UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DIANA FERREIRA GADELHA DE ARAÚJO

**Comparação de diferentes pré-tratamentos de superfície na
remineralização de esmalte com flúor em tratamento de lesões com
mancha branca e sua resistência após desafio ácido**

BAURU
2016

DIANA FERREIRA GADELHA DE ARAÚJO

**Comparação de diferentes pré-tratamentos de superfície na
remineralização de esmalte com flúor em tratamento de lesões com
mancha branca e sua resistência após desafio ácido**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Dentística.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Linda Wang

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Magalhães

Versão Corrigida

BAURU
2016

Ar15c Araújo, Diana Ferreira Gadelha de
 Comparação de diferentes pré-tratamentos de
superfície na remineralização de esmalte com flúor
em tratamento de lesões com mancha branca e sua
resistência após desafio ácido / Diana Ferreira
Gadelha de Araújo. - Bauru, 2015.
 85 p. : il. ; 30 cm.

 Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientadora: Prof^a. Dr^a. Linda Wang

 Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Magalhães

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Aos **meus pais**, que todos os dias me incentivam a ser uma pessoa melhor que o dia anterior. Dedico especialmente à minha mãe, **Inamar**, por acreditar em mim mais do que eu mesma, e por nunca me permitir desistir perante os desafios da vida.

Ao meu companheiro de vida, **José Endrigo**, pelo amor, cumplicidade e pelo apoio durante toda esta jornada. Você esteve ao meu lado durante todos esses anos dividindo comigo todas as alegrias e tristezas, conquistas e derrotas.

À minha irmã, **Marina**, por ser sempre tão paciente comigo e tão cúmplice dos meus sonhos.

À minha querida **família Pinto Ferreira**, especialmente minha linda **Vó Inez** (*in memoriam*) por ter rezado tanto pedindo a Deus minha proteção e que tanto quis ver este momento chegar.

Só cheguei até aqui graças ao carinho que recebi. Amo vocês incondicionalmente!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço imensamente à minha orientadora Prof^a Dr^a Linda Wang por ter conduzido meus caminhos durante toda a pós-graduação. Obrigada por todos os ensinamentos, oportunidades e por ter acreditado e confiado no meu potencial. Professora, você é uma pessoa espetacular, de talento tremendo, generosidade absurda e de um caráter que se vê em poucas pessoas hoje em dia. Obrigada pela convivência e conselhos que foram além da relação acadêmica. Além de uma excelente orientadora, ganhei uma grande amiga. Me orgulho muito de ter sido sua aluna e espero um dia me tornar uma profissional tão competente quanto você. Muitíssimo obrigada! De coração!

AGRADECIMENTOS

Sempre agradecerei primeiramente **a Deus**, por me dar a força necessária para enfrentar e vencer essa caminhada cruzando todas as dificuldades que me foram impostas e por me abençoar todos os dias da minha vida. Sem o Teu amor, Senhor, eu nada seria.

À família que a vida me presenteou: **Adoniza, Aládia e Santa**, que tanto torcem por mim sempre. Obrigada por todo o carinho e amor que recebo, pela atenção e pelo cuidado comigo. Vocês são muito importantes na minha vida.

A todos os demais **familiares e amigos** queridos que acompanharam meu trajeto e de alguma forma participaram e me incentivaram nessa caminhada tão árdua.

Às “roommates” e amigas mais que especiais que Bauru me deu: **Marina, Kiki e Larissa**. Obrigada por terem sido minha família em Bauru durante o doutorado. **Marina**, obrigada por ter sido minha parceira desde o dia em que nos conhecemos, pelos conselhos e pela força que você sempre me deu. **Kiki**, obrigada pela amizade, pela sensatez e por tudo o que você fez por mim durante minha pesquisa; sem a sua ajuda este trabalho jamais teria se concretizado. **Larissa**, obrigada pela alegria, sinceridade e generosidade. Às três, obrigada por terem sido um sopro de alegria nos meus dias durante essa jornada acadêmica.

Aos **colegas de turma de doutorado**, pelos bons momentos de convívio, pelo aprendizado conjunto e pelo respeito mútuo que sempre tivemos entre nós.

Aos “**lindinhos**”, obrigada pela parceria em tantos momentos. Especialmente agradeço a Marina Giacomini, Larissa Chaves e Marília Velo.

À Profª Drª **Ana Carolina Magalhães**, pela co-orientação neste trabalho. Obrigada por ter nos auxiliado a desvendar a metodologia e por ser sempre tão disponível na resolução das nossas dúvidas.

Aos **professores do Departamento de Dentística**, obrigada por todos os ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e pela confiança depositada no meu trabalho durante este período de Pós-Graduação. Agradeço especialmente à professora **Maria Teresa Atta**, por ser meu exemplo de dedicação e amor à graduação; a senhora contribuiu imensamente para que eu me tornasse a profissional que sou hoje.

Ao Prof. Dr. **Heitor Marques Honório** por contribuir sempre de forma tão valiosa para a construção do meu trabalho. Obrigada pela presteza nas minhas solicitações e na atenção para comigo.

Aos **funcionários do Departamento de Dentística**, por serem tão solícitos às nossas necessidades. Agradeço especialmente a **Audria, Natália e Nelson**, por toda a alegria e palavras de carinho que sempre recebi de vocês durante esses anos, e à **Rita**, por ser a secretária mais eficiente que já conheci na vida.

Às funcionárias do laboratório de Bioquímica, **Thelma e Larissa**, pela ajuda e colaboração nos meus dias de trabalho na bioquímica. Agradeço especialmente à **Larissa** pela contribuição direta que deu na execução desta pesquisa.

Aos demais **funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru**, que de alguma forma me auxiliaram durante minha Pós-Graduação.

À **Fernanda Sandes**, que como aluna de Iniciação Científica contribuiu de maneira fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada por ter colaborado tão eficazmente com a etapa experimental e por ter sido tão solícita em ajudar nos momentos em que estive ausente.

À doutoranda **Beatriz Souza**, essencial para a realização deste trabalho. Obrigada por ter sido sempre tão prestativa e paciente e pela ajuda fundamental na realização das análises em TMR.

Aos **colegas professores da UFRN** que me apoiaram nesta fase final do doutorado compreendendo minhas ausências quando foram necessárias.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, que há seis anos me acolheu de portas abertas como aluna de Pós-Graduação.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)**, instituição a qual devo minha formação como profissional e na qual dou meus primeiros passos como docente.

