos e angiogênese. Esses efeitos podem levar a uma aceleração no processo de cicatrização de feridas devido, em parte, à redução na duração da inflamação aguda, resultando em uma reparação mais rápida<sup>4</sup>.

Vale salientar as diferenças entre a laserterapia de baixa intensidade das outras modalidades terapêuticas à base de

**Correspondente:** Ramille Araújo Lima. Unichristus Campus Parque Ecológico. Rua: João Adolfo Gurgel, 133 - Cocó, Fortaleza - CE, 60190-060. E-mail: ramillelima@yahoo.com.br

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido: 19 Set 2018; Revisado: 5 Mar 2019; 20 Mar 2019; Aceito: 27 Mar 2019

luz. A laserterapia de alta potência promove sua ação por meio da ablação ou do aquecimento de tecidos ou superfícies (como o esmalte dental). A terapia fotodinâmica utiliza a luz, indiretamente, para desencadear reações de fotoativação em fotossensibilizadores (corantes), que, assim, irão gerar radicais livres bactericidas. Em contraste, a LBI usa a ação de luz (e somente luz) para estimular diretamente as células hospedeiras, a fim de reduzir inflamação, aliviar a dor e/ou promover cicatrização<sup>1</sup>.

Os dispositivos de laser ou LED aplicados na LBI, geralmente, emitem luz com comprimentos de onda de 600 a 1000 nm (vermelho a infravermelho)<sup>1</sup>. Especificamente sobre a luz na região infravermelha (IV) do espectro (acima de 700 nm), objeto de estudo da presente pesquisa, sabe-se que esse tipo de luz vem sendo utilizado em tratamentos fisioterápicos há mais de 40 anos. Apesar de seu uso mais recente em odontologia, várias utilizações vêm sendo propostas, tais como:

- redução da dor em pacientes com disfunção temporomandibular<sup>5</sup>;
- cicatrização de feridas<sup>6</sup>;
- tratamento de distúrbios crônico-inflamatórios, tais como líquen plano oral<sup>7</sup>;
- tratamento de distúrbios neurossensoriais e dor pós-operatória após cirurgia ortognática<sup>8</sup>;
- redução de dor durante tratamento ortodôntico<sup>9</sup>;
- redução da dor e auxílio na cicatrização da estomatite aftosa recorrente<sup>10</sup>;
- terapia adjunta no tratamento da osteonecrose dos maxilares<sup>11</sup>;
- terapia adjunta da hipersensibilidade dentinária<sup>12</sup>.

Os efeitos antibacterianos da luz IV em suspensões de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Escherichia coli*<sup>13</sup> e em biofilmes *in vivo*<sup>14</sup> e *in vitro*<sup>15,16</sup> de *Staphylococcus aureus* foram estudados por alguns pesquisadores. Por meio de efeitos térmicos e de fotodisrupção, a LBI promove ruptura da parede celular bacteriana e acúmulo de proteína desnaturada no citoplasma bacteriano, levando, assim, a danos letais e subletais à célula<sup>17,18</sup>.

Os efeitos da LBI perante os biofilmes de *Streptococcus mutans*<sup>19,20,21</sup> e os biofilmes mistos (*Streptococcus mutans* e *Candida albicans*)<sup>19</sup> foram relatados. Apesar da complexidade da comunidade bacteriana que coloniza o biofilme dental, e *S. mutans* não ser o microrganismo mais numeroso da placa dental, é reconhecido que as glicosiltransferases (Gtfs) de *S. mutans* desempenham papéis críticos no desenvolvimento da virulência da placa dentária. Os genes Gtf, entre outras funções, são responsáveis pela produção da matriz de polissacarídeos solúveis e insolúveis<sup>22</sup>. Além disso, apresentam a habilidade em rapidamente degradar carboidratos fermentáveis, promovendo a formação abundante de ácido e a capacidade de tolerar ambientes com baixo pH<sup>23</sup>. Em adição, *S. mutans* tem alta afinidade à superfície dentária mediada pela presença de adesinas e polissacarídeos extracelulares que contribuem para a sua patogenicidade<sup>24</sup>.

Atualmente, encontra-se estabelecido na comunidade científica o conceito de que o surgimento das duas doenças mais prevalentes na cavidade bucal de humanos, cárie dental e doença periodontal estejam intimamente relacionadas à presença de biofilme. O tratamento das doenças relacionadas à presença dos biofilmes bacterianos envolve, basicamente, a remoção mecânica desses biofilmes e o uso de antibióticos e agentes antissépticos. Entretanto, diante da emergência de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos tradicionais, tem aumentado o interesse da comunidade científica em desenvolver terapias antimicrobianas alternativas que tornem o surgimento improvável de cepas geneticamente resistentes<sup>25</sup>.

Os benefícios do laser infravermelho no tratamento de diversas patologias da cavidade oral (redução de dor e cicatrização) são bem reconhecidos e já aplicados clinicamente. Porém, o efeito dessa terapia em bactérias da cavidade oral ainda é incerto. Portanto, o objetivo deste trabalho é analisar o efeito antimicrobiano do laser infravermelho de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) em suspensões de *S. mutans* UA159, vislumbrando um método alternativo de controle de biofilmes cariogênicos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Fonte de Luz

A fonte de luz utilizada foi um Laser Infravermelho Diodo de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda predominante de 880 nm. A potência de luz de Laser foi 100 mw e o diâmetro da ponteira é 0.028 cm<sup>2</sup> (Therapy XT-ESTM, DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil).

O local irradiado foi o poço de uma placa de cultura de células de 96 poços, cuja área é 0,321cm<sup>2</sup>. Três tempos de irradiação foram utilizados: 30 segundos, 60 segundos e 90 segundos. Assim, foram utilizadas as seguintes doses de energia e respectivas densidades de energia: 1) 3 J e 9,34 J/cm<sup>2</sup>; 2) 6 J e 18,69 J/cm<sup>2</sup>; 3) 9 J e 28,03 J/cm<sup>2</sup>. A distância entre a fonte de luz e o local da irradiação foi de 1 mm.

### Preparo do inóculo

O microrganismo utilizado foi o *S. mutans* UA159 cujo inóculo foi preparado em Tryptone Soya Broth (TSB), contendo 1% de glicose em temperatura de 37°C e atmosfera parcial de 5% CO<sup>2</sup>. A suspensão permaneceu em estufa por um período de 18 horas e, após esse período, foi ajustada por meio de espectrofotômetro, a fim de se obter uma suspensão com 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de suspensão.

### Delineamento experimental

O experimento apresentou os seguintes grupos:

- grupo 1: 100 µL de caldo + 100 µL do inóculo + LUZ por 30 segundos.

- grupo 2: 100 µL de caldo + 100 µL do inóculo + LUZ por 60 segundos.
- grupo 3: 100 µL de caldo + 100 µL do inóculo + LUZ por 90 segundos.
- grupo 4: 200 µL de solução salina (NaCl 0,89%).

Imediatamente após a aplicação do tratamento, de acordo com o grupo experimental, o volume total de cada poço (200 µL) foi transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e, em seguida, diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) foram realizadas. O material foi semeado em placas de petri, contendo meio de cultura BHI ágar e incubado em condições ideais para o crescimento desses microrganismos (estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C por 48 horas). Após esse período, as colônias foram contadas com a ajuda de um contador de colônias, e a relação de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foi estabelecida.

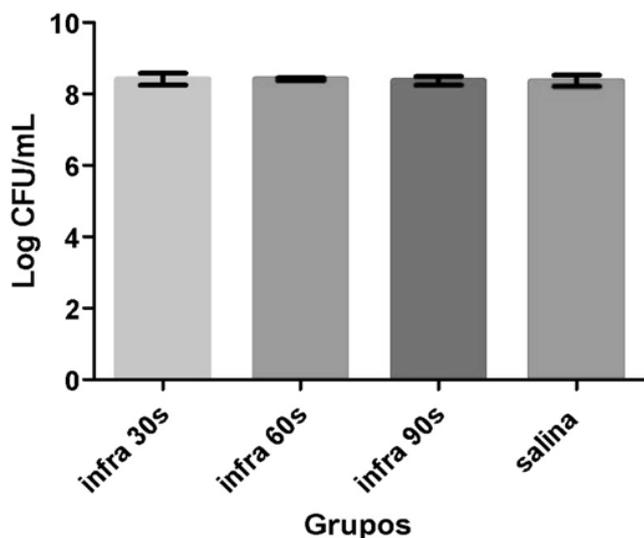
### Análise dos dados

Os resultados foram transformados para logaritmo na base dez e foram calculados as médias e os desvios-padrão de cada grupo. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e foi realizado o teste ANOVA seguido de Tukey. Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% e nível de significância 5%. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 5.0.

## RESULTADOS

Os resultados, a seguir, estão expressos em Log UFC/mL, em que são demonstrados valores médios ± desvio-padrão para o grupo 1 (8,42±0,16); grupo 2 (8,41±0,03); grupo 3 (8,37±0,11) e grupo 4 (8,37±0,16). Não foi observada diferença, estatisticamente, entre os grupos ( $p>0,05$ ) (figura 1).

**Figura 1.** Gráfico da análise da viabilidade bacteriana (log CFU/mL) entre os grupos experimentais testados.



## DISCUSSÃO

Apesar da redução de sua incidência, a cárie é uma das doenças crônicas mais prevalentes do mundo<sup>26</sup>, atingindo cerca de 60% a 90% das crianças em idade escolar e quase 100% da população adulta<sup>27</sup>. É evidente, portanto, a necessidade de mais estudos sobre alternativas de prevenção e controle do biofilme cariogênico.

Basso et al. (2011)<sup>19</sup> observaram redução de 1-log CFU/mL em biofilmes de *S. mutans* com a aplicação do laser InGaAsP (780 nm). Neste estudo, foi utilizado um laser com potência de 0,4 W por 1000s (dose de energia = 400 J) para alcançar a redução citada. Os mesmos pesquisadores testaram as doses de 100 J e 200 J e não observaram redução na viabilidade bacteriana, assim como demonstrado na presente pesquisa. Ressalta-se que, neste estudo, foi utilizada uma dose de energia máxima de 9 J, dose 44 vezes menor do que a dose relativa à pesquisa citada anteriormente.

Os efeitos da luz azul, com comprimento de onda de 400-500 nm, sobre biofilmes de *S. mutans* foi estudado por Chebath-Taube e colaboradores (2012)<sup>20</sup>. Embora tal luz seja, geralmente, utilizada para fotopolimerização de compósitos de resina, ela tem sido estudada como uma possível fonte de ação contra infecções por microrganismos. Os autores observaram um decréscimo na contagem unidades formadoras de colônia no grupo exposto à luz azul por sete (476 J/cm<sup>2</sup>) ou dez minutos (680 J/cm<sup>2</sup>) em um biofilme de seis horas.

Sousa et al (2015)<sup>21</sup> pesquisaram o uso da luz azul, com comprimento de onda de 420 nm, para prevenir o desenvolvimento da matriz de polissacarídeos em biofilme de *S. mutans* com aplicação duas vezes ao dia, ao longo de cinco dias. Utilizaram uma exposição de 12,56 minutos, com uma densidade de energia de 72 J/cm<sup>2</sup>. Perceberam que a exposição à luz azul reduziu a concentração de polissacarídeo extracelular insolúvel comparado aos outros grupos<sup>28</sup>, o que pode acarretar a diminuição da cariogenicidade do biofilme sem a redução da quantidade de microrganismos. De acordo com Dai et al (2012)<sup>28</sup>, a luz azul pode induzir respostas fisiológicas mediadas pelos receptores de luz azul; dessa forma, esta pode regular a motilidade bacteriana, suprimir o desenvolvimento do biofilme e potencializar a inativação da luz das bactérias.

Rocha et al. (2014)<sup>29</sup> estudaram os efeitos da irradiação com laser de baixa intensidade de Arsenato de Gálio sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, em doses de 1,2 J/cm<sup>2</sup> (10 segundos), 3,7 J/cm<sup>2</sup> (30 segundos), 7,5 J/cm<sup>2</sup> (um minuto) e 15 J/cm<sup>2</sup> (dois minutos). Seus resultados mostraram diferença significativa estatisticamente de acordo com tais doses aplicadas, o que discorda dos presentes resultados obtidos com *S. mutans*, a laserterapia de baixa intensidade, demonstrando o estudo anterior efeito inibitório sobre as cepas de *Candida* citadas, sugerindo maior sensibilidade de fungos à terapia com laser. Do mesmo modo Zhang et al (2016)<sup>30</sup> estudaram a luz azul e seu efeito para inativação da *Candida albicans in vitro* e

em queimaduras infectadas de ratos. Apesar de não ter havido diferença estatística significativa, o estudo demonstrou que a *C. albicans* foi susceptível à luz azul e mostrou que uma única exposição a essa luz (432 J/cm<sup>2</sup>) a reduziu, significativamente, nas queimaduras.

Pereira e colaboradores (2014)<sup>14</sup> compararam os efeitos da laserterapia de baixa intensidade no crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* em feridas infectadas *in vivo*, utilizando laser Arsenato de Gálio com 904 nm de comprimento de onda. Assim como no presente estudo, os autores não observaram redução da viabilidade bacteriana, após uso da laserterapia. Analisando *in vitro* biofilmes de *S. aureus* metilicina-resistentes, Krespi et al (2011)<sup>15</sup> testaram o efeito do laser IV (940 nm, 3 W, 180 segundos) e também não observaram redução da viabilidade bacteriana. Vale ressaltar que os autores demonstraram uma redução significativa quando o uso laser IV foi realizado em combinação com o laser de comprimento de onda de 300 nm. De forma semelhante, Tran et al (2018)<sup>16</sup> observaram uma redução da viabilidade bacteriana em biofilmes de *S. aureus* quando a combinação laser IV (780 nm – 1060 nm) e laser azul (405 nm) foi utilizada, porém não observaram essa redução quando o

laser IV foi utilizado sozinho. Esses resultados corroboram os encontrados na presente pesquisa, em que não observamos efeito antimicrobiano do laser IV.

## CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o laser infravermelho AsGaAl ( $\lambda = 880$  nm) não demonstrou ação na viabilidade bacteriana de suspensões *in vitro* de *S. mutans*. Mais estudos são necessários com o intuito de observar os efeitos do laser infravermelho em diferentes densidades de energia e em combinação com outras fontes de luz em diferentes comprimentos de onda.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Universitário Christus pela concessão de bolsa de iniciação científica aos autores SVS, FFS, ALXB.

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica ao autor LAL

## REFERÊNCIAS

- Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater.* 2014 May; 30(5):465–475. doi: 10.1016/j.dental.2014.02.006.
- Karu TI. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles of ATP. *Photomed Laser Surg.* 2010 Apr; 28(2): 159–60. doi: 10.1089/pho.2010.2789.
- Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004 Feb; 3(2): 211-6. Doi: 10.1039/b306126d.
- Lim W, Kim J, Kim S, Karna S, Won J, Jeon SM, Kim SY, Choi Y, Choi H, Kim O. Modulation of lipopolysaccharide-induced NF-kappa-B signaling pathway by 635nm irradiation via heat shock protein 27 in human gingival fibroblast cells. *Photochem Photobiol.* 2013 Jan-Feb; 89(1): 199–207. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01225.x.
- Panhoca VH, De Fatima Z, Lizarelli R, Nunez SC, Pizzo RC, Grecco C, Paolillo FR, Bagnato VS. Comparative clinical study of light analgesic effect on temporomandibular disorder (TMD) using red and infrared led therapy. *Lasers Med Sci.* 2015 Feb; 30(2): 815–822. doi: 10.1007/s10103-013-1444-9.
- Damante CA, Marques MM, Micheli GD. Terapia com laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas - revisão de literatura. *RFO.* 2008; 13(3):88-93.
- Al-Maweri SA, Kalakonda B, Al-soneidar WA, Al-Shamiri HM, Alkhalil MS, Alaizari N. Efficacy of low-level laser therapy in management of symptomatic oral lichen planus: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(6), 1429–1437. doi: 10.1007/s10103-017-2233-7.
- Pol R, Gallesio G, Riso M, Ruggiero T, Scarano A, Mortellaro C, et al. Effects of Superpulsed, Low-Level Laser Therapy on Neurosensory Recovery of the Inferior Alveolar Nerve. *J Craniofac Surg.* 2016;27(5):1215-9.
- Deana NF, Zaror C, Sandoval P, Alves N. Effectiveness of Low-Level Laser Therapy in Reducing Orthodontic Pain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pain Res Manag.* 2017 Sep; 2017: 1–18. doi: https://doi.org/10.1155/2017/8560652
- Suter VGA, Sjölund S, Bornstein MM. Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2017 May; 32(4): 953–963. doi: 10.1007/s10103-017-2184-z.
- Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Pedrazzi G, et al. Early surgical laser-assisted management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ): a retrospective analysis of 101 treated sites with long-term follow-up. *Photomed Laser Surg.* 2012 Jan; 30(1): 5–13. doi: 10.1089/pho.2010.2955.
- Ladalarido TCCGP, Pinheiro A, Campos RAC, Brugnera A Júnior, Zanin F, Albernaz PLM, et al. Laser Therapy in the Treatment of Dentine Hypersensitivity. *Braz Dent J.* 2004;15(2): 144-150. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402004000200011.
- Ha JW, Kang DH. Simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in powdered red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Appl Environ Microbiol.* 2013 Nov; 79(21): 6568-75. doi: 10.1128/AEM.02249-13.
- Pereira PR, Paula JB, Cielinski J, Pilonetto M, Von Bahtem, LC. Effects of low intensity laser in *in vitro* bacterial culture and in vivo infected wounds. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2014 Jan-Feb; 41(1): 49-55.
- Krespi YP, Kizhner V, Nistico L, Hall-Stoodley L, Stoodley P. Laser disruption and killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Am J Otolaryngol.* 2011 May-Jun; 32(3):198-202. doi: 10.1016/j.amjoto.2010.01.010.
- Tran VN, Dasagrandhi C, Truong VG, Kim YM, Kang HW. Antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* biofilm under combined exposure of glutaraldehyde, near-infrared light, and 405-nm laser. *PLoS One.* 2018 Aug; 13(8):e0202821. doi: 10.1371/journal.pone.0202821.
- Dworkin M. Endogenous photosensitization in a carotenoidless mutant of *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Physiol.* 1958 Aug; 41(16):1099-1112. doi: 10.1085/jgp.41.6.1099.
- Rosenberg B, Kemeny G, Switzer RC, Hamilton TC. Quantitative evidence for protein denaturation as the cause of thermal death. *Nature* 1971; 232: 471-473.

