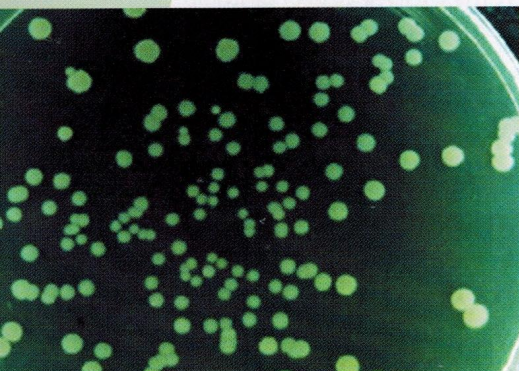


Avaliação do mecanismo de lesão celular causada por um adesivo dental

Marco Antônio MASIOLI¹
 Kátia Regina Hostilho Cervantes DIAS²
 Claudia Ribeiro SILVA³
 Mário BERNARDO-FILHO⁴



Palavras-chave: Adesivo dental, citotoxicidade, *Escherichia coli*.

RESUMO

Visa a determinar em quais concentrações o adesivo dental Prime e Bond 2.1 (P&B) (Dentisply) promove citotoxicidade em culturas celulares e a verificar a importância do mecanismo de reparo por recombinação e excisão em lesões causadas pelo P&B no ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano. Os experimentos foram feitos repetidamente, e, analisando a população celular estudada, concluímos: a) o etanol 50% (diluente e controle) foi inerte; b) houve uma redução significativa na viabilidade celular com o aumento do tempo de tratamento e da concentração do P&B; c) a cepa BW9091 foi a mais sensível ao P&B e a AB1157 a mais resistente; d) a citotoxicidade do P&B é, provavelmente, causada devido à liberação de espécies reativas de oxigênio no meio de tratamento.

INTRODUÇÃO

Os materiais restauradores dentais devem ser analisados não somente por suas características físicas, químicas e estéticas, mas também por sua biocompatibilidade.

Há algumas décadas, estudos levaram a crer que os efeitos adversos à polpa eram decorrentes das propriedades químicas dos cimentos de silicatos e resinas

acrílicas e que o baixo pH desses produtos levaria a irritações pulpares que poderiam variar de branda a severa (Retief et al., 1974; Stanley et al., 1975; Zander & Pejko, 1947).

Outros estudos mostraram que os maiores responsáveis pela irritação pulpar seriam os microorganismos e não as propriedades químicas dos materi-

Data de recebimento: 15-12-00
 Data de aceite: 08-05-01

¹Mestre em Dentística pela UERJ.

²Professora adjunta FO-UERJ, FO-UFRJ.

³Mestre em Biologia.

⁴Professor titular UERJ.

ais. Esses microorganismos chegariam até a dentina devido a uma adaptação deficiente das restaurações (Brannstrom & Nordenvall, 1978; Fujitani et al., 1992; Fusaïama, 1987; Pashley, 1992; Tsuneda et al., 1992).

A potencialização da irritação pulpar, quando da utilização de materiais restauradores, principalmente os que necessitam de condicionamento ácido prévio, pode ser explicada pelo fato de que o baixo pH desses materiais promove uma abertura dos túbulos dentinários, facilitando a chegada à polpa dos microorganismos que causam irritação pulpar. Esse fato foi atenuado com o advento dos adesivos hidrofílicos e da hibridação dentinária.

A hibridação dentinária, pela técnica de ataque ácido total, inicialmente, gerou controvérsias, mas foi ganhando espaço em todo o mundo e, atualmente, é tida como procedimento clínico de escolha em cavidades com remanescente dentinário de até 0,5mm. Na ausência desse remanescente dental mínimo, haveria necessidade de protetores à base de hidróxido de cálcio e ionômero de vidro (Encontro..., 1997).