À **Capes** pelo auxílio financeiro através da bolsa de doutorado.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

RESUMO

A aplicação de flúor tópico é a principal estratégia de natureza química para a remineralização de lesões incipientes (LI) clinicamente visíveis como manchas brancas (MB) por cárie. Abordagens para aumentar a retenção de F no substrato pode favorecer sua ação e para isso, tratamentos prévios da superfície do esmalte podem ser usados. O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade de remineralização do flúor sem e com pré-tratamento do esmalte com ácido fosfórico e nitrato de alumínio e a sua resistência após novo desafio. Sessenta espécimes de esmalte bovino foram preparados (6mm x 4mm) e selecionados por meio de análise de microdureza de superfície (MS). LI foram produzidas através de ciclagem Desmineralização-Remineralização (DES-RE) e os espécimes divididos aleatoriamente em cinco grupos, de acordo com o tratamento (n=12): V- controle (verniz de fluoreto de sódio 5% por 4 horas), F (sem pré-tratamento); P-F (condicionamento ácido com ácido fosfórico por 30s); Al-F (nitrato de alumínio a 0,05M por 1min); P-Al-F (condicionamento com ácido fosfórico a 37% + nitrato de alumínio a 0,05M). Os tratamentos foram repetidos semanalmente durante quatro semanas. Após o tratamento, os espécimes foram submetidos à nova ciclagem ácida. Após cada etapa, nova MS foi realizada e ao final das análises, um corte transversal dos espécimes foi realizado. Uma das metades foi submetida à análise da microdureza longitudinal (ML) e a outra preparada para realização da microrradiografia transversal (TMR) para a análise de conteúdo mineral perdido. O percentual de perda de dureza de superfície (%PDS) foi analisado por ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas e Tukey e o percentual de perda de dureza longitudinal (%PDL) por ANOVA a 3 critérios de medidas repetidas e Tukey ($p<0,05$). Os dados de TMR no parâmetro LD (profundidade da lesão) foram analisados por ANOVA a dois critérios ($p<0,05$). Os resultados mostraram que a ciclagem DES-RE resultou em significante %PDS e %PDL em todos os grupos. Grupo F revelou menor perda de MS após tratamento e, F, Al-F e P-Al-F, mostraram menor perda de dureza final, após o novo desafio ácido. Na análise de %PDL, o grupo V apresentou menor perda de dureza final quando comparado com os demais grupos, nas diferentes profundidades. A análise do conteúdo mineral não revelou nenhuma diferença entre os tratamentos e fases. Nenhum dos pré tratamentos propostos foram capazes de otimizar a atuação do gel APF na remineralização de MB.

Palavras-chaves: Esmalte Dentário. Flúor. Microrradiografia. Remineralização Dentária. Testes de Dureza.

ABSTRACT

Comparison of different pretreatments on remineralization of enamel white spot lesions with fluoride and its resistance after new acidic challenge

The topical fluoride is the main chemical strategy to remineralize incipient caries lesions (ICL) visible as carious white spot lesions (WSL). Approaches to increase the fluoride retention may favor its action and therefore, enamel pretreatments can be used for this purpose. The aim of this study was to compare the potential of fluoride remineralization with and without previous enamel pretreatment with aluminum nitrate and phosphoric acid as well as their resistance after a new acid challenge. Sixty bovine enamel specimens were prepared (6mm x 4mm) and selected by the surface hardness (SH) analysis. The ICL were produced using DE-RE cycling and the specimens were randomized in five groups, according to the treatment (n=12): V-control (5% sodium fluoride varnish during 4h), and four groups previously pretreated with topical application of acidulated phosphate fluoride (APF) during 4min: F (without pretreatment), P-F (phosphoric acid etching during 30s), Al-F (0.05M aluminum nitrate during 1min); P-Al-F (phosphoric acid etching + aluminum nitrate). The treatments were performed weekly during four weeks. After the treatment, the specimens were submitted to the new acid challenge. After each step, a new SH analysis was performed followed by the transversal cut of the specimens. A half was submitted to the longitudinal cross-sectional hardness analysis (LH) and the other half was prepared to transverse microradiography assessments (TMR) to determine the loss of mineral content. The percentage of surface mineral loss (%SH) was analyzed using two-way repeated-measures ANOVA and the percentage of cross-sectional mineral loss (%LH) by the three-way repeated-measures ANOVA and Tukey ($p<0.05$). Data of TMR analysis by LD (lesion depth) parameter was analyzed with two-way ANOVA ($p<0.05$). The results showed significant %SH and %LH after DE-RE cycling for all groups. F group showed the lowest %SH after treatment, with no significant difference to Al-F and P-Al-F after the new acid challenge. V group showed the lowest %LH compared to the other groups, in the different depths, suggesting more resistance. Mineral content assessment did not reveal any difference among treatments and phases. None pretreatments were able to increase the potential of fluoride remineralization.

Key words: Dental Enamel. Fluoride. Microrradiography. Dental Remineralization. Hardness Tests.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** - Desenho esquemático da sequência de corte para obtenção do espécime38
- Figura 2** - Desenho esquemático da sequência de etapas da parte experimental.....40
- Figura 3** - Visualização da lesão de mancha branca em esmalte bovino após microrradiografia.....42

- GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Gráfico representativo da relação entre PDL e profundidade54
-
-

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADROS

Quadro 1 - Composição das soluções utilizadas na ciclagem DES-RE	41
Quadro 2 - Protocolos de remineralização	43
Quadro 3 - Composição da saliva artificial	43

- TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvio padrão do percentual de perda de dureza de superfície (% PDS) entre cada etapa comparada aos valores de dureza da condição hígida.....	51
Tabela 2 - Médias e desvio padrão da perda de dureza longitudinal (% PDL) entre cada etapa comparada aos valores de dureza da condição hígida	52
Tabela 3 - Valores e desvio padrão da quantificação mineral em relação à de profundidade de lesão (LD).....	54