19. Basso FG, Oliveira CF, Fontana A, Kurachi C, Bagnato VS, Spolidório DM, et al. *In vitro* effect of low-level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Braz Dent J*. 2011; 22(6): 502-10.
20. Chebath-Taub D, Steinberg D, Featherstone JDB, Feuerstein O. Influence of blue light on *Streptococcus mutans* re-organization in biofilm. *J Photochem Photobiol B*. 2012 Nov; 116:75-78. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.08.004.
21. Sousa DL, Lima RA, Zanin IC, Klein ML, Janal MN, Duarte S. Effect of twice-daily blue light treatment on matrix-rich biofilm development. *PLoS ONE*. 2015; 10(7): e0131941/1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0131941.
22. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*. 2011; 45(1): 69–86. doi: 10.1159/000324598.
23. Svensater G, Welin J, Wilkins J. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001 Nov; 205(1):139-46.
24. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DCI, Treglown JD, Goodman SD, Ellen RP, Cvitkovitch DGA. Signal Transduction System in *Streptococcus mutans* Affects gtfBCD, gbpB, and ftf Expression, Biofilm Formation, and Genetic Competence Development. *J Bacteriol*. 2005 Jun; 187(12):4064–4076.
25. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May; 3(5): 436-450.
26. Marcenés W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global Burden of Oral Conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013 May; 92(7):592-597. doi: 10.1177/0022034513490168.
27. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan--day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005 Sep; 83(9): 661--9. doi: /S0042-96862005000900011.
28. Dai T, Gupta A, Murray CK, Vrahas MS, Tegos GP, Hamblin MR. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resist Updat*. 2012 Aug; 15(4): 223–236. doi: 10.1016/j.drug.2012.07.001.
29. Rocha EALSS, Cardoso AMR, Limeira FIR, Medeiros ACD, Catao MHCV, Gomes DQC. Low-level laser irradiation on *Candida* strains: an *in vitro* study. *Rev Cubana Estomatol*. 2015 Jan; 51(4): 358-365.
30. Zhang Y, Zhu Y, Chen J, Wang Y, Sherwood ME, Murray MSV, Hooper DC, Hamblin MR, Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*: *In vitro* and *in vivo* studies. *Virulence*. 2016 Jul; 7(5): 536-545. doi: 10.1080/21505594.2016.1155015

**Como citar este artigo/How to cite this article:**

Souza SLX, Santos SV, Sousa FF, Batista ALX,L, Lima LA, Lima RA. Ação do laser infravermelho em suspensões de *Streptococcus mutans*. *J Health Biol Sci*. 2019 Abr-Jun; 7(2):192-196.

# Avaliação do efeito de técnicas de acabamento e polimento na rugosidade superficial de resinas compostas

## Evaluation of the effect of finishing and polishing techniques on surface roughness of composite resins

Renato Queiroz Nogueira Lira<sup>1</sup> , Marcelo Victor Sidou Lemos<sup>2,4</sup> , Talita Arrais Daniel Mendes<sup>3</sup> , Jiovane Rabelo Neri<sup>4</sup> , Juliano Sartori Mendonça<sup>5</sup> , Sérgio Lima Santiago<sup>6</sup> 

1. Mestre em Odontologia, Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 2. Discente de doutorado do Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 3. Discente de doutorado do Programa de pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 4. Professor do curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, CE, Brasil. 5. Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 6. Professor Titular do Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

### Resumo

**Introdução:** o acabamento e o polimento das resinas compostas (RC) podem interferir diretamente na rugosidade desses materiais, estando relacionadas com a adesividade de placa bacteriana, manchamento, brilho e lisura. **Objetivo:** comparar a rugosidade superficial de duas RC, sendo uma micro-híbrida (Filtek Z250) e outra nanoparticulada (Filtek Z350), após a realização dos procedimentos de acabamento e polimento. **Métodos:** utilizando-se uma matriz metálica, confeccionaram-se quinze discos de cada RC. A lisura superficial proporcionada pela fita de poliéster foi avaliada por meio de um rugosímetro (Hommel Tech-T1000), obtendo-se dados iniciais. Realizou-se a mensuração em triplicata, obtendo-se o valor da rugosidade média (Ra). Lixaram-se as superfícies de topo dos espécimes e seguiu-se nova obtenção da Ra. Os espécimes foram, aleatoriamente, distribuídos em três grupos: GI – discos de óxido de alumínio; GII – pontas siliconadas e GIII – discos de diamante micronizado, sendo obtida a Ra final. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e Qui-quadrado ( $\alpha=1\%$ ). **Resultados:** a média e o desvio-padrão expresso em  $\mu\text{m}$  foram: Z-250 GI - 0,16 (0,09), GII - 0,32 (0,06) e GIII - 0,06 (0,02) e para Z-350 GI - 0,06 (0,01), GII - 0,49 (0,14) e GIII - 0,07 (0,01). Para Z-250, o GIII apresentou melhor polimento, sendo, estatisticamente, diferente de GI e GII ( $p\leq 0,01$ ). Para Z-350, não houve diferença estatística entre os GI e GIII, mas eles foram superiores ao GII ( $p\leq 0,01$ ). **Conclusão:** o disco de diamante micronizado proporcionou melhores valores de lisura superficial independente do tipo de resina composta empregada.

**Palavras-chave:** Rugosidade superficial. Resinas compostas. Materiais dentários..

### Abstract

**Introduction:** finishing and polishing of composite resins (CR) can directly interfere with the roughness of these materials, being related to bacterial plaque adhesion, staining, gloss and smoothness. **Objective:** to compare the surface roughness of two CR, a micro-hybrid (Filtek Z250) and a nanoparticulate (Filtek Z350) after finishing and polishing. **Methods:** using a metal matrix, fifteen disks of each CR were made. The surface smoothness provided by the polyester tape was evaluated by a rugosimeter (Hommel Tech-T1000) obtaining initial data. Measurements were made in triplicate, and the mean roughness value (Ra) was obtained. The top surfaces of the specimens were sieved and re-obtained the Ra. The specimens were randomly distributed into three groups: GI - aluminum oxide discs; GII - silicone tips and GIII - micronized diamond discs, obtaining the final Ra. Data were analyzed by the Kruskal-Wallis test and chi-square test ( $\alpha = 1\%$ ). **Results:** the mean and standard deviation expressed in  $\mu\text{m}$  were: Z-250 GI - 0.16 (0.09), GII - 0.32 (0.06) and GIII - 0.06 (0.02) and for Z-350 GI - 0.06 (0.01), GII - 0.49 (0.14) and GIII - 0.07 (0.01). For Z-250, the GIII presented better polishing, being statistically different from GI and GII ( $p\leq 0.01$ ). For Z-350, there was no statistical difference between GI and GIII, but these were higher than GII ( $p\leq 0.01$ ). **Conclusion:** the micronized diamond disk provided better surface smoothness values independent on the type of composite resin used.

**Key words:** Surface roughness. Composite resins. Dental materials.

### INTRODUÇÃO

O avanço da odontologia adesiva e a crescente demanda por restaurações estéticas fizeram com que as resinas compostas ocupassem um lugar de destaque na clínica odontológica atual. É, cada vez mais, frequente a utilização das resinas compostas para a confecção de restaurações diretas, sejam em dentes anteriores, sejam em posteriores<sup>1,2,3</sup>. A etapa clínica de

acabamento e polimento das restaurações de resina composta é fundamental para a obtenção da estética e para uma maior longevidade, pois removem os excessos de suas superfícies, tornando-as lisas e polidas. Dessa forma, previne o acúmulo de placa bacteriana, a irritação gengival, a infiltração marginal, a cárie secundária e o manchamento<sup>1,2,4,5,6,7,8,9</sup>.

**Correspondente:** Sérgio Lima Santiago. Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem- Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado, s/n –Rodolfo Teófilo 60430-355. Fortaleza, Ceará – Brazil. Email: sergiosantiago@ufc.br

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido: 25 Out 2018; Revisado: 25 Fev 2019; 12 Mar 2019; Aceito: 14 Mar 2019

Quando a resina composta é utilizada em associação com fitas de poliéster, são obtidas restaurações mais polidas, devido a maior conversão de monômeros em polímeros na ausência do contato com oxigênio<sup>10,11</sup>. Entretanto, a inserção e a adaptação das matrizes de poliéster nem sempre são possíveis na clínica, principalmente, em áreas de difícil acesso. Dessa forma, o extravasamento de material e a presença de excessos são problemas frequentes, relacionados ao uso de matrizes, necessitando de instrumentos e técnicas que complementem o acabamento e o polimento das restaurações.

Os discos de óxido de alumínio, os discos diamantados e as pontas de silicone são, largamente, utilizados na clínica e apresentam bons resultados no acabamento e polimento de restaurações diretas de resinas compostas<sup>1,8,9,12</sup>. No entanto, a seleção dos materiais e dispositivos mais adequados está na dependência do tipo de resina composta, da localização e do tamanho da restauração.

O tamanho e o tipo das partículas de carga, o arranjo e a sua quantidade na composição das resinas compostas influenciam diretamente na obtenção de uma superfície lisa<sup>1,13</sup>. A introdução das resinas nanoparticuladas, por meio da combinação de partículas nanométricas e nanoaglomerados

em uma matriz de resina convencional, tem sido um dos mais importantes desenvolvimentos que tendem a associar-se à resistência mecânica e à lisura superficial<sup>13</sup>. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para avaliar a capacidade de acabamento e o polimento das resinas nanoparticuladas quando associadas às diferentes técnicas de acabamento e polimento.

A proposta deste estudo foi avaliar o efeito de três protocolos de acabamento e de polimento com relação ao grau de rugosidade de superfície de resinas compostas micro-híbridas e nanoparticuladas (Filtek Z250 e Filtek Z350). A hipótese nula testada foi de que não existe diferença entre os protocolos de acabamento e polimento, independentemente do tipo de resina composta.

## MÉTODOS

### Desenho experimental

Trata-se de um estudo laboratorial in vitro. Foi realizado um experimento randomizado com 5 unidades experimentais por tratamento. Os fatores examinados foram (1) dois tipos de resina composta e (2) três protocolos de acabamento e polimento (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1.** Material, composição, carga, fabricante e lote.

Material	Composição*	Carga*	Fabricante (#Lote)
Filtek® Z250	Bis-GMA, UDMA,	Zirconia, sílica	3M ESPE, Dental Products
	Bis-EMA, TEGDMA	(0.01–3.5 µm, 75% - peso)	St. Paul, MN, EUA (#9UR)
Filtek® Z350	Bis-GMA, UDMA,	Zirconia, sílica	3M ESPE, Dental Products
	Bis-EMA, TEGDMA	(5–20 nm, 78.5%- peso)	St. Paul, MN, EUA (#9YN)

Abreviações: Bis-GMA: bisphenol-A glycidil dimetacrilato; UDMA: uretano dimetacrilato; Bis-EMA: bisfenol-A etoxilado dimetacrilato; TEGDMA: trietileno glicol dimetacrilato

\*Informações fornecidas pelo fabricante.

**Tabela 2.** Métodos usados para acabamento e polimento das resinas compostas.

Grupo (n)	Sequência do protocolo de acabamento e polimento	Fabricante (#Lote)
GI (n=5)	Discos Sof-Lex®	3M do Brasil Ltda.
	Granulação média	Sumaré, SP, Brasil (#0730200075)
	Granulação fina	
	Granulação extrafina	
GII (n=5)	Kit Enhance®	Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil (#008295A)
GIII (n=5)	Kit Diamond Excel	FGM Ind. Brasileira
	Disco de granulação média	Joinville, SC, Brasil (#291008)
	Disco de granulação fina	
	Disco de granulação extrafina	
	Disco de feltro	
	Pasta diamantada	

## Preparo dos espécimes

Foram preparados 15 espécimes em forma de disco de cada resina composta na cor A3 [Filtek™ Z250 e Filtek™ Z350 (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN, EUA)], utilizando-se uma matriz metálica com um orifício central de dimensões de 5 mm de diâmetro x 2 mm de altura. A resina composta foi inserida em um único incremento e coberta com uma fita de poliéster. Uma lamínula de vidro foi pressionada sobre a fita de poliéster até que houvesse um extravasamento da resina, sendo removida posteriormente. Em seguida, a resina composta foi fotoativada com o aparelho VIP Junior (BISCO, Schaumburg, IL, EUA) por 40 segundos com intensidade de luz de 500 mW/cm<sup>2</sup>, em contato direto com a fita de poliéster. Imediatamente após a fotopolimerização, os espécimes foram removidos da matriz e armazenados em água destilada a 37°C por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram, aleatoriamente, divididos em três grupos de acordo com os protocolos de acabamento e polimento (Tabela 2).

## Testes de rugosidade de superfície

As superfícies de topo dos espécimes foram avaliadas por um rugosímetro (Hommel Tech-T1000, Schweningem, Alemanha). Esse procedimento foi realizado em triplicata, em três períodos de avaliação (teste inicial, teste pós-lixamento e teste pós-acabamento e polimento). A partir dos dados obtidos, foi determinado o valor rugosidade média (Ra) de cada grupo.

### Teste inicial

Com o objetivo de avaliar a lisura superficial de cada espécime, realizou-se um teste de rugosidade inicial referente à superfície de resina composta obtida pela utilização da fita de poliéster. As superfícies de topo dos espécimes foram lavadas com água destilada e secas com jato de ar, livre de água ou óleo. Em seguida, procedeu-se à avaliação da rugosidade superficial. Dessa forma, cada espécime foi utilizado como controle de si mesmo.

### Teste pós-lixamento

Após a avaliação da rugosidade inicial, as superfícies de topo dos espécimes foram asperizadas com uma lixa de carbeto silício de granulação 320 (3M, Sumaré, SP, Brasil) acoplada a uma politriz elétrica (Aropol 2V, Aratec, Aracruz, ES, Brasil) sob irrigação abundante, a fim de proporcionar uma superfície rugosa. Posteriormente, os espécimes foram lavados com água destilada e secos com jato de ar, livre de água ou óleo, seguindo-se as aferições da rugosidade de superfície.

### Teste pós-acabamento e polimento

Os componentes de cada protocolo de acabamento e polimento foram aplicados de acordo com a Tabela 2. Cada procedimento foi feito manualmente e em baixa rotação por 30 segundos, e os dispositivos foram descartados após sua utilização. Todos os

procedimentos de acabamento e polimento foram realizados pelo mesmo operador. Ao final das técnicas empregadas, os espécimes foram lavados com água destilada e secos com jatos de ar, livre de água ou óleo. Novamente, procedeu-se à avaliação da rugosidade das superfícies.