Alguns autores (Baratieri et al., 1995; Heitmann & Unterbrink, 1995) relatam sucesso clínico quando da utilização dos sistemas adesivos diretamente em contato com a polpa. Por outro lado, testes *in vitro* mostram que os componentes dos adesivos dentinários são citotóxicos (Hanks et al., 1992; Hashieh et al., 1999; Jontell et al., 1995; Masioli et al., 1999; Ratanasathien & Hanks, 2000; Ratanasathien et al., 1995; Santos et al., 1999). Outros relatam que, devido à hidrofília das novas gerações de adesivos, eles penetram na

dentina, podendo, em cavidades profundas, chegar ao tecido pulpar (Brandi et al., 1989; Gersina & Hume, 1995). Afirmam que o seu uso deve ser evitado em algumas situações, pois pode causar reações adversas ainda não estudadas. Devido à escassez de informações científicas sobre um assunto polêmico, como é o da aplicação dos sistemas adesivos como capeador pulpar, essas novas tendências são repassadas para alunos de graduação, pós-graduação e para clínicos, sem o necessário embasamento (Consolaro, 1997; Mondelli, 1998).

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos determinar em quais concentrações os sistemas adesivos promovem citotoxicidade em cepas

bacterianas de *Escherichia coli* e estudar a importância do mecanismo de reparo por recombinação e excisão em lesões causadas pelo adesivo dental P&B no DNA bacteriano.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, utiliza-se o adesivo dental Prime e Bond 2.1 (P&B) (Dentisply, Brasil) em diferentes concentrações. O diluente utilizado foi o etanol a 50%.

Para crescimento das culturas, foi utilizado meio LB estéril (Quadro 1). O meio gelosado foi obtido pela adição de ágar (15g/l), antes da esterilização, efetuada em autoclave, por 25min a 120°C (Alcantara-Gomes, 1979). Para ressuspensão e lavagem por centrifugação e diluição das culturas, foram utilizadas soluções estéreis de NaCl 0,9% (Silva, 1995).

QUADRO 1 - Meio de cultura LB

Reagentes	Quantidade
NaCl	10g
Bacto-Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
Água destilada e deionizada (qsp)	1000ml

CEPAS BACTERIANAS

As cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas nos experimentos e suas características genéticas de maior relevância para este trabalho estão relacionadas no Quadro 2.

QUADRO 2 - Cepas de *Escherichia coli*

Designação	Marcadores Genéticos de Reparação	Auxotrofias	Referências
AB1157	Selvagem	Thr/leu/por/his/arg/thi/la	Howard-Flanders, c/gal/ara/xyl/mtl/rps Simson & Theriot, 1965
AB2463	RecA ⁻	Thr/leu/por/his/arg/thi	Howard-Flanders, Simson & Theriot, 1966
BW9091	XthA ⁻	Thr/leu/por/his/arg/thi lac/gal/ara/xyl/mtl/rps	Demple, Halbrook, Linn, 1983

Culturas para experimento

Para a preparação dos estoques bacterianos de *Escherichia coli* em "stab", foram utilizados os estoques glicerinados, contendo volumes iguais de cultura bacteriana em fase estacionária e glicerol 100%, os quais eram conservados em refrigerador a -20° C (Alcantara-Gomes, 1979). Uma alíquota (100ml) do estoque de *Escherichia coli*, em glicerol, era colocada em um erlenmeyer estéril de 50ml, contendo 10ml de meio LB líquido estéril, o qual era mantido a 37°C, em banho-maria, com agitação constante por quinze a dezoito horas, período necessário para a cultura atingir a fase estacionária de crescimento (cultura pernoite ou pré-cultura). Dessa cultura pernoite, eram obtidas culturas para experimento, transferindo-se 200ml dessa cultura para um erlenmeyer de 250ml, contendo 20ml de meio de cultura LB, sendo esta colocada em banho-maria a 37°C com agitação constante por duas a três horas, até ser atingida a fase exponencial ($1-2 \times 10^8$ células/ml).

O crescimento era acompanhado por meio da turbidância em fotocolorímetro, equipado com filtro vermelho (Metronic Colorímetro Fotoelétrico M2, Rio de Janeiro, Brasil), que era acompanhado em valores constantes em curva de crescimento, previamente analisada para a cepa em questão. Dessa forma, acompanhávamos o valor da turbidância a ser atingida para obtermos a concentração de células desejada.