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância
s	Segundo(s)
MS	Microdureza de superfície
ML	Microdureza longitudinal
MB	Mancha branca
APF	Flúor fosfato acidulado
TMR	Microrradiografia transversal
KHN	Número de dureza Knoop
mm	milímetro(s)
µm	micrômetro(s)
g	grama(s)
DES	desmineralização
RE	remineralização
pH	potencial hidrogeniônico
mM	milimolar
mol/l	mol por litro
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto
%PDS	percentual de perda de dureza de superfície
%PDL	percentual de perda de dureza longitudinal
s	segundo(s)
min	minuto(s)
cm	centímetro(s)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	<i>Lesões incipientes de mancha branca – evolução natural e sua simulação artificial em esmalte</i>	<i>21</i>
2.2	<i>O flúor no tratamento remineralizador do esmalte: histórico, mecanismo de ação e formas de aplicação.....</i>	<i>25</i>
2.3	<i>Estratégias de otimização da ação do flúor</i>	<i>27</i>
3	PROPOSIÇÃO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	<i>Delineamento experimental</i>	<i>37</i>
4.2	<i>Seleção e preparo dos dentes.....</i>	<i>37</i>
4.3	<i>Polimento do esmalte de dentes bovinos</i>	<i>38</i>
4.4	<i>Análise de microdureza de superfície do esmalte inicial</i>	<i>39</i>
4.5	<i>Indução de lesão de cárie artificial em esmalte</i>	<i>40</i>
4.6	<i>Protocolos de tratamento remineralizador.....</i>	<i>42</i>
4.7	<i>Análise da microdureza de superfície após o tratamento remineralizador.....</i>	<i>44</i>
4.8	<i>Novo desafio ácido</i>	<i>44</i>
4.9	<i>Análise da microdureza de superfície final do esmalte.....</i>	<i>44</i>
4.10	<i>Corte longitudinal dos espécimes.....</i>	<i>44</i>
4.11	<i>Análise de microdureza longitudinal do esmalte.....</i>	<i>45</i>
4.12	<i>Processamento dos dados</i>	<i>45</i>
4.13	<i>Microrradiografia transversal</i>	<i>46</i>
4.14	<i>Análise estatística.....</i>	<i>47</i>
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICES.....	81

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A partir do entendimento do mecanismo de formação de lesões dentárias provocadas pela doença cárie, a intervenção precoce tornou-se clinicamente possível, por meio da paralisação e regressão da doença e de lesões em estágio inicial, desde que os fatores etiológicos também fossem revertidos (QUENSEL et al. 1954; MALTZ, JARDIM, ALVES, 2010). A abordagem dessas lesões incipientes não-cavidades, detectadas como manchas brancas caracterizam a Odontologia de mínima intervenção. (KATZ et al., 2013).

As manchas brancas correspondem ao primeiro sinal clínico da doença cárie, consistindo em lesões subsuperficiais no esmalte dentário (SONI, BRUDEVOLD, 1959; ROBINSON, 2009; NAHSAN et al., 2011). Este fenômeno resulta de uma alteração no ciclo DES-RE, fazendo com que a DES prevaleça em relação à RE (MORENO, ZAHRADNIK, 1979; BUZALAF et al., 2011; KIM et al., 2013). Estas lesões se caracterizam pelo aumento na porosidade entre os cristais, devido, sobretudo, à perda de íons cálcio e fosfato (SONI, BRUDEVOLD, 1959; ROBINSON, 2009), que criam espaços posteriormente preenchidos por ar e água, cujo índice de refração difere do esmalte. Como resultado, esse fenômeno acarreta na perda de translucidez da superfície dentária e na percepção óptica de manchas brancas opacas (SONI, BRUDEVOLD, 1959; KIM et al., 2013).

Laboratorialmente, é possível reproduzir esse desequilíbrio e induzir o surgimento de lesões de mancha branca artificiais. Diferentes protocolos são descritos na literatura, dentre os quais o processo de ciclagem desmineralização-remineralização (DES-RE) utiliza ciclos alternados de desmineralização e remineralização, aproximando-se das condições reais de surgimento da lesão cáries (VIEIRA et al., 2005; QUEIROZ et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009). A produção dessas lesões artificiais permitem o estudo de procedimentos preventivos ou intervenções precoces na estrutura dentária (JARDIM, PAGOT e MALTZ, 2008; LEE et al., 2010; AMAECHI et al., 2013).

Nos processos que visam à remineralização e diminuição da progressão da perda mineral, o flúor surge como um método efetivo (MORENO e ZAHRADNIK, 1979; ATTIN et al., 1995; MESINKAI et al., 2012). Este íon atua na tentativa de retardar a progressão da lesão e reestabelecer as condições iniciais. Em altas

concentrações, o fluoreto é adsorvido na superfície do esmalte sob a forma de fluoreto de cálcio (CaF_2), atuando como um reservatório de íons Ca^{2+} e fluoreto. Em situações de queda do pH, esse composto se dissocia liberando os íons que atuam no processo de remineralização da estrutura dentária (BUZALAF et al., 2011).

O flúor é efetivo principalmente pela sua ação tópica, após ser fornecido ao meio através de água de abastecimento, dentifrícios ou através de aplicação profissional (HELLWING e LENNON, 2004; BUZALAF e WHITFORD, 2011; MORON et al., 2013b).

Por esse mecanismo, o uso contínuo do flúor em baixas concentrações para pacientes de baixo risco, se torna uma estratégia interessante para a rotina diária. Em pacientes de alto risco, esta aplicação pode ser realizada clinicamente, pode ser efetuada sob diferentes formas de fluoreto, destacando-se o gel de flúor neutro na concentração de 2% (NaF), o gel de flúor fosfato acidulado na concentração de 1,23% (APF) e o verniz fluoretado (5% de fluoreto) (LEE et al., 2010). Independente da concentração utilizada, o pH do produto utilizado pode influenciar nos resultados obtidos após o tratamento remineralizador (MAGALHÃES et al., 2010; GONZALES-CABEZAS et al., 2012; MORON et al., 2013b), já que o baixo pH pode promover uma desmineralização parcial do esmalte, criando sítios que aumentam a difusão da lesão e, conseqüentemente, a capacidade de armazenamento de CaF_2 (GONZALES-CABEZAS et al., 2012).

Na tentativa de otimizar a atividade positiva do flúor no processo de remineralização do esmalte, maneiras de melhorar a retenção do íon no meio oral foram discutidas ao longo dos anos (AANSENDE, BRUDEVOLD, MCCANN, 1968; MCCANN, 1969; GERHARDT e WINDELER, 1972; BOHRER e GEDALIA, 1980; HOOK et al., 1994; AL-KHATEEB et al., 2000, COMAR et al., 2012; KOLETSI-KOUNARI, MAMAI-HOMATA, DIAMANTI, 2012).