## Microscopia eletrônica de varredura

Após os testes de rugosidade superficial, um espécime de cada grupo foi selecionado para ser submetido à microscopia eletrônica de varredura. A escolha baseou-se nos dados anteriormente obtidos, sendo selecionados os espécimes que obtiveram os valores mais próximos da média de cada grupo. Antes de efetuar a análise, os espécimes foram recobertos com uma liga de ouro-paládio (15 nm de espessura). A topografia de superfície dos espécimes foi analisada no microscópio eletrônico de varredura (VEGA/XMU, Tescan, Brno, República Tcheca) e foram realizadas fotografias com aumentos de 500x e 1000x de áreas representativas dos corpos de prova.

## Análise Estatística

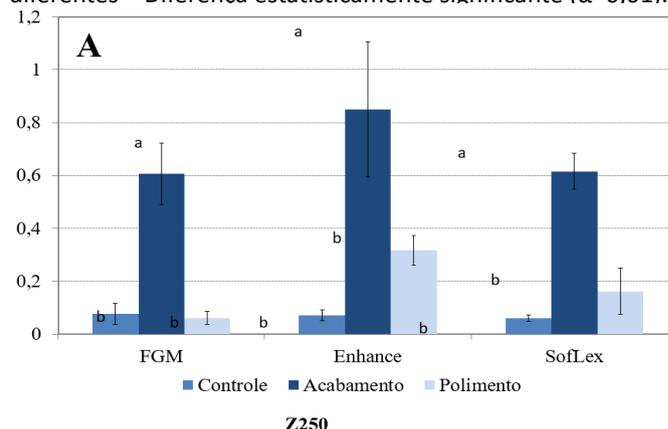
Inicialmente, foi realizado um teste de normalidade Kolmogorov – Smirnov para avaliação da distribuição dos dados. Para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste qui-quadrado de Pearson ( $\alpha = 1\%$ ). O nível de significância foi definido em  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas, usando SPSS versão 18.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, EUA).

## RESULTADOS

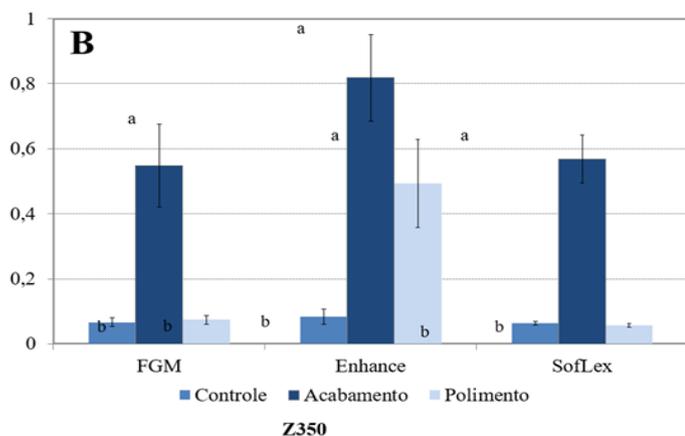
### Análise da rugosidade de superfície

As médias dos valores e das comparações estatísticas pela análise de rugosidade de superfície estão apresentadas na Figura 1. No teste inicial de rugosidade de superfície, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os dois tipos de resinas e entre as resinas compostas.

**Figura 1A.** Rugosidades superficiais da resina micro-híbrida Filtek Z250 nos três momentos de aferição. Cada coluna representa a média de valor  $\pm$  desvio padrão de  $n=5$  espécimes. GI - 0,16 (0,09), GII - 0,32 (0,06) e GIII - 0,06 (0,02). Letras diferentes = Diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=0,01$ ).



**Figura 1B.** Rugosidades superficiais da resina micro-híbrida Filtek Z350 nos três momentos de aferição. Cada coluna representa a média de valor  $\pm$  desvio-padrão de n=5 espécimes. GI - 0,06 (0,01), GII - 0,49 (0,14) e GIII - 0,07 (0,01). Letras diferentes = Diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=0,01$ ).



No teste pós-acabamento e polimento, todos os protocolos reduziram, significativamente, a rugosidade superficial independente do compósito (Filtek Z250 ou Filtek Z350), com exceção do protocolo de acabamento/polimento com pontas siliconadas aplicados em espécimes de resina composta nanoparticulada Filtek Z350.

O protocolo de acabamento e polimento com discos diamantados, associados a discos de feltro com pasta diamantada, apresentou os melhores resultados, quando aplicados na resina composta micro-híbrida Filtek Z250. Porém, quando esse protocolo foi empregado na resina nanoparticulada Filtek Z350, não houve diferença estatisticamente significativa, comparando-o com o protocolo dos discos de óxido de alumínio.

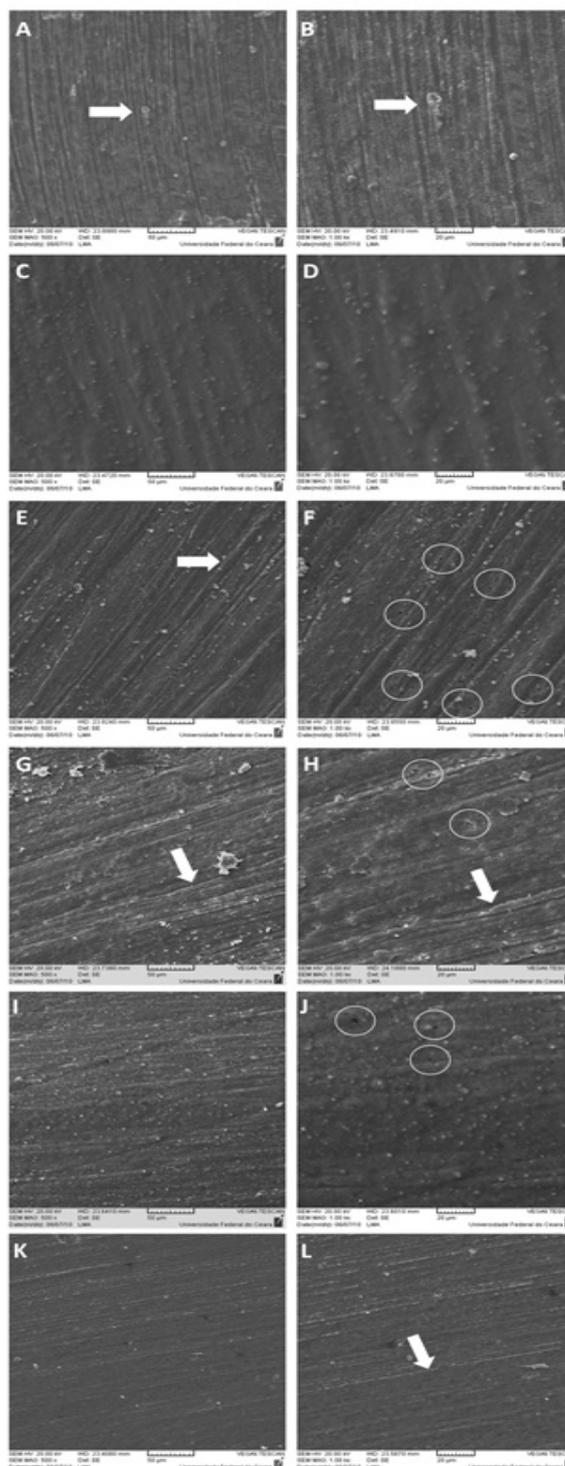
Os protocolos de acabamento com discos de óxido de alumínio e de pontas siliconadas não apresentaram diferença estatística quando aplicados na resina composta Filtek Z250, apresentando os maiores valores de rugosidade superficial. Enquanto, para a resina Filtek Z350, os maiores valores de rugosidade superficial foram obtidos na utilização do protocolo de pontas siliconadas.

#### Análise com microscópio eletrônico de varredura

Os espécimes de resina composta, Filtek Z250 e Z350, tratados com o protocolo de discos de óxido de alumínio, pontas siliconadas e discos diamantados associados à roda de feltro e pasta diamantada são apresentados nas Figuras 2.

A análise com microscópio eletrônico de varredura revelou aparências superficiais distintas entre as resinas micro-híbrida e nanoparticulada, após o uso dos discos de óxido de alumínio. No espécime de resina micro-híbrida, a superfície apresentou ranhuras, demonstrando um padrão não uniforme de desgaste superficial (Fig. 2A e 2B). Enquanto, no espécime de resina nanoparticulada, a superfície aparentava um padrão de desgaste mais uniforme (Fig. 2C e 2D).

**Figura 2.** Micrografias obtidas por MEV de superfícies de resinas compostas após a aplicação dos discos de óxido e alumínio: A e B – Resina Filtek Z250, aumento de 500 e 1000 vezes, respectivamente; C e D – Resina Filtek Z350, aumento de 500 e 1000 vezes respectivamente; pontas siliconadas: E e F – Resina Filtek Z250, aumento de 500 e 1000 vezes, respectivamente; G e H – Resina Filtek Z350, aumento de 500 e 1000 vezes respectivamente; discos diamantados: I e J – Resina Filtek Z250, aumento de 500 e 1000 vezes, respectivamente; K e L – Resina Filtek Z350, aumento de 500 e 1000 vezes respectivamente.



Os espécimes de ambas as resinas, quando analisados após o uso do protocolo com pontas siliconadas, apresentaram superfícies com características semelhantes, presenças de ranhuras e porosidades difusas (Fig. 2E, 2F, 2G, 2H).

O uso do protocolo com discos diamantados associados a rodas de feltro e pasta diamantada produziram superfícies com padrões diferentes. No espécime de resina micro-híbrida, observou-se a presença de algumas porosidades (Fig. 2I e 2J); enquanto, no espécime de resina nanoparticulada, observaram-se ranhuras discretas (Fig. 2Ke 2L).

## DISCUSSÃO

As etapas de acabamento e polimento se apresentam como essenciais para um sucesso clínico e estético, pois têm como objetivo aumentar a lisura superficial, o refinamento e o brilho que levam a uma maior reflexão de luz e, conseqüentemente, a uma aparência mais natural. Resíduos de superfícies ásperas ou margens inadequadamente acabadas aceleram o acúmulo de placa, aumentando, conseqüentemente, o risco de irritação gengival, manchamento da restauração e cárie secundária. Dessa forma, a longevidade e a aparência estética das restaurações de resina composta dependem, grandemente, da qualidade das técnicas do acabamento e polimento nelas empregadas<sup>1,2</sup>. Tendo em vista tais características, é de suma importância a escolha da técnica de acabamento e polimento mais adequada para cada tipo de resina.

No presente estudo, utilizamos a fita de poliéster como referência inicial para lisura superficial, pois o uso da fita de poliéster proporciona a melhor lisura superficial associado a restaurações diretas de resina composta<sup>14</sup>. Ao utilizar a fita matriz em contato direto com resina composta, há uma maior conversão de monômeros resinosos em polímeros, pela ausência do oxigênio sob a superfície da resina<sup>15,16</sup>. Entretanto, essa camada rica em polímeros é removida, clinicamente, com os sistemas de acabamento e polimento, mas esse procedimento cria rugosidades na superfície da resina que variam de intensidade de acordo com o sistema de acabamento e polimento e o tipo de resina utilizada<sup>17,18, 19, 20</sup>.

Sendo assim, o sistema de acabamento e polimento deve apresentar a lisura superficial próxima àquela obtida quando do emprego das fitas de poliéster<sup>14</sup>. No estudo de Senawongse e Pongprueksa (2007), não houve diferença estatística quanto à rugosidade de superfície entre resinas micro-híbridas e nanoparticuladas quando aplicadas diretamente sob a tira matriz<sup>21</sup>.

Esse dado é corroborado pelo presente estudo, no qual não houve diferença estatística entre as superfícies analisadas nos testes iniciais de rugosidade para as resinas empregadas. Entretanto, nos trabalhos conduzidos por Attar et al (2007), Botta et al (2008), Moraes et al (2008), houve diferença estatística na rugosidade entre as resinas micro-híbridas e nanoparticuladas sob a matriz de poliéster<sup>1,22,23</sup>. Vale salientar que essas divergências podem ser atribuídas à diferença na

composição das resinas em estudo e no tipo de metodologia de análise empregada para a avaliação da rugosidade superficial.

O estudo de Senawongse e Pongprueksa<sup>21</sup> relata que, no polimento da resina micro-híbrida FilteZ Z250, o disco de óxido de alumínio apresentou uma rugosidade superficial maior do que as pontas siliconadas; entretanto, quando utilizados para o polimento da resina micro-híbrida Filtek Z350, não houve diferença estatística entre os dois sistemas. A capacidade dos discos impregnados com óxido de alumínio de produzir superfícies lisas é decorrente da sua habilidade de remover igualmente partículas de carga e matriz orgânica<sup>24</sup>. Entretanto, nem sempre é possível usar esses discos devido ao formato anatômico e à dificuldade de acesso de algumas restaurações, principalmente, na região posterior<sup>25,26</sup>. No presente estudo, as pontas siliconadas apresentaram um desempenho insatisfatório quando empregadas com resinas nanoparticuladas. De acordo com Yap et al (1997), as pontas siliconadas de acabamento e polimento desgastam apenas a matriz resinosa, contornando as superfícies proeminentes, promovendo um aumento significativo na rugosidade de superfície<sup>15</sup>.

Da mesma forma que o presente estudo, Scheibe et al (2009) comprovaram que os discos diamantados associados aos discos de feltro com pasta diamantada apresentaram superfícies mais lisas quando comparados com o sistema de discos de óxido de alumínio e de pontas siliconadas para resina Filtek Z250<sup>9</sup>. De acordo com Ergücü e Türkün (2007) e Korkmaz et al (2008), a flexibilidade do material, a dureza do agente abrasivo, a conformação do instrumento, a velocidade e a forma como ele é utilizado são fatores que influenciam, diretamente, na obtenção de uma melhor lisura superficial<sup>17, 25</sup>.

A lisura superficial das resinas micro-híbridas está relacionada ao reduzido tamanho de partículas (de 0,01 a 3,50 µm, com tamanho médio de 0,6 µm) e ao seu arranjo na matriz resinosa. Já as resinas nanoparticuladas, apesar de possuírem partículas de tamanhos menores, (de 5 a 20 nm), assemelham-se às resinas micro-híbridas, devido à aglomeração de suas partículas<sup>1</sup>. Esse fator não foi observado no presente estudo para os grupos que empregaram os sistemas de acabamento/polimento com as pontas siliconadas e discos de óxido de alumínio, pois houve diferença estatística entre as resinas nanoparticuladas e as micro-híbridas. Provavelmente, o tamanho e o arranjo das partículas desempenhem um papel importante na obtenção de uma lisura superficial satisfatória.

De acordo com Bollen et al (1997), não há diferença significativa no acúmulo de placa quando os valores de rugosidade são inferiores a 0,2 µm e que, a partir desse valor, aumenta o risco de cárie e inflamação gengival<sup>27</sup>. Nesse estudo, os sistemas Sof-Lex e Diamond Excel atingiram valores abaixo desse índice, tanto para a Filtek Z250, quanto para a Filtek Z350, comprovando a eficiência clínica desses dispositivos.

De acordo com os resultados analisados, observou-se que a hipótese nula foi rejeitada, pois houve diferença estatisticamente significativa entre os protocolos de acabamento e o polimento

em ambas as resinas (micro-híbrida e nanoparticulada). Dessa forma, novos estudos devem ser realizados no sentido de verificar “in situ” a influência da formação de placa, microinfiltração e cárie secundária com os diferentes protocolos de acabamento e polimento de restaurações.

## CONCLUSÃO

Os sistemas de acabamento e polimento produziram resultados diferentes entre si quando aplicados em resinas micro-híbridas e nanoparticuladas, sendo influenciados pelas diferenças nas propriedades físicas de seus constituintes.