Após esse procedimento e para a realização dos experimentos, iniciou-se a centrifugação das culturas por quinze minutos, a 7200rpm, 4°C em centrífuga "Sorvall" modelo SS-L DA "Newton-Connecticut", EUA, Rotor nº 6122

A. Em seguida, o precipitado era ressuspenso em solução estéril de NaCl 0,9%, sendo essa operação repetida duas vezes, sob as mesmas condições, para a eliminação do meio de crescimento. O precipitado era, então, ressuspenso em solução estéril de NaCl 0,9% estéril e a turbidância corrigida para o valor desejado.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para detecção do potencial citotóxico dos adesivos dentinários, alíquotas (1ml) de uma suspensão bacteriana de *Escherichia coli* em NaCl 0,9% estéril, na fase exponencial de crescimento, eram distribuídas em tubos de ensaio com rosca e misturados com 100ml de adesivo dentinário em determinada concentração ou com etanol 50% estéril (controle). Agitava-se o tubo de ensaio e retirava-se dele uma alíquota dessas soluções para ser diluída em NaCl 0,9% estéril e plaqueada em LB gelosado (tempo 0).

A incubação da suspensão bacteriana, com adesivo dentinário diluído e com etanol 50%, era realizada nos tubos de ensaio com rosca, a 37°C, com agitação constante, por 60 minutos. A cada intervalo de 20 minutos, alíquotas eram retiradas e diluídas em NaCl 0,9% estéril e plaqueada em meio

LB gelosado. Para tais alíquotas, 100ml das preparações bacterianas, convenientemente diluídas, eram colocadas no centro da placa de Petri com LB gelosada. Em seguida, colocavam-se algumas pérolas de vidro estéreis sobre a alíquota e agitava-se a placa em movimentos longitudinais e circulares, para distribuição uniforme do volume na superfície da placa. As placas eram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por períodos nunca inferiores a 24 horas, conforme determinado em trabalhos anteriores (Silva, 1995). As UFC eram, então, contadas, tomando-se como valor em cada ponto a média das placas que eram feitas em duplicatas.

Uma vez obtido o número de sobreviventes em cada tempo (Fig. 1), as frações de sobrevivência ($FS = N_t/N_0$) eram calculadas, dividindo-se o número de células viáveis por mililitro em cada tempo (N_t), pelo número de células viáveis no tempo zero (N_0). Construía-se o gráfico, colocando-se no eixo das abscissas (escala linear) os intervalos de tempo e no das ordenadas (escala logarítmica), as FS, obtendo-se, dessa forma, a curva representativa da inativação da cepa bacteriana. As diferentes etapas desse procedimento podem ser observadas na Fig. 2.