Dentre essas estratégias, a aplicação de agentes ácidos foi uma das primeiras formas descritas de tratamento do esmalte previamente à aplicação tópica de flúor (AANSENDE, BRUDEVOLD e MCCANN, 1968). Por este tratamento, o esmalte se tornaria mais reativo ao tratamento remineralizador com flúor, devido a maior facilidade de difusão do flúor e ao aumento na superfície de contato (AL KHATEEB et al., 2000).

Além do condicionamento ácido, outras formas de tratamento do esmalte passaram a ser estudadas. A utilização do alumínio foi preconizada como uma

alternativa devido a sua possibilidade de formar complexos com flúor que poderiam aumentar o efeito protetor sobre a estrutura dentária (McCANN, 1969; HOOK et al., 1994).

A associação destes dois tipos de pré-tratamento ainda tem ação pouco conhecida e relatada (NAVARRO et al., 1985). Assim, uma análise combinando diferentes métodos poderia elucidar as diferentes abordagens.

Desta forma, este estudo teve como objetivo comparar a capacidade destas substâncias de interferirem na ação do flúor sobre o esmalte, através de alterações na dureza e na quantidade de tecido mineral do esmalte afetado e tratado, bem como o comportamento deste substrato após ser submetido a um novo desafio ácido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões incipientes de mancha branca – evolução natural e sua simulação artificial em esmalte

O meio oral é naturalmente composto por microrganismos, tais como os estreptococos orais, as espécies *Actinomyces*, que constituem a principal porção da microflora do biofilme dentário, e os *Lactobacillus* (MARSH; MARTIN, 2005). A ocorrência de dieta rica em açúcares e carboidratos provoca uma alteração na composição deste biofilme, levando ao predomínio de bactérias associadas à cárie. A relação entre microrganismos e cárie vem sendo estudada por mais de um século (BRADSHAW; LYNCH, 2013), sendo o *Lactobacillus* o primeiro tipo de bactéria a ser relacionado com a manifestação da cárie (TAKAHASHI; NYVAD, 2011). Outros estudos, como o realizado por Duchin e Houte (1978), mostraram grande prevalência do *Streptococcus mutans* em lesões de cáries iniciais.

De uma forma geral, a bactéria cariogênica apresenta características específicas como a habilidade do rápido transporte de açúcar e a rápida conversão destes açúcares em ácido e a habilidade de manter estas atividades em baixo pH. Os lactobacilos e os estreptococos mutans além de conseguirem sobreviver nestas condições extremas, são capazes de continuar a metabolizar e a multiplicar (MARSH; MARTIN, 2005).

Depois de instalada a doença cárie, a primeira manifestação clínica visível de desmineralização da estrutura dentária é o surgimento de lesões incipientes de mancha branca detectáveis após secagem da superfície, enquadradas como estágio 1 de desenvolvimento da lesão de cárie segundo o índice do Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie, o ICDAS II (ISMAIL et al., 2007).

As lesões de mancha branca se desenvolvem na subsuperfície do esmalte dental, a partir da perda dos íons cálcio e fosfato para o meio oral. A perda destes íons ocorre devido a um desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização que acontecem constantemente no ambiente oral e que, em condições normais, permanecem em equilíbrio, sem causar nenhum tipo de dano à estrutura dentária. No biofilme dental, o metabolismo de bactérias cariogênicas existentes neste meio resulta na produção de ácido láctico, provocando a redução

do pH (BRADSHAW, LYNCH, 2013). Esta queda no pH leva à perda mineral da estrutura dentária. Neste momento, a saliva atua proporcionando tamponamento do meio, atenuando as alterações no valor do pH. Além disso, fornece íons cálcio e fosfato que participam do processo de remineralização (BRADSHAW, LYNCH, 2013). Este é o ciclo normal DES-RE. Entretanto, quando a ocorrência dos fenômenos de DES passa a prevalecer em relação a RE, é desencadeada a perda de íons da estrutura dentária, culminando com o surgimento da lesão cariosa. Inicialmente, esse processo ocorre em nível subclínico, já que não é possível identificá-lo e, após certo grau de desenvolvimento, passa a se tornar clinicamente visível pelo surgimento da lesão de mancha branca (BUZALAF et al., 2011).

O pH crítico para a dissolução da hidroxiapatita em esmalte foi determinado em 5,5 (BUZALAF et al., 2011). Na revisão de literatura conduzida por Bradshaw e Lynch (2013) indica-se que a presença de íons cálcio e fosfato no fluido da placa é mais importante do que as variações de pH na ocorrência dos fenômenos de desmineralização. Segundo esses autores, a dissolução mineral ocorre quando há concentrações insuficientes destes íons e que se quantidades suficientes de cálcio e fosfato estiverem presentes, a desmineralização será prevenida independente de quão ácido seja o meio. Esse raciocínio foi previamente compartilhado por Gao et al. 1991.

Em uma estrutura dentária sem alterações, o esmalte é composto por cristais de cerca de 40nm de largura que se encontram agrupados dentro dos prismas do esmalte, com aproximadamente 4 a 5µm de diâmetro. Os minúsculos poros presentes entre os cristais são preenchidos por proteínas, lipídios e água e constituem o meio pelo qual passam pequenas moléculas e íons como o hidrogênio e o cálcio. O esmalte maduro apresenta cerca de 3% em volume de proteínas e lipídios e 12% de água, o que resulta em 15% de volume do esmalte em espaços pelos quais moléculas e íons podem ser difundidos (FEATHERSTONE, 1999).

Como consequência da perda desequilibrada de íons, estes espaços aumentam em quantidade e tamanho, preenchidos posteriormente por ar e água, ambos com índice de refração diferente do esmalte. Esse fenômeno acarreta na perda de translucidez da superfície dentária e no aparecimento de manchas brancas opacas (KIM et al., 2013).

Microscopicamente, a lesão de mancha branca do esmalte pode ser dividida em quatro zonas: zona translúcida, que se encontra mais próxima do esmalte sadio

subjacente, com perda mineral em torno de 1%; zona escura, na qual se encontra cerca de 5% de perda mineral, e onde provavelmente ocorrem os episódios de remineralização da lesão; o corpo da lesão, com grande quantidade de dissolução mineral, cerca de 24%, podendo-se chegar a uma perda de 50% ou mais; e a camada superficial, que representa a camada externa do esmalte relativamente intacto, mas que já apresenta uma perda mineral de cerca de 10% (PALAMARA et al., 1986; ROBINSON, 2009; DEYHLE et al., 2014). A progressão na perda mineral pode evoluir até ocorrer cavitação da estrutura.