## REFERÊNCIAS

- Attar, N. The effect of finishing and polishing procedures on the surface roughness of composite resin materials. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2007 Jan [acesso 2018 Out 25]; 8(1): 27-35. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17211502>.
- Ribeiro BCI, Oda M, Matson E. Avaliação da rugosidade superficial de três resinas compostas submetidas a diferentes técnicas de polimento. *Pesqui Odontol Bras* [Internet]. 2001 Jul-Set [acesso 2018 Out 25] 15(3): 252-256. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pob/v15n3/a12v15n3.pdf><http://www.scielo.br/pdf/pob/v15n3/a12v15n3.pdf>.
- Mendonça JS, Neto RG, Santiago SL, Lauris JRO, Navarro MFL, Carvalho RM. Direct resin composite restorations versus indirect composite inlays: one-year results. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2010 May [acesso 2018 Out 24] 11(3): 025-032. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20461321>.
- Michelon C, Hwas A, Borges MF, Marchiori JC, Susin AH. Restaurações diretas de resina composta em dentes posteriores – considerações atuais e aplicação clínica. *RFO* [internet]. 2009 Set-Dez [acesso 2018 Out 25]; 14(3): 256-261. Disponível em: <http://seer.upf.br/index.php/rfo/article/view/797>. doi: <https://doi.org/10.5335/rfo.v14i3.797>.
- Quin GD. On edge chipping testing and some personal perspectives on the state of the art of mechanical testing. *Dent Mater* [internet]. 2015 Jan [acesso 2018 Out 24]; 31(1): 26-36. Disponível em: [https://www.demajournal.com/article/S0109-5641\(14\)00587-9/fulltext](https://www.demajournal.com/article/S0109-5641(14)00587-9/fulltext). doi: 10.1016/j.dental.2014.08.378.
- Barbosa SH, Zanata RL, Navarro MFL, Nunes OB. Effect of different finishing and polishing techniques on the surface roughness of microfilled, hybrid and packable composite resins. *Braz Dent J* [Internet]. 2005 Abr [acesso 2018 Out 20]; 16(1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113932>.
- Ergücü Z, Türkün LS. Surface roughness of novel resin composites polished with one-step systems. *Oper Dent* [Internet]. 2007 Mar-Abr [Acesso 2018 Out 10]; 32(2): 185-192. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17427829>.
- Sarac D, Sarac YS, Kulunk S, Ural C, Kulunk T. The effect of polishing techniques on the surface roughness and color change of composite resins. *J Prosthet Dent* [internet]. 2006 Jul [acesso 2018 Set 2]; 96(1): 33-40. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872928>.
- Scheibe KG, Almeida KGB, Medeiros IS, Costa JF, Alves CMC. Effect of different polishing systems on the surface roughness of microhybrid composites. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2009 Jan-Fev [acesso 2018 Out 2]; 17(1): 21-26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872928>.
- Nagem Filho H, D'azevedo MTF, Nagem HD, Marsola FP. Surface roughness of composite resins after finishing and polishing. *Braz Dent J* [Internet]. 2003 Jun [acesso 2018 Out 24]; 14(1): 37-41. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-64402003000100007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402003000100007).
- Roeder LB, Powers JM. Surface roughness of resin composite prepared by single-use and multi-use diamonds. *Am J Dent* [Internet]. 2004 Abr [acesso 2018 Out 20]; 17(2):109–112. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/15151337>.
- Jung M, Sehr K, Klimek J. Surface texture of four nanofilled and one hybrid composite after finishing. *Oper Dent* [Internet]. 2007 Jan-Fev [acesso 2018 Out 24]; 32(1):45-52. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288328>.
- Costa GFA, Fernandes ACBCJ, Carvalho LAO, Andrade AC, Assunção IV, Borges BCD. Effect of additional polishing methods on the physical surface properties of different nanocomposites: SEM and AFM study. *Microsc Res Tech* [internet]. 2018 Dez [acesso 2018 Out 24]; 81(12): 1467-73. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30303582>.
- Topcu FT, Erdemir U, Sahinkesen G, Yildiz E, Uslan I, Acikel C. Evaluation of microhardness, surface roughness, and wear behavior of different types of resin composites polymerized with two different light sources. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* [Internet]. 2010 Fev [acessado 2018 Out 23]; 92(2): 470-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19957350>.
- Yap AU, Lye KW, Sau CW. Surface characteristics of tooth-colored restoratives polished utilizing different polishing systems. *Oper Dent* [internet]. 1997 Nov-Dez [acesso 2018 Out 25]; 22(6): 260–5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610323>.
- Ruyter IE. Unpolymerized surface layers on sealants. *Acta Odontol Scand* [internet]. 1981 [acesso 2018 Out 24] 39(1): 27-32. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6943906>.
- Kaplan BA, Goldstein GR, Vijayaraghavan TV, Nelson IK. The effect of three polishing systems on the surface roughness of four hybrid composites: a profilometric and scanning electronmicroscopy study. *J Prosthet Dent* [internet]. 1996 Jul [acesso 2018 Set 04]; 76(1):34–8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8814632>.
- Lutz F, Setcos JC, Phillips RW. New finishing instruments for composite resins. *J Am Dent Assoc* [internet]. 1983 Out [acesso 2018 Out 23]; 107(4): 575–80. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6579090>.
- Chung KH. Effects of finishing and polishing procedures on the surface texture of resin composites. *Dent Mater* [internet]. 1994 Set [acesso 2018 Out 20]; 10(5): 325–30. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498594>.
- Ferreira PM, Souto SHA, Borges BCD, Assunção IV, Costa GFA. Impact of a novel polishing method on the surface roughness and micromorphology of nanofilled and microhybrid composite resins. *Rev. Port. Estomatol Med. Dent. e Cir. Maxilofac* [internet]. 2015 Jan-Mar [acesso 2018 Out 24]; 56(1): 18–24. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1646289015000059>.
- Senawongse P, Pongprueksa P. Surface roughness of nanofill and nanohybrid resin composites after polishing and brushing. *J Esthet Restor Dent* [internet]. 2007 [acesso 2018 Out 24]; 19(5): 265–275. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17877626>.
- Botta AC, Duarte SJ, Paulin Filho PI, Gheno SM. Effect of dental finishing instruments on the surface roughness of composite resins as elucidated by atomic force microscopy. *Microsc Microanal* [internet] 2008 Out [acesso 2018 Ago 20]; 14(5): 380–386. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18793482>
- Moraes RR, Gonçalves LS, Lancellotti AC, Consani S, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MA. Nanohybrid resin composites: nanofiller loaded materials or

traditional microhybrid resins? Oper dent [internet] 2009 Set-Out [acesso 2018 Out 20]; 34(5): 551-557. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19830969>.

24. Özgünlaltay G, Yazici AR, Görücü J. Effect of finishing and polishing procedures on the surface roughness of new tooth-colored restoratives. J Oral Rehabil [internet]. 2003 Fev [acesso 2018 Out 25]; 30(2): 218-24. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535151>.

25. Korkmaz Y, Ozel E, Attar N, Aksoy G. The influence of one-step polishing systems on the surface roughness and microhardness of nanocomposites. Oper Dent [internet]. 2008 Jan-Fev [acesso 2018 Out 19]; 33(1): 44-50. Disponível

em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18335732>.

26. Hoelscher DC, Neme AML, Pink FE, Hughes PJ. The effect of three finishing systems on four esthetic restorative materials. Oper Dent [internet]. 1998 Jan-Fev [acesso 2018 Out 23]; 23(1): 36-42. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610331>.

27. Bollen CML, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. Dent Mater [internet]. 1997 Jul [acesso 2018 Out 25]; 13(4): 258-269. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696906>.

**Como citar este artigo/How to cite this article:**

Lira RQN, Lemos MVS, Mendes TAD, Neri JR, Mendonça JS, Santiago SL. Avaliação do efeito de técnicas de acabamento e polimento na rugosidade superficial de resinas compostas. J Health Biol Sci. 2019 Abr-Jun; 7(2): 197-203.

# Diagnóstico e tratamento de lesões não cariosas: a visão do cirurgião-dentista do sistema público de saúde

## Diagnosis and treatment of non-cariou lesions: the vision of the dentist of the public health system

Vanessa Savastano de Cerqueira Rêgo Ribeiro<sup>1</sup> , Emanuel Lima de Almeida<sup>1</sup> , Isabelly de Carvalho Leal<sup>2</sup> , Davi Oliveira Bizerril<sup>3</sup> , Maria Vieira de Lima Saintrain<sup>3</sup> , Regina Glaucia Lucena Aguiar Ferreira<sup>4</sup> , Vanara Florêncio Passos<sup>5,6</sup> 

1. Graduado(a) em Odontologia, Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, CE, Brasil. 2. Mestranda em Odontologia pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 3. Docente do Curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), Fortaleza, CE, Brasil. 4. Docente do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 5. Docente do Curso de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil. 6. Docente do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

### Resumo

**Introdução:** as lesões dentárias não cariosas apresentam etiologia multifatorial e, caracterizam-se por ocasionar desgastes irreversíveis na estrutura dentária, sem envolvimento de microrganismos, podendo ser diagnosticadas como erosão (de origem intrínseca ou extrínseca), abfração, atrição ou abrasão. **Objetivo:** analisar o conhecimento de cirurgiões-dentistas a respeito do diagnóstico e do tratamento dos diferentes tipos de lesões dentárias não cariosas. **Métodos:** realizou-se estudo observacional, descritivo, de natureza quantitativa, utilizando-se, como instrumento de coleta de informações, um questionário semiestruturado aplicado em cirurgiões-dentistas do município de Fortaleza-CE. Os resultados foram analisados de forma descritiva e foi utilizado o teste de Qui-Quadrado com nível de significância de 5%. **Resultados:** verificaram-se, entre os cirurgiões-dentistas, os seguintes percentuais de acerto referentes às lesões de abfração, abrasão, atrição, erosão de origem extrínseca, erosão de origem intrínseca e erosão de origem extrínseca associada à abrasão, respectivamente: 51,97%, 20,60%, 78,43%, 81,37%, 71,57% e 7,84%. Observou-se, também, associação estatisticamente significativa positiva entre o conhecimento dos profissionais a respeito de lesões de abfração e atrição e o tempo de formado. **Conclusão:** embora grande parte dos profissionais tenham sido capazes de identificar um plano de tratamento adequado para os casos propostos em questão, o diagnóstico das lesões não cariosas não foi preciso, exceto quando se tratou de erosão de origem intrínseca ou extrínseca e atrição que obtiveram percentual de acertos acima de 70%.

**Palavras-chave:** Abrasão Dentária. Erosão Dentária. Atrito Dentário.

### Abstract

**Introduction:** non-cariou dental lesions present multifatorial etiology, and are characterized by irreversible wear on the tooth structure, without the involvement of microorganisms, and can be diagnosed as erosion (intrinsic or extrinsic), abfraction, attrition or abrasion. **Objective:** to analyze the knowledge of dental surgeons regarding the diagnosis and treatment of different types of non-cariou dental lesions. **Methods:** a quantitative, observational, descriptive study was carried out using a semistructured questionnaire as a tool for collecting information applied to dentists in the city of Fortaleza-CE. The results were analyzed in a descriptive way and the chi-square test with significance level of 5% was used. **Results:** the following percentages were found for abfraction, abrasion, attrition, extrinsic erosion, intrinsic erosion, and extrinsic erosion associated with abrasion, respectively: 51.97%, 20.60%, 78.43%, 81.37%, 71.57% and 7.84%. It was also observed a statistically significant positive association between the professionals' knowledge regarding abfraction and attrition lesions and the time of formation. **Conclusion:** although many professionals were able to choose an adequate treatment plan for the proposed cases, the diagnosis of non-cariou lesions was not precise, except for intrinsic or extrinsic erosion, and attrition that obtained a percentage of right answers above 70%.

**Key words:** Tooth Abrasion. Tooth Erosion. Tooth Attrition.

### INTRODUÇÃO

As lesões cervicais não cariosas (LCNCs) são caracterizadas pela perda gradual de tecido mineralizado na região cervical do dente, de origem multifatorial, sem o envolvimento de bactérias<sup>1</sup>. Por envolverem fenômenos fisiológicos e patológicos, sua formação e progressão são de difícil diagnóstico<sup>2,3</sup>. De acordo com a sua forma, características peculiares e origem, essas lesões são classificadas em erosão por origem intrínseca ou extrínseca, abfração, atrição ou abrasão, bem como interações entre essas formas<sup>2,4</sup>.

Na erosão, o desgaste da estrutura dentária ocorre por meio da ação de ácidos, de origem não bacteriana, sendo, frequentemente, associada ao estilo de vida, à mudança de hábitos e à dieta<sup>5,6</sup>. O termo "biocorrosão" tem sido utilizado para indicar lesões por erosão, as quais decorrem da ação de ácidos exógenos ou de ação bioquímica endógena, oriunda de enzimas proteolíticas e também de efeitos piezoelétricos sobre a matriz orgânica da dentina<sup>3</sup>.

**Correspondente:** Dra. Vanara Florêncio Passos. Rua Monsenhor Furtado s/n, CEP 60430-350Fortaleza, CE Brasil. E-mail: vanarapassos@hotmail.com

**Conflito de interesse:** Não há conflito de interesse por parte de qualquer um dos autores.

Recebido 13Set 2019; Revisado: 5 Mar 2019; 19 Mar 2019; Aceito: 20 Mar 2019

A abfração é a perda de estrutura dental que acomete a região cervical dos dentes, causada pelo excesso de forças sobre a essa região<sup>7,8,9</sup>, enquanto, na atrição, a perda dental é ocasionada pelo contato interdental, devido a fatores funcionais ou parafuncionais, sendo observada, sobretudo, nas faces oclusais e incisais dos dentes<sup>10</sup>. Por outro lado, a perda de estrutura dental ocasionada pela ação mecânica excessiva proveniente de objetos ou substâncias externas denomina-se abrasão<sup>2</sup>.

Considerando a combinação de efeitos dos fatores etiológicos, o desgaste dentário pode contribuir para outros desconfortos ou alterações clínicas, como a hipersensibilidade dentinária e a recessão gengival, sendo importante a detecção precoce dessas lesões, haja vista que sua progressão é diretamente proporcional à idade do paciente<sup>11,12</sup>.

Entretanto, existem discordâncias entre os cirurgiões-dentistas quando se trata do diagnóstico e do tratamento de lesões não cariosas<sup>13,14</sup>, o que sugere a existência de lacunas de conhecimento relativas a essa temática. A falta de um diagnóstico preciso prejudica o tratamento, daí a necessidade de se utilizarem meios clínicos e diferenciados de diagnóstico, para uma correta conduta terapêutica. Assim, acredita-se na necessidade de pesquisas que descrevam e analisem o conhecimento dos cirurgiões-dentistas sobre o assunto, bem como no entendimento de fatores que possam influenciar em suas condutas. Dessa forma, realizou-se o presente estudo, cujo objetivo foi analisar o conhecimento dos cirurgiões-dentistas (CD) da Estratégia Saúde da Família do município de Fortaleza (CE) sobre o diagnóstico e o tratamento de lesões dentárias não cariosas.

## MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, de natureza quantitativa, junto aos cirurgiões-dentistas (CD) inseridos na Estratégia Saúde da Família da cidade de Fortaleza, capital do Estado do Ceará, abrangendo todas as unidades das seis Secretarias Regionais de Saúde do município.

### Participantes

O protocolo de estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Fortaleza, mediante o Parecer Nº. 1.242.508. Após aprovação, deu-se início ao projeto, utilizando-se um questionário semiestruturado para a coleta das variáveis sociodemográficas e daquelas relacionadas ao conhecimento do profissional a respeito do diagnóstico de lesões não cariosas e conduta terapêutica. Os dados foram coletados nos meses de janeiro a junho do ano de 2016.

A população de estudo foi composta por cirurgiões-dentistas que aceitaram participar da pesquisa, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídos do estudo os CDs que se encontravam afastados da unidade de saúde, por estarem em férias ou licença. O estudo trabalhou com uma amostra de conveniência, totalizando 102 cirurgiões-dentistas.

### Instrumento de Avaliação

O questionário utilizado foi dividido em três partes: perfil do profissional (gênero, idade, instituição de graduação, ano de formação, realização de pós-graduação, setor de trabalho (público ou também privado); conhecimento sobre o diagnóstico das lesões não cariosas (cinco situações problemas devidamente ilustradas com figuras representativas de diferentes tipos de lesões não cariosas (figura 1); e de conhecimento sobre o tratamento das lesões). Ao final do instrumento, verificou-se o grau de dificuldade que cada profissional apresentava quanto ao diagnóstico das diferentes lesões. Esse instrumento foi desenvolvido pelos pesquisadores, seguindo critérios de qualidade de um questionário<sup>15</sup>, tendo sido submetido a um pré-teste com cinco voluntários não envolvidos no estudo, para verificar possíveis dificuldades a serem observadas durante sua aplicação.

**Figura 1.** Exemplo de imagem e questionamento utilizados no instrumento de avaliação.



Fonte: Passos et al. (2013)<sup>18</sup>

Diante da imagem, sabendo que o paciente apresenta alta ingestão de limão e também apresentando o hábito de roer unhas, indaga-se: quais as prováveis causas do desgaste dentário?

### Análise estatística

Os dados foram tabulados e analisados com auxílio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), por meio de frequências absolutas e relativas. A análise de cada um dos fatores independentes foi realizada utilizando-se o Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS

Participaram da pesquisa 102 cirurgiões-dentistas da Estratégia Saúde da Família da cidade de Fortaleza. A idade média dos participantes foi de 41,27 anos, sendo a idade mínima 24 e a máxima 67 anos. O ano de formação variou de 1972 a 2014, sendo a moda de conclusão da graduação o ano de 2000.