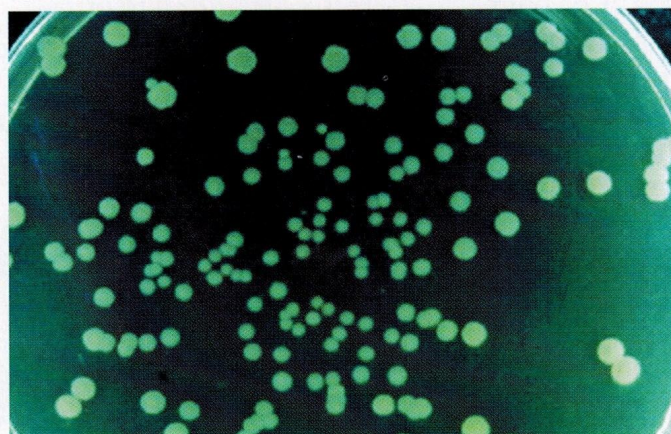
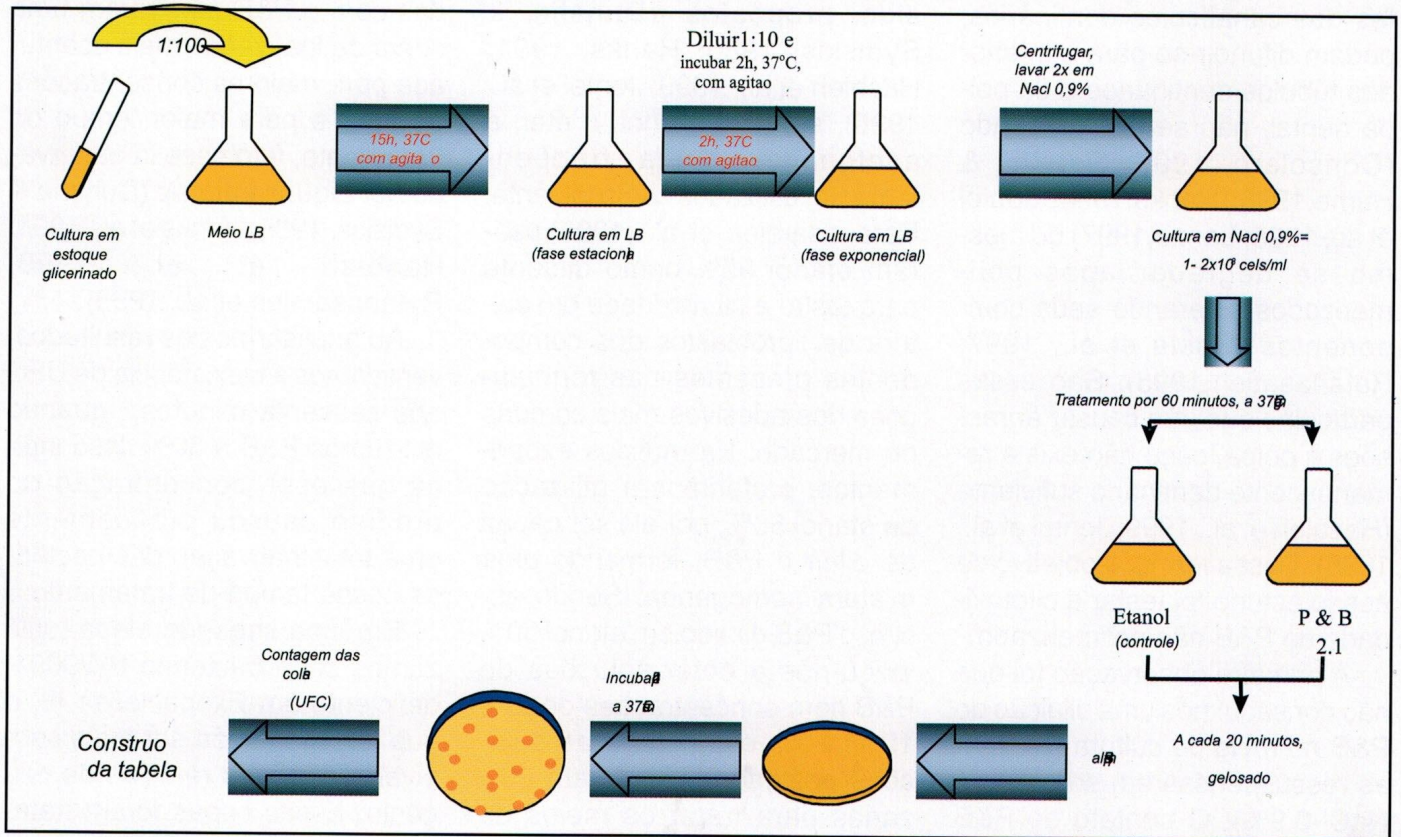


Fig. 1 - Aspecto das colônias após experimento concluído

Fig. 2 – Curva de sobrevivência: detecção do potencial citotóxico do P&B



RESULTADOS

Potencialidade citotóxica das diferentes concentrações de um adesivo dental em cultura de *E. coli* AB1157, BW9091 e AB2463

Foi analisada a sobrevivência em culturas bacterianas (*Escherichia coli*) AB1157 (selvagem), BW9091 (cepa sensível a agentes oxidantes), AB2463 (rec) expostas aos adesivos dentais em diferentes concentrações.