Outro estudo, descrito por Barbosa de Sousa et al. (2013), mostrou que o esmalte com lesão de cárie apresenta menor volume mineral e maior volume de água e conteúdo orgânico que o esmalte normal, sendo que a distribuição de água ao longo da lesão está diretamente relacionada com os sítios disponíveis (ou poros presentes) para a ocorrência dos fenômenos de remineralização. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que o volume de água na camada superficial das lesões de cárie artificiais é três vezes maior do que na lesão de cárie natural e que o volume dos poros ao longo da lesão varia de acordo com a área da lesão analisada.

Diante do conhecimento das principais alterações no esmalte dentário decorrentes de lesões de cárie, a sua indução de forma artificial por modelos laboratoriais permitem investigações de abordagens preventivas e de intervenção. Estas simulações são realizadas através de modelos experimentais *in vitro* e *in situ* (VIEIRA et al., 2005; LYNCH e TEN CATE, 2006; MAGALHÃES et al., 2009; MORON et al., 2013a). Nos estudos *in vitro*, a obtenção dessas lesões é conseguida através da exposição de espécimes de esmalte dental a soluções ou géis desmineralizantes, simulando o dinamismo das trocas minerais que ocorrem no meio oral. As diferenças entre os protocolos de desmineralização, como a saturação dos íons em relação ao esmalte e viscosidade, por exemplo, produzem tecidos com diferentes características de composição química, de dureza e de conteúdo mineral (MAGALHÃES et al., 2009; LIPPERT et al., 2012; MORON et al., 2013a).

Dentre os protocolos laboratoriais para desmineralização do esmalte mais discutidos atualmente estão o gel ácido de metilcelulose (MC), a solução ácida de metil-disfofonato (MHDP) e a ciclagem DES-RE, realizada com utilização de soluções de desmineralização (DES) e remineralização (RE) (VIEIRA et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2009; MORON et al., 2013a).

O gel de metilcelulose geralmente está associado a lesões mais rasas, o que ocorre devido a sua capacidade de quelar o cálcio, determinando uma maior precipitação deste íon na superfície mineral e conseqüentemente dificultando a penetração do ácido para a subsuperfície (LYNCH, TEN CATE, 2006; MAGALHÃES et al. 2009). Por outro lado, o MHDP pode provocar maior quantidade de perda mineral na subsuperfície, produzindo lesões mais profundas quando comparado a outros protocolos, o que pode estar associado ao valor de pH mais ácido desta solução (MAGALHÃES et al., 2009).

O processo de ciclagem difere dos demais por utilizar dois tipos de solução: uma desmineralizante e outra remineralizante, que atuam alternadamente no substrato utilizado (VIEIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2010). Apesar de produzir lesões com profundidade semelhante aos métodos anteriormente citados (MAGALHÃES et al. 2009), essa ciclagem aproxima-se do processo DES-RE encontrado no meio oral, assemelhando-se às trocas bioquímicas reais ocorridas na estrutura dentária (VIEIRA et al., 2005). Por suas características, é um método de indução de cáries amplamente aceito e utilizado em diferentes estudos (VIEIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2010), que se mostrou eficiente na criação de lesões cariosas em esmalte (DAMATO, STRANG, STEPHEN, 1988). Além disso, é considerado um método importante para testar a relação dose-resposta de produtos fluoretados (VIEIRA et al., 2005).

Ainda na validação das lesões de cárie em esmalte artificialmente criadas, a natureza do substrato utilizado também remete à necessidade de uma correta interpretação. Atualmente, o esmalte bovino é utilizado e aceito em estudos laboratoriais com finalidade de reproduzir artificialmente as lesões de cárie (ALVES et al., 2011, LIPPERT; LYNCH, 2014). Segundo Lippert e Lynch (2014), as lesões de subsuperfície formadas são semelhantes às encontradas no esmalte humano, apesar de existirem algumas diferenças no aspecto da lesão criada, como maior progressão e profundidade da lesão. Outro aspecto a ser considerado, segundo este autor, é que, quando comparado ao esmalte humano, a lesão de cárie se forma mais rapidamente no dente bovino, apesar da semelhança na distribuição mineral da lesão resultante. Além disso, a dificuldade crescente na obtenção de esmalte humano, atrelado a maior variação na composição deste, resulta na utilização cada vez mais frequente do esmalte bovino (MELLBERG, 1992; VIEIRA et al., 2005).

2.2 O flúor no tratamento remineralizador do esmalte: histórico, mecanismo de ação e formas de aplicação

A associação de que o flúor poderia atuar como auxiliar no combate à cárie dentária surgiu em estudos realizados em 1916 e 1929 (McKAY, 1916; McKAY, 1929) a partir da avaliação de áreas habitadas por indivíduos portadores de “dentes mosqueados”. Nesses estudos, observou-se que a presença dessas manchas estaria relacionada a um menor índice de cárie e à presença de algum componente na água de abastecimento, identificado posteriormente como o flúor. Inicialmente, apesar da relação dos baixos índices de cárie com a presença do flúor, o seu mecanismo de ação permanecia desconhecido, até descobrir-se que este íon atua diminuindo a solubilidade ácida do esmalte e da dentina, apesar do desconhecimento dos demais fatores envolvidos (INGRAM, AGALAMANYI, HIGHAM, 2005).

Em 1946, buscando alternativas mais práticas e rápidas para a utilização de substâncias fluoretadas na prática diária do consultório odontológico, Bibby *et al.* investigaram o efeito da incorporação do fluoreto de sódio em produtos utilizados na profilaxia odontológica e em enxaguatórios bucais. Como resultado, encontrou que o uso do produto com fluoreto para higienização retardou a atividade de cárie nos indivíduos participantes do estudo enquanto o mesmo sucesso não foi encontrado para o uso dos enxaguatórios, sendo este resultado atribuído à ausência de limpeza mecânica da superfície dentária. A partir daí, o flúor tornou-se um método efetivo na estratégia de prevenção e retardo na progressão da lesão cariosa e na tentativa de remineralizar a estrutura dentária alterada pelas manchas brancas por cárie.