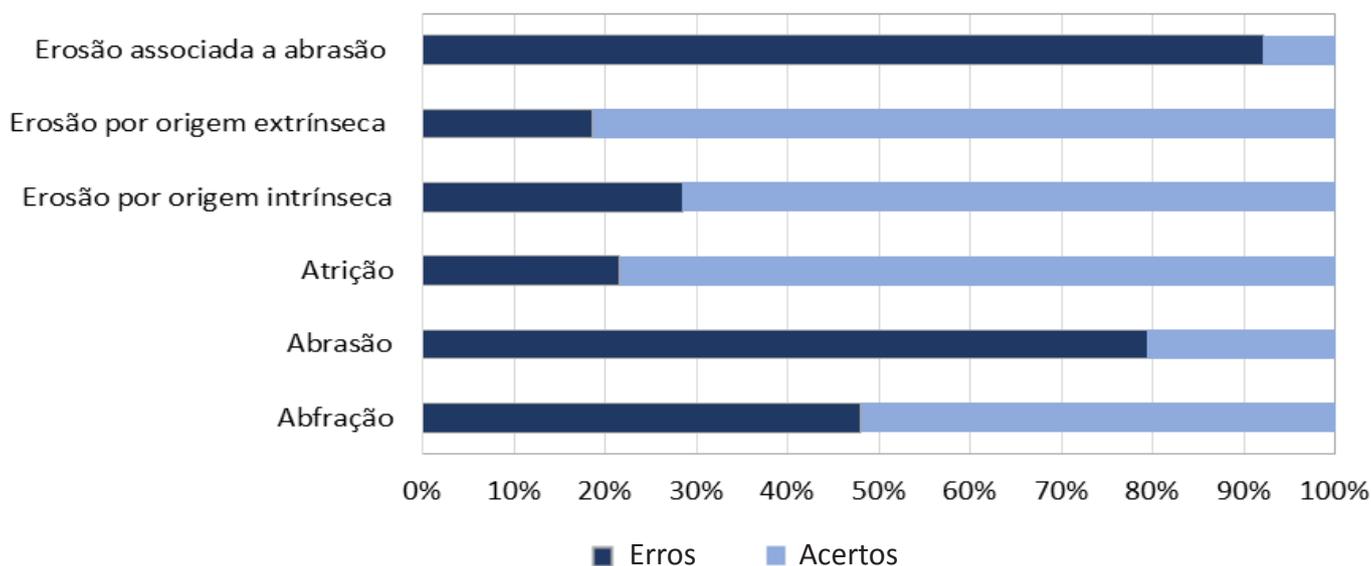
A maioria dos profissionais era do sexo feminino (67,64%) e graduados em universidade pública (66,66%). Entre os entrevistados, 53 (52%) haviam cursado a pós-graduação em qualquer nível, 34 (33%) dois, sete (7%) três e um (1%) quatro cursos. Apenas sete (7%) profissionais não eram pós-graduados. A pós-graduação de maior prevalência foi em Saúde Coletiva. Entre os que possuíam dois cursos de pós-graduação, prevaleceu o agregado entre saúde coletiva/prótese, seguido de saúde coletiva/ortodontia.

Observou-se, também, que, entre os respondentes, 44,1% atuavam, exclusivamente, no serviço público, e 55,9% trabalham

tanto no setor público, como no setor privado. Com relação ao nível de dificuldade dos profissionais no tocante ao diagnóstico/tratamento das lesões não cariosas, 38,23% relataram não ter dificuldade para detecção das lesões não cariosas, enquanto 61,76% mencionaram dificuldades.

A figura 2 demonstra a porcentagem de acertos e erros cometidos pelos cirurgiões-dentistas do Programa de Saúde da Família, no tocante ao diagnóstico/tratamento de lesões não cariosas. Consta-se considerável dificuldade no diagnóstico das lesões de abração e erosão (82,3%) e abração isoladamente (79,4%).

**Figura 2.** Distribuição de erros e acertos de cirurgiões-dentistas da Atenção Básica quanto ao diagnóstico de lesões não cariosas. Fortaleza (CE), 2016.



Quanto ao nível de dificuldade no diagnóstico de lesões não cariosas, os participantes reportaram notas de 0 (mínima dificuldade) a 10 (máxima dificuldade). Dessa forma, verificou-se que a maioria (34,92%) relatou ter tido nível de dificuldade mediano (5), seguido de nível 7 (19,04%).

Utilizando, como corte, a porcentagem de acertos a partir de 70%, constatou-se que não houve associação entre o conhecimento dos participantes e as seguintes variáveis: gênero, idade e pós-graduação. Verificou-se uma associação, estatisticamente, significativa entre o diagnóstico de abração e atrição e a variável ano de formação, ou seja, quanto mais recente o ano de formação, maior o número de acertos (tabela 1).

A tabela 2 refere-se à associação significativa entre gênero, ano de formação e à autoavaliação quanto à dificuldade de diagnóstico e ao tratamento das lesões, ou seja, mulheres consideraram ter maior dificuldade quanto ao diagnóstico e tratamento, bem como os formados no período entre 1972 a 1982 e 1994 a 2014.

Além da análise do diagnóstico de lesões não cariosas, analisou-

se o conhecimento dos cirurgiões-dentistas quanto a opções de tratamento dessas lesões. Um dos itens de escolha quanto ao tratamento presente no questionário é a eliminação da causa. Dessa forma, hábitos ou distúrbios causadores de cada lesão devem ser o alvo do tratamento, uma vez que a não eliminação da origem do problema não permitirá a solução da progressão do desgaste dentário. Portanto, o cirurgião-dentista deve fazer um diagnóstico apropriado da causa do desgaste, e, conseqüentemente, educar o paciente quanto aos fatores que o deixam mais propensos a perda de estrutura dentária, objetivando mudanças de hábitos, ajuda médica especializada, conscientização quanto sua alimentação, entre outras necessidades, dependendo de cada tipo de lesão não cariada observada. No que concerne à abração, verificou-se que o principal item de escolha como tratamento proposto foi o procedimento restaurador, o qual foi selecionado por 55 (53,92%) dos profissionais entrevistados. Entretanto, desses 55 profissionais que fizeram a opção por esse item, 7 (12,73%) deles também relataram a necessidade do ajuste oclusal; 6 (10,91%) associaram ainda a remoção da causa com a realização do procedimento restaurador; apenas 2 (3,64%) associaram o ajuste oclusal com o procedimento restaurador e remoção da causa.

**Tabela 1** Avaliação da associação entre gênero, pós-graduação e tempo de formação, em relação ao diagnóstico (abfração, abrasão, atrição, erosão de origem extrínseca, erosão de origem intrínseca e erosão associada à abrasão e) de lesões não cariosas.

Variáveis		Abfração				Abrasão				Atrição				Erosão de origem extrínseca				Erosão de origem intrínseca				Erosão associada à abrasão			
		Acertos		Erros		Acertos		Erros		Acertos		Erros		Acertos		Erros		Acertos		Erros		Acertos		ERROS	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Gênero	Masculino	19	18,63	14	13,72	8	7,85	25	24,50	24	23,53	9	8,82	27	26,47	6	5,88	24	23,53	9	8,83	1	0,98	32	31,37
	Feminino	34	33,34	35	34,31	13	12,75	56	54,90	56	54,90	13	12,75	56	54,9	13	12,75	49	48,04	20	19,60	7	6,86	62	60,79
	$\chi^2$	0,61				0,39				0,93				0,006				0,032				1,56			
	p	0,43				0,52				0,37				0,936				0,85				0,21			
Pós-graduação	SIM	50	49,02	44	43,14	18	16,75	76	74,50	76	74,51	18	17,65	76	74,51	18	17,65	69	67,65	25	24,51	8	7,84	86	84,32
	NÃO	3	2,94	5	4,9	3	2,95	5	4,9	4	3,92	4	3,92	7	6,86	1	0,98	4	3,92	4	3,92	0	-	8	7,84
	$\chi^2$	0,72				1,51				4,14				0,215				1,98				0,73			
	p	0,39				0,21				0,42				0,64				0,15				0,39			
Ano de Formação	1972-1982	3	2,94	14	13,73	1	0,98	16	15,69	9	8,82	8	7,85	13	12,75	4	3,92	9	8,82	8	7,85	1	0,98	16	15,69
	1983-1993	6	5,88	9	8,82	3	2,94	12	11,76	12	11,76	3	2,94	11	10,78	4	3,92	9	8,82	6	5,88	1	0,98	14	13,74
	1994-2004	30	29,41	21	20,60	12	11,76	39	38,24	43	42,15	8	7,85	43	42,15	8	7,85	39	38,24	12	11,76	4	3,92	47	46,08
	2005-2014	14	13,72	5	4,9	5	4,90	14	13,73	16	15,69	3	2,94	16	15,69	3	2,94	16	15,69	3	2,94	2	1,97	17	16,66
	$\chi^2$	13,43				2,83				7,92				1,301				5,98				0,308			
	p	0,004				0,24				0,047				0,72				0,113				0,958			

**Tabela 2.** Associação entre gênero, ano de formação em relação à autoavaliação quanto ao nível de dificuldade de diagnosticar e de tratar as lesões.

Variáveis		Dificuldade		$\chi^2$	p
		Sim	Não		
Gênero	Masculino	14	19	7,72	0,005
	Feminino	49	20		
Ano de Formação	1972-1982	12	5	6,15	0,046
	1983-1993	5	10		
	1994-2004	32	19		
	2005-2014	14	5		

Ao se avaliar o tipo de tratamento realizado para erosão de origem intrínseca, obteve-se, como maior índice de resposta, a necessidade da eliminação da causa, correspondendo a 90 (88,24%) profissionais. No caso de erosão por origem intrínseca, o tratamento pode compreender a educação do paciente quanto à causa e ao encaminhamento a médicos especialistas para controle do contato das estruturas dentárias com ácido endógeno. Além da remoção da causa, 11 (12,22%) acharam prudente, também, realizar procedimento restaurador.

Assim como o tratamento proposto para a erosão de origem intrínseca, quando se apresentou aos cirurgiões-dentistas a questão sobre abrasão e erosão de origem extrínseca, 90 (88,24%) profissionais também indicaram a eliminação da causa (educação quanto a hábitos deletérios, evitar colocar de objetos na boca, orientação quanto a fatores relacionados à escovação que podem ocasionar desgastes cervicais) como principal escolha de tratamento para o paciente, entre eles 17 (18,89%) associaram a terapia restauradora estética à eliminação da causa. Analisando-se apenas o caso clínico de lesão do tipo abrasão, verificou-se que 90 (88,24%) profissionais definiram como melhor tratamento a eliminação da origem do problema; destes 20 (22,22%) associaram o procedimento restaurador estético à eliminação da causa.

Quanto ao caso de atrição, 70 (68,63%) profissionais indicaram, como tratamento ideal, a confecção de uma placa miorreaxante. A associação entre eliminação da causa (cirurgião-dentista deve diagnosticar a origem do distúrbio, que pode ser apenas odontológica ou associada com fatores além da odontologia que necessitam de encaminhamento para outras especialidades), procedimento restaurador estético e confecção de placa miorreaxante foi referida por seis (5,88%) profissionais; cinco (4,90%) participantes optaram pela associação entre eliminação da causa e a confecção da placa miorreaxante como a melhor forma de tratamento; e quatro (3,92%) profissionais indicaram como proposta de tratamento procedimento restaurador estético e placa miorreaxante.

Sobre a análise da situação abordando erosão de origem extrínseca, observou-se que 85 (83,33%) profissionais indicaram a eliminação da causa como a principal opção de tratamento; desses 15 (17,65%) associaram procedimento restaurador estético e eliminação da causa da lesão. Verificou-se, também, que apenas dois (1,96%) profissionais indicaram todas as propostas de tratamento descritas no questionário.

## DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com os profissionais inseridos na Estratégia Saúde da Família da cidade de Fortaleza, do estado do Ceará considerando que a Atenção Básica é a porta de entrada para o serviço de saúde. Dessa forma, a Atenção Básica é caracterizada por ter um grande volume populacional assistido por suas áreas de abrangência; assim, este estudo foi realizado na intenção de contribuir para a melhoria das condições de saúde bucal da população restrita aos territórios,

a partir do diagnóstico precoce e prevenção dessas lesões dentárias.

O maior índice de acerto foi referente ao diagnóstico de lesão erosiva de origem extrínseca (81,37%), indo ao encontro dos resultados obtidos por Santos-Daroz, (2007)<sup>13</sup>, provavelmente, pelo fato de esse tipo de lesão ter como característica clínica principal, o desgaste na face vestibular, sobretudo de elementos dentais anteriores, associado aos hábitos alimentares inadequados. No que concerne à erosão de origem intrínseca, o percentual de diagnósticos corretos foi considerado aceitável, correspondendo a 71,57%, sendo a principal terapia de escolha citada a eliminação da causa e do procedimento restaurador. O desgaste dentário é um processo irreversível, logo essa condição deve ser identificada por um profissional de saúde, determinando o principal fator etiológico, objetivando eliminá-lo, bem como realizar o monitoramento do paciente e, se necessário, realizar intervenções preventivas e restauradoras<sup>16</sup>. Desse modo, os casos clínicos apresentados para erosão de diferentes origens tinham, no enunciado, fatores esclarecedores do diagnóstico, usando, como exemplo, para o caso de erosão de origem extrínseca a ingestão em excesso de alimentos e/ou bebidas que possuíam baixo pH.

A segunda lesão com maior número de assertivas foi a atrição, apresentando 78,43% de diagnósticos corretos. Provavelmente, o elevado percentual de acertos relativos a este tipo de lesão, justifica-se pela situação clínica apresentar elevado desgaste das superfícies incisais de todos os dentes anteriores, sendo bastante esclarecedor para o diagnóstico.

A lesão de abrasão associada à erosão de origem extrínseca (Figura 2) obteve menor índice de acertos (7,84%). Esse elevado índice de erro, em comparação com as outras lesões já citadas, pode ter ocorrido devido à associação entre duas lesões. Semelhante à Modena, et al (2016)<sup>14</sup>, os profissionais apresentam dificuldade quanto à classificação devido ao caráter multifatorial dessas lesões. Deve-se, entretanto, levar em consideração que, quando associados, esses processos podem avançar rapidamente sobre a estrutura dental, o que torna essencial à realização de um rápido e correto diagnóstico, devido à agressividade dessas lesões quando associadas<sup>4,17</sup>. Com relação ao tratamento, observou-se uma ampla concordância entre os profissionais, que priorizaram a eliminação do fator causal para posterior procedimento restaurador estético<sup>18,19,20</sup>.

Da mesma forma, a lesão de abrasão, quando vista isoladamente, também apresentou um baixo índice de acertos (20,60%) quanto ao diagnóstico. Provavelmente, as características clínicas apresentadas na abrasão não são tão características da alteração, gerando dificuldades e dúvidas quanto a seu correto diagnóstico. Para o tratamento da lesão, as sugestões de procedimentos de tratamento foram adequadas, a exemplo da eliminação da causa, seguido de procedimento restaurador estético.

Observou-se que, quando a lesão era do tipo abfração, 51,96%

dos profissionais acertaram o diagnóstico, de acordo com as informações clínicas e imagem. Santos-Daroz (2007)<sup>13</sup>, obtiveram um índice de acertos bem próximo (58,9%), sendo considerado como um bom resultado. Quanto ao tipo de tratamento para o referido caso, o procedimento restaurador, seguido de ajustes de contatos oclusais, eliminação constante do contato dente a dente e aplicação de dessensibilizante foi o mais citado.

Na análise dos resultados, tomou-se, como parâmetro, a média de acertos de 70% para confirmar um aceitável nível dos profissionais quanto à identificação do diagnóstico e escolha adequada para o tratamento das lesões não cariosas. Dessa forma, observou-se um baixo índice de acertos, no tocante à associação de fatores (erosão de origem extrínseca associada à abrasão), bem como para lesões de abfração e abrasão como fatores predominantes. Os resultados observados foram compatíveis com aqueles observados por Santos-Daroz (2007)<sup>13</sup>, que analisaram o conhecimento de estudantes de graduação em Odontologia sobre essas lesões. Sugere-se que a causa para esse baixo índice de acertos esteja relacionada à formação acadêmica, que, de forma geral, não aplica um protocolo de diagnóstico rotineiro para reconhecimento e determinação das causas dessas lesões não cariosas.