Os resultados apresentados nas Figs. 3, 4 e 5 mostram que o adesivo dental, nas concentrações utilizadas, reduziu a sobrevivência da cultura de *Escherichia coli* AB1157, BW9091 e AB2463. Observa-se que há um aumento da inativação, à medida que utilizamos soluções mais concentradas do adesivo e, também, com o aumento do tempo de exposição da cultura ao agente. Tam-

bém pôde ser visto que o diluente etanol 50% não foi capaz de alterar a sobrevivência da referida cultura bacteriana.

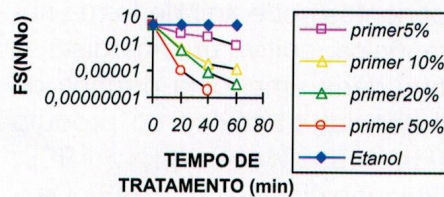


Fig. 3 - Curva de sobrevivência de *E. coli* ab 1157 tratadas com diferentes concentrações de prime e bond 2.1

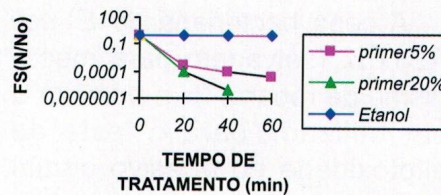


Fig. 4 - Curva de sobrevivência de *E. coli* bw 9091 tratadas com diferentes concentrações de prime e bond 2.1

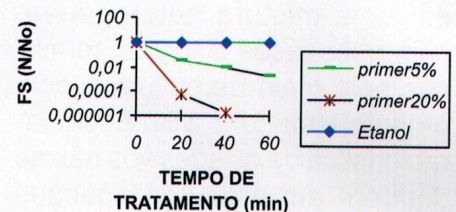


Fig. 5 - Curva de sobrevivência de *E. coli* ab2463 tratadas com diferentes concentrações de prime e bond 2.1

DISCUSSÃO

O uso de bactérias para testes em laboratório vem sendo muito utilizado por ser de baixo custo, não necessitar de cobaias e devido à possibilidade de se trabalhar com uma população homogênea. Dessa forma, esses testes são uma opção antes de serem iniciados os testes com humanos ou com outros animais.

No processo de polimerização do sistema adesivo, suas partícu-

las, principalmente aquelas em contato com os fluidos emergentes dos canalículos dentinários, podem difundir-se para o interior dos túbulos dentinários e da polpa dental, não se polimerizando (Consolaro, 1997; Gersina & Hume, 1995; Hanks, 1994; Jontel et al., 1995; Lanza, 1997) ou mesmo se degradar após polimerizados, liberando seus componentes (Costa et al., 1997; Ratanasathien, 1995). São essas partículas que irão causar agressões à polpa, caso não exista remanescente dentinário suficiente (Hashieh et al., 1999; Jontel et al., 1995). Dessa forma, o objetivo de nosso estudo foi testar a citotoxicidade do P&B não polimerizado.

A primeira observação foi que não conseguimos uma diluição do P&B no meio de cultura (bactérias ressuspensas em solução de NaCl-0,9%). O contato do P&B com o meio de cultura resultava em uma mistura heterogênea, com duas fases distintas, formadas pelo meio de cultura e pelo produto testado (P&B). Essa característica de os adesivos não se diluírem em produtos aquosos pode justificar os achados de Lanza (1997) ao estudar o uso dos adesivos diretamente sobre a polpa, onde observou grande quantidade de material resinoso dentro do tecido pulpar, não permitindo o estabelecimento da fase reparatória.

Em nossos experimentos, não utilizamos o P&B, mas soluções desse produto em etanol 50%, para que ocorresse a solubilização da solução do adesivo no meio de cultura. A utilização do P&B diluído serve também para observar em quais concentrações o produto utilizado seria citotóxico às cepas bacterianas utilizadas.