Diversos estudos ao longo dos anos buscaram entender a relação estabelecida entre o flúor e a estrutura dentária e qual forma de apresentação do flúor seria mais efetiva para o objetivo proposto de interferir na atividade cariosa (HOOK *et al.*, 1994; INGRAM, AGALAMANYI, HIGHAM, 2005; LIPPERT, MARTINEZ-MIER, ZERO, 2014). Acreditava-se que a principal forma de ação do flúor seria a partir da sua incorporação na estrutura dentária durante o período pré-eruptivo, passando a fazer parte permanentemente da estrutura formada (BIXLER; MUHLER, 1957). Posteriormente, diferentes estudos passaram a mostrar que a ação positiva do fluoreto na redução e/ou retardo de lesões cariosas também era encontrada quando este era administrado topicamente, ou seja, colocado em

contato com a superfície dentária (THYLSTRUP, 1990; CAREY, 2014), o que levou a evidências de que o flúor age principalmente na sua forma iônica, enquanto se encontra disponível no meio oral, independente da forma como é administrado, de forma sistêmica ou tópica.

A água de abastecimento é uma das principais fontes sistêmicas na administração do flúor (WIKTORSSON, MARTINSSON, ZIMMERMAN, 1992; CAREY, 2014). Outras vias sistêmicas também foram estudadas, como o leite ou a utilização de suplementos fluoretados (LIPPERT et al., 2014).

Entretanto, o flúor poderia ser fornecido ao meio oral através de administração tópica e de forma mais efetiva, destacando-se, além da água como veículo, o uso de dentifrícios fluoretados, que constituem uma das vias mais disseminadas com objetivo de prevenção e controle de lesões cariosas (CURY et al., 2005; MENSINKAI et al., 2012). Diferentes concentrações de dentifrícios são encontradas, sendo que apenas aqueles que apresentam concentrações a partir de 1.100 ppm são capazes de atuar efetivamente no controle da lesão de cárie (MORON et al., 2013b).

A aplicação em altas concentrações pode ser realizada profissionalmente sob diferentes formas de apresentação, que variam entre si principalmente com relação à concentração do fluoreto. O flúor neutro apresenta-se com concentração de 2% de fluoreto e pH em torno de 7,0. Já o flúor fosfato acidulado (APF) apresenta uma concentração menor de fluoreto, 1,23%, veiculado em pH ácido. Dentre os produtos de aplicação profissional, também se encontra o verniz fluoretado, que apresenta maior concentração de flúor que os demais, com cerca de 5% de NaF em pH ligeiramente ácido (em torno de 5,0) (LEE et al., 2010).

Independente da forma de aplicação, o flúor, como método preventivo à cárie, atua topicamente. Isso significa que mesmo quando fornecido por vias sistêmicas, a atuação do fluoreto ocorre essencialmente quando este encontra-se no meio oral (THYLSTRUP, 1990; CAREY, 2014). A base do mecanismo de ação está no fato de que o pH crítico para a ocorrência de dissolução da hidroxiapatita é 5,5. Dada à ação do flúor e a substituição parcial para a forma de fluorhidroxiapatita, o pH crítico se altera para 4,5. No intervalo de pH entre 5,5 e 4,5, a dissolução do esmalte pode ser diminuída, uma vez que o cálcio e o fosfato perdidos podem ser recuperados e re-depositados na estrutura dentária através do fluoreto. Com o tempo, a formação

de fluorhidroxiapatita durante esse processo cria uma camada protetora que retarda a difusão de agentes desmineralizantes através da lesão (BUZALAF et al., 2011).

A aplicação tópica profissional fornece ao meio oral altas concentrações do fluoreto. O flúor fosfato acidulado, por exemplo, no qual o fluoreto é apresentado em pH em torno de 3,5, apresenta 12.300 ppm F⁻, enquanto o verniz fluoretado a 5%, em pH em torno de 5,5, apresenta cerca de 22.000 ppm F⁻. Nesse contexto, o flúor aplicado une-se ao íon cálcio para formar depósitos sob a forma de fluoreto de cálcio (CaF₂), depositado no biofilme ou na superfície do esmalte, tornando-se um reservatório de liberação lenta do fluoreto (ILJIMA; KOULOURIDES, 1989). Alguns estudos relacionam o pH do produto utilizado com os valores de dureza obtidos após o tratamento remineralizador (MAGALHÃES et al., 2010; GONZALES-CABEZAS et al., 2012; MORON et al., 2013b). Gonzales-Cabezas et al. (2012), encontrou que o baixo pH, por proporcionar uma desmineralização parcial do esmalte e consequentemente aumentar a difusão no interior da lesão, determinou maior ganho de dureza de superfície e maior ganho de íons fluoreto quando comparado ao pH neutro, sendo esse aspecto mais evidente em lesões menos desmineralizadas do que em lesões avançadas.

2.3 Estratégias de otimização da ação do flúor

A ação remineralizadora do fluoreto pode ser otimizada pela associação deste íon com outros compostos químicos que visam aumentar a retenção do fluoreto no substrato tratado (AANSENDEN, BRUDEVOLD, MCCANN, 1968; MCCANN, 1969; GERHARDT e WINDELER, 1972; BOHRER e GEDALIA, 1980; HOOK et al., 1994; AL-KHATEEB et al., 2000; COMAR et al., 2012).

A realização de tratamentos no esmalte previamente à aplicação tópica de flúor iniciou-se a partir do estudo de Aansenden, Brudevold e McCann (1968), que utilizou agentes ácidos antes da exposição do esmalte ao flúor, objetivando a desmineralização e desproteinização do esmalte. A remoção do material orgânico era realizada por acreditar-se que membranas orgânicas poderiam mascarar os sítios reativos e impedir ou retardar a interação entre esmalte e flúor. A desmineralização baseava-se em estudo anterior (LITTLE e STEADMAN, 1966), no

qual os resultados mostraram que o esmalte desmineralizado geralmente apresentava maiores quantidades de flúor do que as porções sadias do tecido.

Segundo Al Khateeb et al. (2000), o ácido fosfórico quando aplicado sobre a superfície do esmalte promove a remoção da camada superficial de mineral, o que aumenta a porosidade da superfície e facilita a difusão de íons minerais para a subsuperfície do esmalte, na qual se encontra o corpo da lesão. Além disso, a criação de uma superfície irregular como resultado do condicionamento aumenta a área de superfície do esmalte em contato com o fluoreto, o que otimizaria os resultados do tratamento remineralizador.