Observando-se a relação entre o conhecimento e o gênero dos participantes, percebeu-se a ausência de associação estatística, demonstrando que profissionais homens e mulheres apresentam o mesmo grau de dificuldades e/ou facilidades, quando do diagnóstico e tratamento das lesões não cariosas. Entretanto, quando se leva em consideração a autopercepção da dificuldade pelos cirurgiões-dentistas entrevistados, verifica-se que as mulheres fizeram uma autoavaliação mais crítica, principalmente aquelas com faixa etária entre 34 a 36 anos, semelhante ao observado por outros autores<sup>21</sup>.

Para um tratamento eficaz desses tipos de lesões não cariosas, faz-se necessário agir no fator causal para que o problema seja sanado de forma correta sem que haja um reaparecimento das lesões<sup>19</sup>. Isso implica dizer que conhecer os fatores etiológicos para identificar as lesões e tratá-las é de fundamental importância; por outro lado, fazer restaurações e outros procedimentos sem tratar a real causa se torna ineficaz com o passar do tempo<sup>22</sup>.

Os cirurgiões-dentistas inseridos na Atenção Básica demonstraram conhecimento sobre o tratamento das lesões não cariosas, apresentando como cuidado principal identificar a causa e eliminá-la. Entretanto, com relação ao diagnóstico das lesões, eles mostraram resultados mais divergentes, sendo mais preciso para as lesões mais comuns (erosão e atrição). Dúvidas e questionamentos persistentes quanto ao tipo de lesão não cariiosa e os fatores envolvidos em sua etiologia podem levar o profissional a escolher um tratamento incorreto, gerando falhas posteriores e insucessos.

Os resultados deste estudo remetem à necessidade de se reforçar

essa temática, no âmbito da graduação e da pós-graduação, com ênfase em protocolos e práticas clínicas, possibilitando, assim, ao estudante de odontologia e ao cirurgião-dentista a aquisição de habilidades no tocante ao correto diagnóstico das lesões, e, conseqüentemente, à adoção de formas adequadas de tratamento.

Ênfase deve ser dada à prevenção e ao diagnóstico precoce das lesões não cariosas. Muitas vezes, a não identificação desses processos em tempo hábil pode ocasionar extensas perdas de estrutura dentária. A dieta excessivamente ácida, os hábitos parafuncionais, os comprometimentos sistêmicos do paciente e as más-oclusões podem afetar a estrutura dentária, ocasionando desgaste em esmalte e dentina, levando à sensibilidade dentinária. O simples hábito de escovar os dentes (sem a técnica adequada) pode resultar no aparecimento de lesões do tipo abrasão<sup>2</sup>.

Devido ao caráter comportamental associado ao aparecimento dessas lesões, em algumas situações, é necessária a interação de outros profissionais (interdisciplinaridade), como médicos psiquiatras, gastroenterologistas e psicólogos, para se lograr êxito no tratamento. Essa interdisciplinaridade é de fundamental importância para o tratamento da lesão diagnosticada como erosão intrínseca, pois ela diz respeito a distúrbios alimentares e a psicológicas, como anorexia e bulimia nervosa ou regurgitação de conteúdos gástricos resultante de anomalias do trato gastrointestinal, como refluxo gastroesofágico, úlceras pépticas e duodenais, enjoos matinais apresentados pelas gestantes, medicação de cujo efeito colateral pode gerar náuseas e vômitos e, até mesmo, o alcoolismo crônico<sup>23</sup>. De modo semelhante, nos casos de lesão de atrição, essa interdisciplinaridade se faz importante por estar relacionada àqueles pacientes que possuem hábitos parafuncionais, a exemplo do apertamento dentário ou bruxismo, como consequência de estresse emocional, refletindo na tonicidade muscular<sup>24</sup>.

Dessa forma, seria ideal a elaboração de um protocolo direcionado ao diagnóstico e tratamento correto de lesões não cariosas, que fosse de fácil utilização, rápido e prático, sendo aplicado desde a formação acadêmica até a prática clínica profissional diária.

## CONCLUSÃO

Embora grande parte dos cirurgiões-dentistas da Estratégia Saúde da Família tenham sido capazes de identificar um plano de tratamento adequado para os casos de lesões não cariosas propostos na pesquisa, foram identificadas lacunas de conhecimento entre esses profissionais a respeito do diagnóstico de tais lesões, apresentando resultados divergentes, com exceção de lesões de erosão intrínseca e extrínseca, e a atrição, supondo, assim, a existência de dificuldades no reconhecimento das lesões não cariosas. Pôde-se constatar que a associação da ocorrência entre as lesões dificulta ainda mais o diagnóstico por parte do profissional, afetando negativamente a prevenção e o tratamento delas.

## REFERÊNCIAS

1. Eccles JD. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. *Dent Update*. 1982 Aug; 9(7): 373-374, 376-378, 380-381. PubMed PMID: 6958629.
2. Bartlett DW, Shah P. A critical review of non-cariious cervical (wear) lesions and the role of abfraction, erosion, and abrasion. *J Dent Res*. 2006; 85(4): 306-12. PubMed PMID: 16567549.
3. Grippo JO, Simring M, Coleman TA. Abfraction, abrasion, biocorrosion, and the enigma of noncariious cervical lesions: a 20-year perspective. *J Esthet Restor Dent*. 2012; 24(1): 10-23. doi: 10.1111/j.1708-8240.2011.00487.x. PubMed PMID: 22296690.
4. Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:32-45. doi: 10.1159/000359936. PMID: 24993256.
5. Bishop K, Kelleher M, Briggs P, Joshi R. Wear now? An update on the etiology of tooth wear. *Quintessence Inter*. 1997 May; 28(5): 305-13. PubMed PMID: 9452693.
6. Yoshizaki KT, Francisconi-Dos-Rios LF, Sobral MA, Aranha AC, Mendes FM, Scaramucci T. Clinical features and factors associated with non-cariious cervical lesions and dentin hypersensitivity. *J Oral Rehabil*. 2017; 44(2): 112-118. doi: 10.1111/joor.12469. PubMed PMID: 27973740.
7. Grippo JO. Abfractions: a new classification of hard tissue lesions of teeth. *J Esthet Dent*. 1991 Jan-Feb; 3(1): 14-9. PubMed PMID: 1873064.
8. Lee WC, Eakle WS. Possible role of tensile stress in the etiology of cervical erosive lesions of teeth. *J Prosthet Dent*. 1984 Sep; 52(3): 374-380. PMID: 6592336.
9. Lee WC, Eakle WS. Stress-induced cervical lesions: review of advances in the past 10 years. *J Prosthet Dent*. 1996 May; 75(5): 487-494. PMID: 8709012.
10. Imfeld T. Dental erosion. Definition classification and links. *Eur. J. Oral Sci*. 1996 Apr; 104(2): 151-5. PubMed PMID: 8804882.
11. Kolak V, Pešić D, Melih I, Lalović M, Nikitović A, Jakovljević A. Epidemiological investigation of non-cariious cervical lesions and possible etiological factors. *J Clin Exp Dent*. 2018; 10(7): e648-e656. PubMed PMID: 30057705.
12. Teixeira DNR, Zeola LF, Machado AC, Gomes RR, Souza PG, Mendes DC, et al. Relationship between noncariious cervical lesions, cervical dentin hypersensitivity, gingival recession, and associated risk factors: A cross-sectional study. *J Dent*. 2018; 76: 93-97. PubMed PMID: 29940290.
13. Santos-Daroz CB, Daroz LGD, Batitucci MHG, Batitucci G, Miranda MS. Classification and treatment of non-cariious dental lesions by under-graduate dental students. *UFES Rev Odontol*. 2007; 9(1):5-12.
14. Modena RA, Pires AFS, Tannure PN, Cavalcante LMA, Schneider LFJ. Conhecimento de cirurgiões-dentistas sobre o diagnóstico e o tratamento de lesões cervicais não cariosas: um estudo piloto em rede colaborativa. *RFO*. 2016 Maio-Ago; 21(2): 178-186.
15. Paiva SM, Perazzo MF, Ortiz FR, Pordeus IA, Martins PA Júnior. How to Select a Questionnaire with a Good Methodological Quality? *Braz Dent J*. 2018; 29(1): 3-6. PMID: 29267520.
16. Passos VF, Melo MAS, Park J, Strassler HE. Current Concepts and Best Evidence on Strategies to Prevent Dental Erosion. *Compend Contin Educ Dent*. 2019 Feb; 40(2): 80-86. PMID: 30767547.
17. Wegehaupt FJ, Hoegger VGM, Attin T. Abrasion of eroded and sound enamel by a dentifrice containing diamond abrasive particles. *Swiss Dent J*. 2017 Jul; 127(7-8): 634-639. PubMed PMID: 28911219.
18. Passos VF, de Souza AM, Rodrigues LK, Bombonatti JC, Santiago SL. A conservative treatment approach using direct composite resins for anterior teeth eroded by lemon sucking. *Gen Dent*. 2013 Aug; 61(5): e1-4. PubMed PMID: 23928446.
19. Dietchi D, Argente A. A comprehensive and conservative approach for the restoration of abrasion and erosion. Part 1: Concepts and clinical rationale for early intervention using adhesive techniques. *Eur J Esthet Dent*. 2011; 6(1): 20-33. PubMed PMID: 21403925.
20. Pini NP, De Marchi LM, Ramos AL, Pascotto RC. Minimally Invasive Adhesive Rehabilitation for a Patient With Tooth Erosion: Seven-year Follow-up. *Oper Dent*. 2019 Jan-Feb; 44(1): E45-E57. doi: 10.2341/17-181-T. PubMed PMID: 30142039.
21. Cooper KM, Krieg A, Brownell SE. Who perceives they are smarter? Exploring the influence of student characteristics on student academic self-concept in physiology. *Adv Physiol Educ*. 2018 Jun; 42(2): 200-208. doi: 10.1152/advan.00085.2017. PubMed PMID: 29616569.
22. Bader JD, Levitch LC, Shugars DA, Heymann HO, McClure F. How dentists classified and treated non-cariious cervical lesions. *J Am Dent Assoc*. 1993 May; 124(5): 46-54. PubMed PMID: 8482781.
23. Moazzez R, Bartlett D. Intrinsic causes of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014; 25:180-96. doi: 10.1159/000360369. PubMed PMID: 24993266.
24. Saulue P, Carra MC, Laluque JF, d'Incau E. Understanding bruxism in children and adolescents. *Int Orthod*. 2015 Dec; 13(4): 489-506. doi:10.1016/j.ortho.2015.09.001. PubMed PMID: 26608467.

## Como citar este artigo/How to cite this article:

Ribeiro VSCR, Almeida EL, Leal IC, Bizerril DO, Saintrain MVL, Ferreira RGLA, et al. Diagnóstico e tratamento de lesões não cariosas: a visão do cirurgião-dentista do sistema público de saúde. *J Health Biol Sci*. 2019 Abr-Jun; 7(2):204-210.

## DIRETRIZES PARA AUTORES

### Orientações gerais

Todos os manuscritos a serem considerados para publicação no Journal of Health and Biological Sciences - JHBS devem ser submetidos por via eletrônica.

Para submeter artigos é necessário prévio cadastro através do link: <http://201.20.109.36:2627/index.php/medicina/user/register>

Para os que já possuem cadastro, somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos, no seguinte endereço: <http://201.20.109.36:2627/index.php/medicina/author/submit/1>

Por meio desse serviço os autores podem submeter o artigo e acompanhar o status do mesmo durante todo o processo editorial. Essa forma de submissão garante maior rapidez e segurança na submissão do seu manuscrito, agilizando o processo de avaliação.

O autor deve escolher uma categoria para o manuscrito (Artigos Originais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Imagens ou Obituários). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

Durante o processo de submissão do artigo os autores devem anexar os seguintes documentos:

- a) Declaração de responsabilidade pelo manuscrito a ser enviado, assegurando que o material não foi publicado ou está sob consideração por outro periódico científico.
- b) A declaração de transferência de Direitos Autorais deve ser enviada para a Secretaria Editorial somente após a aceitação do manuscrito para publicação na revista.

Com relação a reenvio e revisões, a revista diferencia entre:

- a) Manuscritos que foram rejeitados;
- b) Manuscritos que serão reavaliados após a realização das correções que forem solicitadas aos autores.

No caso de reenvio, o autor é informado que seu trabalho foi rejeitado e se desejar que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá fazer as alterações que julgar necessárias e reenviá-las. Contudo, será uma nova submissão, portanto, será gerado um novo número para o manuscrito no sistema.

Em caso de revisão, o autor deve refazer e/ou alterar seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores. Em seguida, o autor deve devolver o arquivo para uma segunda análise, não se esquecendo de informar o mesmo número atribuído para o manuscrito, para que assim possamos informar o parecer final (aceitação ou rejeição).

Serão enviadas provas ao autor correspondente para que o texto seja cuidadosamente conferido. Mudanças ou

edições ao manuscrito editado não serão permitidas nesta etapa do processo de edição. Os autores deverão devolver as provas corrigidas dentro do prazo máximo de 5 (cinco) dias úteis após serem recebidas.

Os artigos aceitos comporão os números da revista obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos ou ainda a critério do corpo editorial.

### Custos de Publicação

Não haverá custos de publicação.

### Idiomas

Os artigos podem ser redigidos em Português, Inglês ou Espanhol. A revista, a depender do campo do artigo, pode oferecer o serviço de tradução para língua inglesa, sem custos para os autores. Quando traduzidos para a língua inglesa sugerimos que o texto seja revisado por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

### Tipos de manuscrito e formatação

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou submetidas para publicação em quaisquer outros periódicos científicos. Devem ser resultados de pesquisas de natureza empírica, experimental ou conceitual. No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico. Estes requisitos estão de acordo com BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)) e do Workshop ICTPR. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo e referências); resumo com até 250 palavras, estruturado com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. Serão permitidos até cinco ilustrações (tabelas e figuras). No mínimo três palavras-chaves devem ser fornecidas e no máximo cinco. Deverá ter no máximo 30 referências.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura. Serão considerados apenas os artigos de revisão que forem convidados pelo editor. Devem ter resumo estruturado com até 250 palavras, máximo de 3.500 palavras, cinco ilustrações (tabelas e figuras), com a mesma formatação do artigo original. No mínimo três palavras-chaves devem ser fornecidas e no máximo cinco. Deverá ter no máximo 40 referências.

Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. Devem ter no máximo 2.000 palavras, mesma formatação do artigo original, incluindo o sumo e abstract estruturados com os subtítulos introdução, métodos, resultados e conclusões, e com até

15 referências. Um máximo de duas ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Devem ter resumo com no máximo 100 palavras. No mínimo três palavras-chaves devem ser fornecidas e no máximo cinco. Não colocar no corpo do manuscrito os tópicos introdução, métodos, resultados, discussão e conclusões.

**Relato de Casos:** devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras, com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 15 referências, resumo e abstract não estruturados e com no máximo 100 palavras. No mínimo três palavras-chaves devem ser fornecidas e no máximo cinco. Colocar no corpo do manuscrito os tópicos Introdução, Relato do Caso, Discussão e Referências.

**Imagens:** até cinco figuras com a melhor qualidade possível. Apenas quatro autores e até cinco referências (não citadas no texto) são permitidas. O tamanho máximo é de 300 palavras com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras. Podem ser preferencialmente em doenças infecciosas, biologia molecular e genética. Deverá ter até 15 referências.

**Obituário:** devem ser escritos preferencialmente por um colega de profissão e destacar o perfil científico e a contribuição do profissional falecido.

### Preparo dos manuscritos

Devem ser digitados em extensão .doc, .txt ou .rtf, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo em todo o documento (incluindo resumo, agradecimentos, referências e tabelas), com margens de 2,5 cm. Todas as páginas devem ser numeradas no canto superior direito. Evitar ao máximo as abreviações e siglas. Em determinados casos, sugere-se que na primeira aparição no texto, deve-se colocar por extenso e a abreviatura e/ou sigla entre parênteses. Exemplo: Febre Hemorrágica do Dengue (FHD).

Comunicações pessoais e dados não publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas apenas mencionados no texto e em nota de rodapé na página em que é mencionado. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (DB Rolim: Comunicação Pessoal, 2011) ou Oliveira-Lima JW: dados não publicados).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Para tanto, os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Declaração de Helsinque e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição onde a pesquisa foi realizada, com seu respectivo número de aprovação.

Ao final do artigo, declarar se há ou não conflito de interesses.

O manuscrito deve conter:

**Título:** deve ser conciso, claro e o mais informativo possível. Não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços. Deve ser apresentada a versão do título em inglês.