Testes de citotoxicidade com diferentes diluições de adesivo têm sido propostos (Dunsha & Sydiskis, 1985; Hanks, 1991; Hashieh et al., 1999; Jontel et al., 1995), sendo o etanol, o éter, a acetona e a água, frequentemente, utilizados como diluente. Ratanasathien et al. (1995) usaram etanol 95% como diluente para testar a citotoxicidade em cultura de fibroblastos dos componentes presentes nas formulações dos adesivos mais comuns no mercado. Em nossos experimentos, preferimos a utilização de etanol 50%, por ele ser capaz de diluir o P&B, formando uma mistura homogênea. Sendo assim, o P&B diluído em etanol 50% levou-nos a obter soluções de P&B com concentrações de 5%, 10%, 20% e 50%. Essas soluções posteriormente foram utilizadas para tratar os meios de cultura.

Estudos têm mostrado que não se deve mensurar os efeitos citotóxicos dos adesivos analisando seus componentes individualmente, pois a interação dos componentes pode agir de forma antagonista, aditiva ou sinérgica, o que daria uma idéia errônea do potencial citotóxico do produto (Hashieh et al., 1999; Ratanasathien et al., 1995). Dessa forma, utilizamos o produto como é vendido comercialmente, diluído em etanol 50% pelos motivos já mencionados.

A cepa bacteriana de *E. coli* AB1157 (selvagem para mecanismo de reparo) foi a primeira a ser utilizada para o teste de citotoxicidade do adesivo dental P&B nas concentrações de 5%, 10%, 20% ou 50% ou com etanol 50% (controle).

Após a contagem das placas, observou-se que o etanol não

apresentou efeito letal sobre a cultura tratada. As culturas tratadas com o P&B mostraram uma curva de inativação mais acentuada para maiores concentrações do P&B e para maior tempo de tratamento, fato esse já observado por alguns autores (Dunsha & Sydiskis, 1985; Hanks et al., 1991; Hashieh et al., 1999; Ratanasathien et al., 1995).

Ao analisarmos os resultados, verificamos a inexistência de UFC aos sessenta minutos, quando utilizamos P&B a 50%. Isso indica que essa concentração do produto causou praticamente uma total inativação das bactérias nesse tempo de tratamento.

Em uma segunda etapa, utilizamos cepa bacteriana BW9091, deficiente em Exonuclease III, o que faz essa cepa ser mais sensível a espécies reativas de oxigênio. Essas cepas foram tratadas com o mesmo P&B em concentrações de 5%, 20% e 50%.

Ao analisarmos os resultados, verificamos que essa cepa se mostrou mais sensível que a AB1157, quando comparamos as concentrações utilizadas nos diferentes tempos. Isso nos faz supor que a citotoxicidade do produto testado pode estar relacionada com a liberação de espécies reativas de oxigênio no meio de cultura. Quando utilizamos o P&B a 50%, só encontramos UFC no tempo zero, o que impossibilitou a definição de uma curva de inativação. Cotran et al. (1989) citam os radicais livres como um dos agressores às células e aos tecidos. Hanks et al. (1991) mencionam que componentes dos adesivos dentais poderiam se ligar a moléculas da membrana celular, o que facilitaria a ação dos radicais livres a inibir o processo de síntese do DNA.

Posteriormente, suspensões contendo culturas da cepa AB2463 foram tratadas com P&B em concentrações de 5% e 20%. A curva de inativação obtida na cepa AB2463 foi mais acentuada que para a AB1157, porém a cepa AB2463 não se mostrou tão sensível ao tratamento com o P&B quanto a cepa BW9091. Os resultados indicam que a deficiência no mecanismo de reparo por recombinação não se faz tão nociva quanto a deficiência em exonuclease III, nas lesões causadas pelo P&B.

Embora muitos autores venham relatando ser a utilização dos sistemas adesivos em contato direto com o tecido pulpar uma técnica viável, devido à ausência de necrose ou sintomatologia dolorosa (Baratieri et al., 1995; Heitmann & Unterbrink, 1995), devemos resaltar que esse fato não pode ser traduzido como ausência de danos à polpa (Consolaro, 1997). A agressão causada pela presença do sistema adesivo em contato com a polpa pode não ser capaz de provocar necrose, mas, se os resultados de nossos experimentos ocorrerem também no tecido pulpar, poderá haver uma redução no número de células viáveis. Dessa forma, os adesivos atuariam como um acelerador do envelhecimento natural do tecido pulpar, ou potencializariam novas agressões, devido à redução de células viáveis do tecido pulpar.

CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos na curva de sobrevivência das diferentes cepas de *Escherichia coli* testadas com o P&B, podemos concluir: o P&B foi tóxico em todas as diluições,

causando diminuição do número de células viáveis em todas as cepas testadas; quanto maior a concentração do P&B testado, menor o grau de viabilidade celular; quanto maior o tempo de tratamento, menor o grau de viabilidade celular; a cepa AB1157 foi a mais resistente e a BW9091 a mais sensível ao tratamento, sugerindo que a toxicidade do adesivo testado seja devido à liberação de radicais livres no meio.

ABSTRACT

EVALUATION OF CELLULAR LESION MECHANISM CAUSED BY DENTIN

This study want to define in which concentration dental adhesive Prime e Bond 2.1 (P&B) (Dentisply) cause cytotoxicity in cells culture and verify the importance of repair mechanics in lesions caused by P&B in bacterial deoxyribonucleic acid (DNA). The experiments were done repeatedly. Considering the studied cell population, it is possible concluded: 1- the solvent ethanol 50% is inert; 2- occurred significant reduction in viable cells with the increasing of the treatment time and the concentration of P&B; 3- the cepa BW9091 was the most sensible for P&B and AB1157 the more resistant; 4- the cytotoxicity observed was probably caused by generation of reactive oxygen species in the treatment.

Keywords: Dental adhesive, cytotoxicity, *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA-GOMES, R. **Determinantes radiobiológicos da viabilidade celular.** 1979. Tese (Professor Titular) Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- BARATIERI, L. N. et al. **Estética:** restaurações adesivas diretas em dentes anteriores fraturados. São Paulo: Ed. Santos, 1995.
- BRANDI, G. et al. Role of hydroxyl radicals *Escherichia coli* killing induced by hydrogen peroxide. **Free Rad Res. Communic**, v. 6, p. 47-55, 1989.
- BRANNSTROM, M.; NORDENVALL, K. J. Bacterial penetration and pulpal reaction and the inter surface of concise enamel bond. composite fillings and unetched cavities. **J. Dent. Res.**, v. 57, n. 1, p. 3-9, 1978.
- CONSOLARO, A. Ácido e sistemas adesivos sobre a polpa dentária: uma abordagem crítica. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 54, n. 4, p. 198-203, 1997.
- COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; TEIXEIRAM, F. Estudo preliminar da compatibilidade biológica dos adesivos dentinários ALL-BOND 2 SCOTCHBOND MP: avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. **Rev. Odontol. USP**, v. 11, n. 1, p. 11-18, 1997.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBINS, S. L. **Pathologic bases of disease.** Philadelphia: W. B. Saunders, 1989.
- DUNSHA, T. C.; SYDISKIS, R. J. Citotoxicity testing of a dentin bonding system. **Oral Surgery**, v. 59, n. 6, p. 637-641, 1985.
- ENCONTRO DO GRUPO BRASILEIRO DE PROFESSORES DE DENTÍSTICA, 12., 1997, Vitória. **Anais...** Vitória: GBPD, 1997.
- FUJITANI, M.; INOKOSKI, S.; HOSODA, H. Effect of acid etching on the dental pulp in adhesive composite restorations. **Intern. Dent. Journal**, v. 42, n. 1, 1992.
- FUSAIAMA, T. Factors and prevention of pulp irritation by adhesive composite resin restoration. **Quint. Intern.**, v. 18, n. 9, p. 633-642, 1987.