Nesta mesma direção, outros autores também estudaram a influência de tratamentos do esmalte com objetivo de melhorar a retenção do flúor. A associação do flúor com outros compostos metálicos tem demonstrado bons resultados na remineralização da estrutura dentária e na proteção do esmalte contra os desafios cariogênicos, como acontece, por exemplo, com o tetrafluoreto de titânio e o uso associado do fluoreto ao alumínio ou estrôncio (GERHARDT e WINDELER, 1972; COMAR et al., 2012; KOLETSI-KOUNARI, MAMAI-HOMATA, DIAMANTI, 2012).

Em trabalho *in vitro*, Magalhães et al. (2008) mostrou que o verniz experimental com tetrafluoreto de titânio (TiF_4) foi capaz de promover maior remineralização em esmalte cariado do que o verniz com fluoreto de sódio, apesar de, em esmalte sadio, esses dois produtos apresentarem ação semelhante na prevenção da desmineralização do substrato. A ação do TiF_4 se deve, além da presença do fluoreto, à ligação que o titânio realiza com o oxigênio do grupamento fosfato, resultando na formação do dióxido de titânio que determina a formação de uma camada “glazeada” na superfície do substrato (BUYUKYILMAZ, OGAARD, ROLLA, 1997; MAGALHÃES et al., 2008).

A utilização do alumínio foi relatada em 1969, por McCann, o qual sugeriu que o flúor formaria complexos com o alumínio, o que tornaria o tratamento com este metal uma alternativa para aumentar a fixação do flúor no esmalte. Em seu estudo, encontrou que a aplicação prévia de alumínio no esmalte aumentou consideravelmente a retenção do flúor. Este metal passou então a ser proposto na literatura como etapa adicional durante o procedimento de remineralização do esmalte, por se ligar ao flúor sob as formas principalmente de AlF^{2+} e AlF_2^+ , compostos capazes de estabelecer fortes ligações com os grupamentos fosfatos na superfície do mineral. Os complexos formados a partir desta reação reagem com a

H⁺ durante o processo de dissolução, dificultando sua interação com os íons da superfície do esmalte, o que determina efeito protetor da estrutura dentária (HOOK et al., 1994).

A efetividade destes pré-tratamentos vem sendo investigada e relatada em alguns estudos realizados (GERHARDT e WINDELER, 1972; HOOK et al., 1994; AL KHATEEB et al., 2000; KOLETISI-KOUNARI, MAMAI-HOMATA, DIAMANTI, 2012). Entretanto, a associação de dois tipos de pré-tratamento, o ácido fosfórico e o alumínio, ainda tem ação pouco conhecida e relatada (NAVARRO et al., 1985).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho se propôs a comparar diferentes pré-tratamentos de superfície (com ácido fosfórico e/ou nitrato de alumínio previamente a aplicação de flúor gel acidulado) na remineralização de esmalte com lesões de mancha branca artificialmente produzidas e também a sua resistência a um novo desafio ácido. Com esta finalidade, as hipóteses nulas testadas foram:

- 1) Não existem diferenças na perda de dureza de superfície e subsuperfície do esmalte entre o verniz, o flúor fosfato acidulado e este combinado ou não a diferentes pré-tratamentos;
- 2) Não existem diferenças entre o verniz, o flúor fosfato acidulado e este combinado ou não a diferentes pré-tratamentos na resistência a novo desafio ácido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Esta pesquisa consistiu em um estudo *in vitro*, no qual foi avaliada a influência do pré-tratamento do esmalte no potencial remineralizador do tratamento com flúor tópico. Este estudo apresentou dois fatores principais: I- o protocolo de tratamento da superfície, em cinco níveis: 1- Verniz fluoretado (controle); 2- flúor fosfato acidulado (APF); 3- nitrato de alumínio + APF; 4- condicionamento com ácido fosfórico + APF; 5- condicionamento com ácido fosfórico + nitrato de alumínio + APF; II- a fase do estudo, em três níveis: 1- após a ciclagem; 2- após o tratamento e 3- após o novo desafio ácido. Foram utilizadas como variáveis de resposta as análises mecânicas por microdureza de superfície e longitudinal do esmalte e a quantificação de conteúdo mineral através da análise de microrradiografia transversal (TMR).

4.2 Seleção e preparo dos dentes

Foram utilizados 180 incisivos bovinos extraídos e armazenados em recipientes contendo solução de timol a 0,1% em ambiente refrigerado. Uma seleção inicial dos dentes a serem utilizados foi realizada, excluindo as unidades que apresentaram falhas grosseiras, como trincas, fraturas, hipocalcificações ou desgaste acentuado da porção incisal.

Cortes transversais foram realizados para a separação corono-radicular com um disco diamantado dupla face Diaflex-F (Wilcos, Petrópolis, RJ, Brasil) acoplado a um torno (Nevoni, São Paulo, SP, Brasil) com sistema de irrigação adaptado. As raízes foram desprezadas e as coroas foram recondicionadas em solução renovada de timol a 0,1% em ambiente refrigerado.

As coroas foram fixadas com godiva aquecida (Lysanda, São Paulo, SP, Brasil) em um dispositivo metálico posteriormente acoplado a uma máquina de corte de precisão Isomet Low Speed Saw (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Inicialmente, as coroas foram submetidas a um corte em sentido mesio-distal, utilizando-se dois discos diamantados dupla face Extec Dia, Wafer blade 5"x. 015x1/2, (Extec Corp,

Enfield, CT, EUA), intercalados por um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 6 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm). Posteriormente, as coroas foram reposicionadas no dispositivo para serem submetidas a cortes longitudinais no sentido cervico-incisal, utilizando-se espaçador com nova espessura (4 mm). Os cortes foram processados com velocidade média de 300 rpm, sob refrigeração com água deionizada. Ao final, foram obtidos fragmentos de esmalte/dentina bovino retangulares de 6 mm x 4 mm da porção mais plana da coroa (Figura 1), que foram armazenados em recipientes plásticos e recobertos por gaze embebida em água deionizada e mantidos em ambiente climatizado (aproximadamente 4°C).

Figura 1: Desenho esquemático da sequência de corte para obtenção do espécime 6 x 4mm. Em a) corte inicial de 6mm; b) corte de 4mm no sentido mesio-distal; c) espécime obtido

4.3 Polimento do esmalte de dentes bovinos

Inicialmente, uma planificação da superfície de dentina foi realizada, de maneira a obter superfícies de esmalte e dentina paralelas, apresentando uma espessura de aproximadamente 2mm. Os blocos com a superfície dentinária voltada para cima foram fixados em discos de resina acrílica pré-fabricados (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa. Em seguida, foram levados à Politriz Metalográfica Aropol 2V (Arotec, Cotia, SP, Brasil) para desgaste. Neste processo, foram utilizadas lixas de carbeto de silício de granulação 320 (Carbimet - Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com peso de 172g sobre os espécimes, durante, em média, 15 segundos, sob refrigeração constante.