**Título Resumido:** no máximo 70 caracteres, para fins de legenda nas páginas impressas.

**Autores:** deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, graduações mais elevadas possuídas, afiliações, assim como registros em Bases como ORCID e ResearchID, caso tenham (o registro ORCID e ResearchID podem ser obtidos, gratuitamente, através do site <http://orcid.org> e <http://www.researcherid.com/>, respectivamente); acompanhadas do respectivo endereço com informação de contato (telefone, endereço e e-mail para o autor correspondente) e todos os coautores. Os autores devem garantir que o manuscrito não foi previamente publicado ou não está sendo considerado para publicação em outro periódico. Os autores podem ser convidados a fornecer os nomes e contatos de três potenciais revisores imparciais.

**Resumo Estruturado:** deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as principais implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. Para os textos em língua portuguesa, deve ser apresentada também a versão em inglês (Abstract) ou em espanhol (Resumen).

**Palavras-chave:** imediatamente abaixo do resumo estruturado, de acordo com o tipo de artigo submetido, devem ser incluídos de três a cinco descritores (palavras-chave), assim como a respectiva tradução para os keywords (descriptors). Devem ser separados por ponto. Os descritores devem ser extraídos dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): <http://decs.bvs.br/>, que contém termos em português, espanhol e inglês, e do Medical Subject Headings (MeSH): [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh), para termos somente em inglês.

**Introdução:** deve ser sucinta e destacar os propósitos da investigação, além da relação com outros trabalhos na área. Uma extensa revisão de literatura não é recomendada, citando apenas referências estritamente pertinentes para mostrar a importância do tema e justificar o trabalho. Ao final da introdução, os objetivos do estudo devem ser claramente descritos.

**Métodos:** devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

**Aspectos Éticos:** em caso de experimentos envolvendo seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação

humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas. Deve também citar aprovação de Comitê de Ética.

**Resultados:** devem ser um relato conciso da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

**Discussão:** deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

**Agradecimentos:** devem ser curtos, concisos e restritos a aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas. Deve haver permissão expressa dos nomeados. Aqui devem ser informados todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa. Informar também a existência de bolsas de Iniciação Científica, Mestrado ou Doutorado.

**Conflitos de Interesse:** todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

**Nomenclatura:** O uso da nomenclatura padronizada em todos os campos da ciência e da medicina é um passo essencial para a integração e ligação de informação científica na literatura publicada. Recomendamos o uso de nomenclatura correta e estabelecida sempre que possível:

Nós incentivamos o uso do Sistema Internacional de Unidades (SI). Quando não for utilizado exclusivamente este, por favor fornecer o valor SI entre parênteses após cada valor.

Os nomes das espécies deve estar em itálico (por exemplo, *Homo sapiens*) e devem ser escritos na íntegra o nome completo do gênero e das espécies, tanto no título do manuscrito como também na primeira menção de um organismo no texto. Depois disso, a primeira letra do nome do gênero, seguindo-se do nome completo das espécies podem ser utilizados.

Genes, mutações, genótipos e alelos devem ser indicados em itálico. Use o nome recomendado pela consulta ao banco de dados de nomenclatura genética apropriada. Para genes humanos sugerimos a base de dados HUGO. Por vezes é conveniente indicar os sinônimos para o gene da primeira vez que aparece no texto. Prefixos de genes, tais como aqueles usados para oncogenes ou localização celular deve ser mostrada em romano: v-fes, c-MYC, etc.

Para facilitar a identificação de substâncias ou ingredientes farmacêuticos ativos recomenda-se a o uso da Internacional Nonproprietary Names - INN (também conhecida

como rINN). Cada INN é um nome único que é reconhecido mundialmente, além disso, é de propriedade pública. Para saber mais, acesse: <http://www.who.int/medicines/services/inn/en/>.

**Referências:** As referências citadas devem ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos (<http://www.icmje.org>). Consulte também: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

Os nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus (<http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng> ou <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

Exemplos:

**Artigo (Revista impressa)**

Zamboni CB, Suzukii MF, Metairon S, Carvalho MDF, Sant'Anna OA. Investigation of whole blood of SJL/J mice using neutron activation analysis. *J Radio analytical Nucl Chem.* 2009; 281(6):97-99.

**Artigo na internet**

Alves WF, Aguiar EE, Guimarães SB, da Silva Filho AR, Pinheiro PM, Soares GSD, et al. I-Alanyl – Glutamine preoperative infusion in patients with critical limb ischemis subjected to distal revascularization reduces tissue damage and protects from oxidative stress. *Ann Vasc Surg* [internet]. 2010 Abr 5 [acesso em 3 Feb 2011]; 24(4):461-7. Disponível em: <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0890-5096/PIIS089050961000018X.pdf>.

**Artigo na internet com DOI:**

Correia LL, Silveira DMI, Silva AC, Campos JS, Machado MMT, Rocha HAL, et al. Prevalência e determinantes de obesidade e sobrepeso em mulheres em idade reprodutiva residentes na região semiárida do Brasil. *Ciênc Saúde Coletiva* [Internet]. 2011 Jan [acesso em 3 Feb 2012]; 16(1):133-145. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232011000100017&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000100017&lng=en). DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000100017>.

**Artigo com indicação na PubMed:**

Cavalcanti LP, de Paula FJ, Pontes RJ, HeuKelbach J, Lima JW. Survival of larvivorous fish used for biological control of *Aedes aegypti* larvae in domestic containers with different chlorine concentrations. *J Med Entomol.* 2009 Jul; 46(4):841-4. PubMed PMID: 19645286.

**Livros**

**Autor pessoal**

Minayo MCS. Pesquisa social: teoria, método e criatividade. 22. ed. Petrópolis: Vozes; 2003.

**Autor(es) editor(es), coordenador(es), entre outros**

Silva AC, Carvalho HMB, Campos JS, Sampaio TC, coordenadores. Livro do médico de família. Fortaleza: Faculdade

Christus; 2008. 558 p.

#### Livro com informação de edição

Silva Filho AR, Leitão AMF, Bruno JA, Sena JIN. *Atltexto de anatomia humana*. 2. ed. Fortaleza: Faculdade Christus; 2011. 251p.

#### Capítulo de livro

Silva Filho AR, Leitão AMR, Barreto JA, Freire TL. *Anatomia aplicada ao exame ginecológico*. In: Magalhães MLC, Medeiros FC, Pinheiro LS, Valente PV, coordenadores. *Ginecologia baseada em problemas*. Fortaleza: Faculdade Christus; 2011. p. 23-34.

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. *Chromosome alterations in human solid tumors*. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

#### Anais de Congressos

Carvalho MDF, Moura TB, Oliveira RGS, Ribeiro E, Arruda AP, Carvalho KM. *Estudo molecular das mutações DF508, G542X, G551D, R553X, N1303K, R1162X e 2183AAG em pacientes com fibrose cística do Estado do Ceará*. In: *Anais do 50º Congresso Brasileiro de Genética; 2004; Florianópolis*. Santa Catarina: Sociedade Brasileira de Genética; 2004. p. 627-629.

Teodora R, Franco FB, Aguiar YP. *Não sei o que e como fazer... A vítima de bullying nas representações de alunos da escola básica*. In: *Anais do 9º Congresso Nacional de Educação – EDUCRERE, 3. Encontro Sul Brasileiro de Psicopedagogia; 2009; Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2009. p. 9582-9598*.

#### Trabalhos acadêmicos

Rocha JLC. *Efeitos da Mitomicina-C tópica em queimadura de camundongos [dissertação de mestrado]*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2010.

Tannouri AJR, Silveira PG. *Campanha de prevenção do AVC: doença carotídea extracerebral na população da grande Florianópolis [trabalho de conclusão de curso]*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Medicina. Departamento de Clínica Médica; 2005.

Citações no texto: Devem ser acompanhadas do número correspondente, em expoente ou sobrescrito, seguindo a sequência numérica da citação no texto que aparece pela primeira vez. Não devem ser utilizados parênteses, colchetes e similares. O número da citação pode ser acompanhado ou não do(s) nome(s) do(s) autor(es) e ano de publicação. Se forem citados dois autores, ambos são ligados pela conjunção “e”.

Citar todos os autores da obra se forem até seis. Se

houver mais de 6 (seis) autores, citar os seis primeiros seguidos da expressão et al. As abreviações das revistas devem estar em conformidade com o Index Medicus/Medline(Consulte:<http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng> ou <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). Só serão aceitas citações de revistas indexadas, ou, em caso de livros, que possuam registro ISBN (International Standard Book Number).

Os editores estimulam a citação de artigos publicados no *Journal of Health and Biological Sciences*.

São de responsabilidade do(s) autor(es) do manuscrito a exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto.

#### Exemplos de citação:

According to Pamplona et al (2010), Dengue hemorrhagic fever has been bringing great public health challenges for Brazil. The impact of a health problem can be measured by its severity and by the social value that it represents for society, i.e., by its actual or potential impact and its repercussion on socioeconomic development<sup>9</sup>.

The hospital lethality rate due to DHF in Recife was 6.8%, with progression to death in around 11 days after the first symptoms<sup>3</sup>. This was close to the data found in the present study. In the studies conducted in Recife and Cuba<sup>3,11</sup>...

Para mais exemplos de modelos de citação, consulte também: <http://www.library.uq.edu.au/training/citation/vancouver.pdf>

Figuras: as ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos, etc.), devem ser citadas como figuras. Devem preferencialmente ser submetidas em alta resolução em formato TIFF, ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos (Ex: Figura 1), na ordem em que foram citadas no texto; devem ser identificadas fora do texto, por número e título abreviado do trabalho. As legendas devem ser apresentadas ao final da figura as ilustrações devem ser suficientemente claras, com resolução mínima de 300 dpi. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução. Estas autorizações devem acompanhar os manuscritos submetidos à publicação. Dá-se preferência a figuras originais, produzidas pelos próprios autores.

Os gráficos devem ser salvos com a extensão .xls ou .doc. Não devem ser copiados ou colados de um programa para o outro. Não se aceitam gráficos apresentados com as linhas de grade, e os elementos (barras, círculos) não podem apresentar volume (3-D). Nas legendas das figuras, os símbolos, lechas, números, letras e outros sinais devem ser identificados e seu significado esclarecido.

Os mapas devem ser vetorizados (desenhados)

profissionalmente utilizando o Corel Draw ou Illustrator, em alta resolução e suas dimensões não devem ultrapassar 1,5 x 28,0 cm.

As fotografias e algumas imagens mais complexas devem ser enviadas com boa resolução (mínimo de 300dpi) no formato TIFF, preferencialmente, preparadas utilizando o Adobe Photoshop. Devem ser enviadas sob forma de documento suplementar e não podem exceder 2 MB.

As legendas das figuras enviadas como anexo devem ser colocadas, com a respectiva numeração, no sinal do texto principal do artigo, após as referências, e conforme as instruções que serão fornecidas no momento da submissão. As legendas devem ser sucintas, porém auto-explicativas, com informações claras, de forma a dispensar consulta ao texto.

**Tabelas:** as tabelas com suas legendas devem ser digitadas com espaçamento duplo, com um título curto e descritivo e submetido online em um arquivo separado como um documento suplementar. Todas as tabelas devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto. A legenda deve aparecer em sua parte superior, precedida pela palavra “Tabela”, seguida do número de ordem de ocorrência no texto, em algarismos arábicos (ex: Tabela 1, Tabela 2 etc). Devem constar, de preferência, informações do tratamento estatístico. Os títulos das tabelas devem ser autoexplicativos, de forma que as tabelas sejam compreendidas dispensando consulta ao texto. Explicações mais detalhadas ou específicas devem ser apresentadas em notas de rodapé, identificadas por símbolos na seguinte sequência: \*, +, ±, §, ||, ¶, \*\*, ++, ±± Não sublinhar ou desenhar linhas dentro das tabelas e não usar espaços para separar colunas. Não usar espaço em qualquer lado do símbolo±.

## CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista. Caso contrário, deve-se justificar em “Comentários ao editor”.

O arquivo da submissão está em extensão .doc, .txt ou .rtf. O texto está em espaço duplo em todo o documento (incluindo resumo, agradecimentos, referências e tabelas), com margens de 2,5 cm; fonte Times New Roman, tamanho 12. As figuras e tabelas estão inseridas no final do documento na forma de anexos, preferencialmente submetidas em alta resolução em formato TIFF, devem estar numeradas consecutivamente com algarismos arábicos (Ex: Figura 1), na ordem em que foram citadas no texto; por número e título abreviado do trabalho. Todas as páginas devem ser numeradas no canto superior direito.

Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares

(ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas. Em Métodos, está explicitada a aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa (para estudos originais com seres humanos ou animais, incluindo relatos de casos). Todos os autores do artigo estão informados sobre as políticas editoriais da Revista, leram o manuscrito que está sendo submetido e estão de acordo com o mesmo.

## POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

## DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTURAL

### Declaração Transferencia de Direitos Autorais

O(s) autor(es) vem por meio desta declarar que o artigo intitulado “TÍTULO DO ARTIGO” aprovado para publicação no **Journal of Health and Biological Sciences** é um trabalho original, que não foi publicado ou está sendo considerado para publicação em outra revista, que seja no formato impresso ou no eletrônico.

O(s) autor(es) do manuscrito, acima citado, também declaram que:

Participaram suficientemente do trabalho para tornar pública sua responsabilidade pelo conteúdo.

O uso de qualquer marca registrada ou direito autoral dentro do manuscrito foi creditado a seu proprietário ou a permissão para usar o nome foi concedida, caso seja necessário.

A submissão do original enviada para o **Journal of Health and Biological Sciences - JHBS** implica na transferência dos direitos de publicação impressa e digital.

Assinatura do(s) autor(es)

Primeiro Autor: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Co-Autor: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Co-Autor: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Nota:** Todas as pessoas relacionadas como autores devem assinar esta declaração e não serão aceitas declarações assinadas por terceiros.

A declaração original deve ser assinada, datada e encaminhada por e-mail: (secretaria.jhbs@unichristus.edu.br).

#### **Política de Privacidade**

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta

publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

#### **Creative Commons**

Os conteúdos deste periódico de acesso aberto em versão eletrônica estão licenciados sob os termos de uma Licença Creative Commons Atribuição 3.0 não adaptada.



## AUTHOR GUIDELINES GUIDELINES FOR AUTHORS

Only electronic submissions will be accepted articles at the following address: <http://201.20.109.36:2627/index.php/medicina/author/submit/1>. Through this service the authors can submit articles and track their status of that throughout the editorial process. This submission form ensures a quick and safe submission of your manuscript, streamlining the evaluation of the process.

### Submission guidelines

All manuscripts to be considered for publication in the Journal of Health and Biological Sciences (JHBS) must be submitted electronically via the online submission system in the address: <http://201.20.109.36:2627/index.php/medicina/author/submit/1>.

The author must choose a category for the manuscript (Original Articles, Review Articles, Brief Communications, Case Reports, Images or Obituaries). The responsibility for the content of the manuscript is entirely pertinent to the author and his co-authors.

During the article submission process authors must attach the following documents:

a) Declaration of responsibility for the manuscript being sent, ensuring that the material has not been previously published or whether it is under consideration by another scientific periodical.

b) The copyright transfer statement must be sent to the Editorial Office ([secretaria.jhbs@fchristus.edu.br](mailto:secretaria.jhbs@fchristus.edu.br)) only after the acceptance of the manuscript for publication in the journal.

At the end of the article, stating whether there is or not a conflict of interest.

With respect to resubmission, and reviews, the journal distinguishes between:

- a) manuscripts that have been rejected;
- b) manuscripts that will be re-evaluated after carrying out the corrections which may have been required by the authors.

In the event of a new submission, the author will be informed whether his work has been rejected or not. In case the author may wish to require the editors to reconsider their decision of rejecting his manuscript, the author can make the necessary changes and resubmit it. Then, a new submission number for the manuscript will be generated in the system.

In the event of revision, the author must remodel his manuscript and change it according to the reviewers' recommendations and suggestions. Then the author

is expected to return the manuscript for a second analysis, not forgetting to inform the new number assigned to it, so that we can reach the final opinion (acceptance or rejection).

Proofs will be sent to the corresponding author for the text to be carefully checked. Changes or edits to the manuscript will not be allowed at this step of the editing process. The authors should return the proofs duly corrected within the maximum period of 5 (five) days after they have received them.

The accepted papers will make up the future issues of the journal according to the timeline which they were submitted, reviewed and accepted or at the discretion of the editorial staff.

### Publication costs

There will be no publication costs.

### Idioms

Articles can be written in Portuguese, English or Spanish. The journal, depending on the field of the article can provide the translation service for the English language, free of charge to authors. When translated into English it is suggested that the text be revised by someone who has English as his native language and, preferably, by an expert on the subject matter.