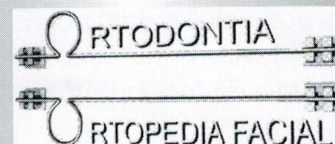
- 12 GERZINA T. M.; HUME W. R.
Effect of hydrostatic pressure on the diffusion of monomers through dentin *in vitro*. **J. Dent. Res.**, v. 24, n. 1, p. 369-373, 1995.
- 13 HANKS, C. T. et al. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. **J. Dent. Res.**, v. 70, n. 11, p. 1450-1455, 1991.
- 14 HANKS, C. T. et al. Delineation of cytotoxic concentration of two dentin bonding agents *in vitro*. **J. Endod.**, v. 18, n. 12, p. 589-596, 1992.
- 15 HANKS, C. T. et al. Permeability of biological synthetic molecules through dentine. **J. Oral Rehab.**, v. 21, p. 475-487, 1994.
- 16 HASHIEH, I. A. et al. *In vitro* cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. **J. Endod.**, v. 25, n. 2, p. 89-92, 1999.
- 17 HEITMANN, T.; UNTERBRINK, G. Direct pulp capping with a dentinal adhesive resin system: a pilot study. **Quint. Intern.**, v. 26, n. 11, p. 765-770, 1995.
- 18 JONTEL, M. et al. Effect of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 5, p. 1162-1167, 1995.
- 19 LANZA, L. D. **Avaliação clínica e microscópica de um sistema adesivo dental em proteções pulpares diretas de dentes humanos.** 1997. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 20 MASIOLI, M. A. et al. Participacion de los radicales libres en la citotoxicidad de un adhesivo dentário. In: REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION ODONTOLOGICA, 32., 1999, Mar del Plata. **Anais...** Mar del Plata: [s.l.], 1999.
- 21 MATTOS, J. E. et al. Avaliação clínica e histopatológica da polpa dental de humanos jovens 60 dias após seu condicionamento com ácido fosfórico a 37% e colocação de um sistema adesivo de quarta geração sobre a área da exposição. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 54, n. 4, p. 212-217, 1997.
- 22 MONDELLI, J. **Proteção do complexo dentina polpa.** São Paulo: Artes Médicas, 1998.
- 23 PASHLEY, D. H. The effects of acid etching on the pulpo-dentin complex. **Operative Dent.**, v. 17, p. 229-242, 1992.
- 24 RATANASATHIEN, S.; HANKS, C. T. The effect of a monomeric dental resin on odontoblastic functions *in vitro*. **J. Dent. Res.**, v. 79, p. 262, 2000.
- 25 RATANASATHIEN, S. et al. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. **J. Dent. Res.**, v. 74, n. 9, p. 1602-1606, 1995.
- 26 RETIEF, D. H.; AUSTIN, J. C.; FATTI, L. P. Pulpal response to phosphoric acid. **J. Oral Pathol.**, v. 3, p. 114-122, 1974.
- 27 SANTOS, E. M.; BUSSADORI, K. S.; JAEGER, M. M. M. In: REUNIÃO CIENTÍFICA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, 16, 1999, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: SBPqO, 1999.
- 28 SILVA, C. R. **Estudos dos efeitos do tecnécio-99m e do tecnécio 99 em *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium*.** 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- 29 STANLEY, H. R.; GOING, R. E.; CHAUNCEY, H. H. Human pulp response to acid pretreatment of dentin and to composite restoration. **JADA**, v. 91, p. 817-825, 1975.
- 30 TSUNEDA, Y.; HAYAKAWA, T.; YAMAMOTO, H. A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. **Operative Dent.**, v. 20, p. 223-229, Aug. 1994.
- 31 ZANDER, H. A.; PEJKO, I. Protection of the pulp under silicate cements with cavity varnishes and cement linings. **JADA**, v. 34, p. 811-819, 1947.

Correspondência para / Reprint requests to:
Marco Antônio Masioli
Rua Aleixo Neto, 454 - s/808/809 - Praia do Canto - Vitória - ES. 29055-200.
Telefax: (27) 3315-7511

ODONTOLOGIA ESTÉTICA

Dr. George Silva Alves

Cirurgião-Dentista - CRO 2426/ES
Mestrando em Prótese Dentária
pela UCCB-Campinas-SP
Professor de Prótese Dentária
do Curso de Odontologia - FAESA



Dr. Antonio Miguel

Cirurgião-Dentista - CRO 2535/ES
Especialista em Ortodontia
e Ortopedia Facial
"Membro da Sociedade dos
e Ortopedia Facial"

R. Chafic Murad, 655 - Bento Ferreira - Vitória - ES - 29.050-660. Tel: (27) 3225-9411