### Types of formatting and manuscript

1. Original Articles: should report original research works which have not yet been published or submitted for publication in any other scientific journal. They must be the result of empirical research, conceptual or experimental. In the case of clinical trials, the manuscript must be accompanied by the registration number in the Institution at which the clinical trial was registered. These requirements are in accordance with the BIREME/OPAS/OMS and the International Committee of Medical Journal Editors ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)) and the ICTPR Workshop. The word limit is 3,500 (excluding abstract and references); a summary with up to 250 words, structured with the topics: Introduction, methods, results and conclusions is naturally required. Up to five illustrations (tables and figures) will be allowed. A minimum of three key-words must be provided, but they should not exceed a maximum of five. It must have maximum 30 references.

2. Review articles: review articles must include critical analysis of recent advances and not be mere literature review. Only review articles that are requested by the editor will be considered and these must include a structured summary with a minimum of 250 words (and 3,500 words at the maximum), five illustrations (tables and figures) with the same formatting as the original article.

A minimum of three key-words should be provided and a maximum of five. It must have maximum 40 references.

3. **Brief Communication notes:** brief communication notes must consist of brief reports about new interesting results within the service area of the journal. These must have no more than 2,000 words, with the same formatting of the original article, and must include summary and abstract structured with sub-items such as introduction, methods, results and conclusions, and 15 references at the most. Two illustrations (tables and figures) are allowed. Brief communication notes must include a summary with 100 words at maximum. At least three key-words should be provided and a maximum of five. The topics introduction: methods, results, discussion and conclusions must not appear in the structure of the manuscript.

4. **Case reports:** case reports should be submitted in the format of short narrative with maximum length of 1,500 words, with up to three illustrations (tables and figures), up to 12 references, summary and unstructured abstract and with no more than 100 words. A minimum of three key-words should be provided and a maximum of five. The manuscript should be structured with the following topics: Introduction, Case Report, Discussion and References. It must have maximum 15 references.

5. **Images:** up to five pictures with the best quality possible. Only four authors and up to five references (not cited in the text) are allowed. The maximum length is 300 words with emphasis on the description of the picture. The topics should involve some clinical lessons, containing title and description of the figures and should preferably focus on infectious diseases, molecular biology and genetics. It must have maximum 15 references.

6. **Obituary:** should be written preferably by a fellow performer and highlight the scientific profile and contribution of the deceased professional.

### Preparation of manuscripts

The manuscripts must be typed in doc, .txt. or rtf, source Times New Roman, size 12, with double spacing throughout the whole document (including abstract, acknowledgments, references, and tables), with margins of 2,5cm. All pages should be numbered in the top right-hand corner. Avoid as much as possible the abbreviations and acronyms. In certain cases, it is suggested that the first appearance in the text be put in the long form of the words and the acronym in parentheses with the short form of the acronym in parenthesis. Example: Dengue hemorrhagic fever (DHF).

Personal communications and unpublished data should not be included in the list of references, but merely mentioned in the text and in a foot-note on the page in which it is mentioned. If essential, they can be incorporated into the appropriate place in the text between brackets as follows: (DB Rolim: personal communication, 2011) or (Oliveira Lima JW: unpublished data).

Search ethical criteria must be respected. For that matter, the authors must explain that the search was conducted

within the standards required by the Declaration of Helsinki and adopted by the Committee of ethics in research (CEP in Portuguese) of the institution where the research was carried out, with its respective approval number.

The manuscript must include:

**Title:** The title must be concise, clear and as informative as possible. It should not contain abbreviations and should not exceed 200 characters, including spaces. It must include the English version of the title.

**Short title:** Short titles must not exceed the maximum of 70 characters, for purposes of caption on the printed pages.

**Authors:** The manuscript must include the names of the authors in the direct order and without abbreviations, highest degree possessed, affiliations as well as registrations in Basis such as ORCID and ResearchID, in case they have them (the ORCID and ResearchID registrations may be obtained free of charge through the sites <http://orcid.org> and <http://www.researcherid>, respectfully; with the pertinent addresses together with contact information (phone, address and e-mail to the corresponding author) and all co-authors. Authors must ensure that the manuscript has not been previously published or is not being considered for publication in another journal. Authors are required to provide the names and contacts of three unbiased potential reviewers.

**Structured summary:** This must condense the results achieved and the main conclusions in such a way that a reader unfamiliar with the subject matter which is presented in the text will be able to understand the main implications of the article. The summary should not exceed 250 words (100 words in the case of brief communication releases) and abbreviations should be avoided. Summaries should be subdivided into: introduction, methods, results and conclusions.

**keywords:** These should be placed immediately below the summary, structured according to the type of article submitted, three to five descriptors (keywords) must be included as well as their translation into the key-words (descriptors). The descriptors must be extracted from the "Health Sciences descriptors" (DeCS, in Portuguese): <http://decs.bvs.br>, which contains terms in Portuguese, Spanish and English, and "Medical Subject Headings" (MeSH): [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh), for terms in English only.

**Introduction:** The Introduction should be brief and highlight the purposes of the research, in addition to its relationship with other jobs in the area. An extensive review of the literature is not recommended; The opening section should contain strictly pertinent references that will lead to showing the importance of the issue and to justify the work. At the end of the introduction, the goals of the study must have been made quite clear.

**Methods:** These should be rather detailed so that readers and reviewers can understand precisely what was done

and allow it to be repeated by others. -Technical standards need only be cited.

**Ethical aspects:** In the case of experiments involving human subjects, indicate whether the procedures being followed are in accordance with the ethical standards of the responsible Committee for human experimentation (institutional, regional or national) and with the Helsinki Declaration of 1964, revised in 2000. When reporting experiments on animals, indicate whether they have been carried out in accordance with the proper guide from the National Research Council, or with any law relating to the care and use of laboratory animals. Approval from the Ethics Committee must also be submitted.

**Poll results:** These must be registered with a concise account of the new information and avoid repeating in the text data presented in tables and illustrations.

**Discussion:** Discussion must be strictly related to the study being reported. Do not include a general review on the topic, thus avoiding it to become excessively long.

**Acknowledgements:** These should be short, concise and restricted to those actually needed, and, in the case of organs of fomentation, should not bear acronyms. There must be express permission of nominees (see document Responsibility for Acknowledgements). There should be clear information about all kinds of encouragement received from funding agencies or other funding bodies or institutions of the research. The existence of scientific initiation scholarships, masters or doctorate should also be referred.

**Conflicts of interest:** All authors must disclose any kind of conflict of interest while developing the study.

**Nomenclature:** The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step for the integration and connection of scientific information in the published literature. We recommend the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We encourage the use of the International System of Units (SI). When not used exclusively this one, please provide the SI value in parentheses after each value. The names of species should be in italics (e.g., *Homo sapiens*) and must be written in full the full name of the genus and species, both in the title of the manuscript as well as the first mention in the text of an organism. Thereafter, the first letter of the genus followed by the full name of the species may be used. Genes, mutations, genotypes and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the database of appropriate genetic nomenclature. For human genes suggest database HUGO. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Prefixes genes, such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman: v-fes, c-MYC, etc. To facilitate the identification of substances or active pharmaceutical ingredients is recommended to use the International Nonproprietary Names - INN (also Known as rINN). Each INN is a unique name that is globally recognized, moreover, is publicly owned.

J. Health Biol Sci. 2019; 7(2):211-221

**References:** The references cited should be listed at the end of the article, in numerical order, following the General Rules of the Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (<http://www.icmje.org>). See also: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>.

The names of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus (<http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng> ou <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

#### Examples:

##### Article (Printed journals)

Zamboni CB, Suzuki MF, Metairon S, Oak MDF, Sant'Anna OA. Investigation of whole blood of mice using neutron activation analysis SJLJ. J Radio analytical Nucl Chem 2009;281(6):97-99.

##### Articles on the internet

Alves WF, Aguiar EE, Guimarães SB, da Silva Filho AR, Pinheiro PM, Soares GSD, et al. l-Alanyl–Glutamine preoperative infusion in patients with critical limb ischemis subjected to distal revascularization reduces tissue damage and protects from oxidative stress. Ann Vasc Surg [Internet]. 2010 Apr 5 [cited 2011 Feb 3];24(4):461-7. Available from: <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0890-5096/PIIS089050961000018X.pdf>.

##### Article on the internet with DOI:

Correia LL, Silveira DMI, Silva AC, Campos JS, Machado MMT, Rocha HAL, et al. Prevalência e determinantes de obesidade e sobrepeso em mulheres em idade reprodutiva residentes na região semiárida do Brasil. Ciênc Saúde Coletiva [Internet]. 2011 Jan 2 [cited 2012 Feb 3];16(1):133-145. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232011000100017&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000100017&lng=en). DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000100017>.

##### Articles with indication for PubMed:

Cavalcanti LP, de Paula FJ, Pontes RJ, Heukelbach J, Lima JW. Survival of larvivorous fish used for biological control of *Aedes aegypti* larvae in domestic containers with different chlorine concentrations. J Med Entomol. 2009 Jul;46(4):841-4. PubMed PMID: 19645286.

#### Books

##### Personal author

MCS Minayo. Social research: theory, method and creativity. 22th ed. Petrópolis: Vozes; 2003.

##### Author (s) editor (s), Coordinator (s), among others

Silva AC, Carvalho HMB, Campos JS, Sampaio TC, coordinators. Family doctor's book. Fortaleza: Christus College: 2008. 558 p.

##### Book with editing information

Silva Filho AR, Leitão AMF, Bruno JA, Sena JIN. Text-Atlas of human anatomy. 2nd ed. Fortaleza: Christus College,

2011. 251p.

#### Book chapter

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Silva Filho AR, Leitão AMR, Barreto JA, Freire TL. Anatomy applied to gynecological examination. In: Magalhães MLC, Medeiros FC, Pinheiro LS, Valente PV, coordinators. Gynecology problems based. Fortaleza: Christus College; 2011. p. 23-34.

#### Congress proceedings

Ilias I, Pacak K. Anatomical and functional imaging of metastatic pheochromocytoma. In: Pacak K, Aguilera G, Sabban E, Kvetnansky R, editors. Stress: current neuroendocrine and genetic approaches. 8th Symposium on Catecholamines and Other Neurotransmitters in Stress; 2003 Jun 28 - Jul 3; Smolenice Castle, Slovakia. New York: New York Academy of Sciences; 2004. P. 495-504.

Rice AS, Farquhar-Smith WP, Bridges D, Brooks JW. Canaboids and pain. In: Dostorovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, editors. Proceedings of the 10th World Congress on Pain; 2002 Aug 17-22; San Diego, CA. Seattle (WA): IASP Press; c2003. P. 437-68.

#### Academic works

Rocha JLC. Effects of Mitomicine-C topical burn mice [dissertation]. [Fortaleza]: Ceará Federal University; 2010. 53 p.

Citations in the text: Must be accompanied by the corresponding number in superscript or exponent, following the numerical sequence of the quote in the text that appears for the first time. They should not be used parentheses, brackets and similar. The citation number may be accompanied or not by name of author and year of publication. When there are two authors, both are linked by the conjunction "and".

Cite all authors of the work until they are six. If more than six (6) authors, cite the first six followed by et al. Abbreviations of journals should be in accordance with the Index Medicus / MEDLINE (See: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng> or <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). Only Citations of journals indexed, or, in the case of books, holding registration ISBN (International Standard Book Number).

The editors encourage citation of articles published in the Journal of Health and Biological Sciences. The accuracy of the references and citations included in the manuscript are the authors' full responsibility, and theirs only.

#### Examples:

According to Pamplona et al (2010), Dengue hemorrhagic fever has been bringing great public health challenges for Brazil. The impact of a health problem can be measured by its severity and

by the social value that it represents for society, i.e., by its actual or potential impact and its repercussion on socioeconomic development<sup>9</sup>.

The hospital lethality rate due to DHF in Recife was 6.8%, with progression to death in around 11 days after the first symptoms<sup>3</sup>. This was close to the data found in the present study. In the studies conducted in Recife and Cuba<sup>3,11</sup>...

For more examples, see also:<http://www.library.uq.edu.au/training/citation/vancouv.pdf>

Pictures: The illustrations (photos, drawings, graphics, etc.), must be cited as figures. They should preferably be submitted in TIFF format at high resolution, be numbered consecutively with Arabic numerals (e.g., Figure 1), in the order in which they are cited in the text; should be identified outside the text, by number and short title of work. Captions must be presented at the end of the figure; the illustrations must be sufficiently clear, with a minimum resolution of 300 dpi. If there should be any figure drawn from another work, previously published, authors must apply for permission in writing for its reproduction. These commitments must accompany the manuscript submitted for publication. It is preferable that the figures used be produced by the authors themselves.

Graphics must be saved with the extension .xls or doc. They ought not be copied or pasted from one program to another. No graphics displayed with gridlines will be accepted and the elements (bars, circles) should not display volume (3-D). In captions, symbols, arrows, numbers, letters and other signs must be identified and their meaning clarified.

The maps should be vectorized (drawn) professionally using Corel Draw or Illustrator, in high resolution and its dimensions should not exceed 21.5 x 28.0 cm.

The photos and some more complex images must be sent with good resolution (at least 300 dpi) TIFF format, preferably prepared using Adobe Photoshop. They must be sent in the form of additional document and should not exceed 2 MB.

The captions sent as an attachment should be placed, with the respective number at the end of the main text of the article, after the references, and also in the product supplement document according to the instructions which will be provided at the time of submission. Captions should be succinct, but self-explanatory, with clear information, in order to dispense consultation to the text.

Tables: tables with their legends should be typed double-spaced, with a short title and descriptive and submitted in a separate file as a supplement. All tables should be numbered in order of appearance in the text. The caption should appear in its upper part, preceded by the word table, followed by the serial number in the text, in Arabic numerals (e.g. Table 1, table 2, and so on). They must preferably show information on statistical processing. The titles of the tables should be self-explanatory,

so that tables are understood without consulting the text. More detailed or specific explanations should be provided in footnotes, identified by symbols in the following sequence: \*, +, ±, §, ||, ¶, \*\*, ++, ±±. No underlining or drawing of lines within the tables should be done, and no space to separate columns should be used. No space should be left on either side of the ± symbol.

### SUBMISSION PREPARATION CHECKLIST

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

The contribution must be original and unpublished, and not be in the process of evaluation for publication by any other magazine; otherwise, it must be justified in comments to the editor.

The submission file must be in extension .doc, .txt or .rtf, source Times New Roman, size 12, with double spacing throughout the whole document (including abstract, acknowledgments, references, and tables), with margins of 2.5 cm. All pages should be numbered in the top right-hand corner.

In the event of submission to a peer review section (e.g. articles), the instructions that are available in the Ensuring the blind peer review must be followed.

Under Methods, the requirements for approval by a Committee of ethics in research should be made quite explicit (in case original studies on humans or animals, including case reports).

The authors of the studies must be informed about the editorial policy of the Journal, and must have read the whole manuscript (including the articles of their co-writers) and must state that they all agree with the contents of the work being submitted.

### COPYRIGHT NOTICE

#### Declaration

#### Transfer of Copyright

The author hereby declares that the article entitled "TITLE OF THE ARTICLE" approved for publication in the Journal of Health and Biological Sciences is an original work that has not been published or is being considered for publication elsewhere, that is in print or electronic.

The author's manuscript quoted above also states (m):

I certify that I have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content.

I declare that the use of any trademark or copyright in the manuscript has been credited to its owner or permission to

use the name was given, if necessary.

I declare that I agree that the copyright for the article referenced above will become the exclusive property of the Journal of Health and Biological Sciences - JHBS, any form of reproduction, in whole or in part, in any form or means of disclosure, printed or electronic, without the prior authorization is required, and, if obtained, I include my thanks to the Journal of Health and Biological Sciences - JHBS.

The original submission to the Journal of Health and Biological Sciences (JHBS) imply transfer by authors, printed and digital publishing rights.

Signature of author

First Author: \_\_\_\_\_

Signature: \_\_\_\_\_

Address: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Co-Author: \_\_\_\_\_

Signature: \_\_\_\_\_

Address: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Co-Author: \_\_\_\_\_

Signature: \_\_\_\_\_

Address: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Note: All persons listed as authors must sign this statement and signed statements will not be accepted by others. The original statement shall be signed, dated and sent to the address below or by email:

### **JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES & HEALTH**

Vereador Paulo Mamede Street,

#130 - 5th floor - Neighborhood: Cocó

Fortaleza – Ceará

ZIP CODE: 60.192-350

Phone: +55 (85) 3265-8109; Ext: 8109

e-mail: secretaria.jhbs@unichristus.edu.br

### **Privacy Statement**

The names and addresses provided in this journal will be used exclusively for the services rendered by this publication and will not be made available for other purposes or to third parties.

### **Creative Commons (Electronic version)**

The contents of this open access journal are licensed under the terms of Creative Commons Attribution License 3.0.