Os blocos foram removidos e fixados novamente com a superfície do esmalte voltada para cima para ser planificada e polida sob refrigeração constante de água de acordo com a seguinte seqüência: lixa #320, 172g, por 15 a 30 segundos, em baixa velocidade; lixa #600, 172g, por 1 min, em baixa velocidade; lixa #1200, 172g, por 1 min, em alta velocidade. Os tempos foram ajustados de acordo com o desgaste da lixa e com as variações da máquina de polimento utilizada. Para finalizar o polimento, foi utilizado um disco de feltro (Extec Corp, Enfield, CT, EUA) com suspensão de diamante de 1 μ m (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), peso de 172g, em velocidade alta.

Entre cada polimento e ao final de todo o processo, os espécimes foram submetidos à limpeza no aparelho de ultrassom (USC 750 - Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil), em água deionizada durante 5 minutos.

Após o polimento, todos os espécimes foram vedados ao seu redor com cera de escultura colorida, deixando apenas a superfície de esmalte vestibular exposta.

4.4 Análise de microdureza de superfície do esmalte inicial

Para a análise de microdureza inicial das superfícies de esmalte, foi utilizado o Microdurômetro MicroMet 6040 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25g com tempo de 10 segundos, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, Southampton, PA, EUA).

Foram realizadas 5 indentações na superfície separadas entre si por uma distância de 100 μ m. Ao final desta etapa, blocos que apresentaram microdureza média de 350 KHN foram selecionados, sendo descartados os espécimes que apresentaram a média de dureza de superfície 20% acima ou 20% abaixo da média geral. Este protocolo teve como objetivo estabelecer um parâmetro para a seleção dos espécimes, minimizando a variação existente entre os diferentes fragmentos.

Após a análise de microdureza, cada espécime recebeu duas camadas de esmalte de unha vermelho com a largura de 1,5 mm na extremidade esquerda do espécime, deixando livre o restante da área da superfície vestibular. Durante a realização da parte experimental, novas proteções foram feitas no espécime de maneira que as diferentes etapas do estudo estivessem presentes na mesma superfície (Figura 2).

Figura 2: Desenho esquemático da sequência de etapas da parte experimental. A) Área de remoção do espécime da superfície vestibular do esmalte bovino. B) Espécime de esmalte e dentina, com dimensões de 6 mm x 4 mm. C) Diferentes etapas realizadas nas áreas demarcadas do espécime. C: controle, D: desmineralização, R: desmineralização seguida de remineralização, N: desmineralização seguida de remineralização, submetida a novo desafio ácido.

4.5 Indução de lesão de cárie artificial em esmalte

Após a análise inicial da microdureza, os blocos obtidos foram induzidos à formação de lesões artificiais de cárie no esmalte utilizando-se o protocolo de ciclagem DES-RE, por 7 dias, em uma temperatura de 37°C (adaptado de VIEIRA et al., 2005). Durante 5 dias, as amostras foram imersas em solução desmineralizante (pH 4,7) por 6 horas e solução remineralizante (pH 7,0) por 18 horas, sendo mantidas as mesmas soluções durante todo o processo de ciclagem. A opção pela não-renovação das soluções foi feita após realização de testes pilotos. Nos últimos 2 dias, as amostras foram mantidas apenas em solução remineralizante. As soluções do processo de ciclagem estão descritas no quadro 1. As soluções obtidas foram validadas através de um teste piloto.

Quadro 1: Composição das soluções utilizadas no processo de ciclagem DES-RE (de acordo com VIEIRA et al. 2005).

Composição	
Ciclagem DES-RE	Solução desmineralizante:
	2,0mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	2,0mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	Tampão de acetato 0,077mM
	0,02 ppm F
	Solução remineralizante:
	1,5mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
	0,9mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	150mM KCl
	Tampão tris 0,1mol/l
	0,03 ppm F

Solução elaborada no laboratório de Bioquímica da FOB/USP.

Durante a validação, novas medições de microdureza de superfície foram realizadas, comparando-se a área protegida (não desafiada) com a área que sofreu o protocolo de desmineralização. Este processo visou a descartar a solução, caso esta provocasse uma desmineralização de superfície, que seria correspondente a um processo erosivo. Em todos os espécimes utilizados na validação, deveriam ser encontradas lesões de subsuperfície, característica de lesões de etiologia cariosa. Dessa forma, foi calculada a porcentagem de perda de dureza de superfície após a produção de lesões de cárie artificiais. As mensurações de microdureza seguiram o protocolo descrito no item 4.4. Para a validação das soluções de ciclagem, espécimes foram submetidos à análise através de microrradiografia (Figura 3).

Figura 3: Visualização da lesão de mancha branca em esmalte bovino através da microrradiografia. Nota-se a formação de lesão de subsuperfície com a preservação da camada superficial.

Uma nova porção de 1,5 mm no canto esquerdo do espécime recebeu também uma dupla camada de esmalte de unha vermelho, protegendo esta área do tratamento remineralizador realizado em seguida.

4.6 Protocolos de tratamento remineralizador

Os espécimes desmineralizados foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos (n=12), de acordo com a utilização ou não do pré-tratamento do esmalte durante o procedimento de remineralização. Os protocolos de remineralização estão descritos no quadro 2.

Quadro 2: Protocolos de remineralização utilizados no estudo

Grupo	Tratamento
V	Aplicação de verniz fluoretado (NaF 5% - Duraphat, Colgate-Palmolive, Nova Iorque, NY, EUA); leve umedecimento da superfície; aguardar 4h; remoção do produto com água deionizada.
F	Aplicação de flúor fosfato acidulado 1,23% (APF – Nova DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por 4min; remoção dos excessos.
Al-F	Aplicação de nitrato de alumínio 0,05M (1min) (Farmácia Specifica, Bauru, SP, Brasil), com remoção de excessos; aplicação de flúor fosfato acidulado 1,23% (APF) por 4min; remoção dos excessos.
P-F	Condicionamento com ácido fosfórico 37% (30s) (Condac 37, FGM. Joinville, SC, Brasil), seguido de lavagem e secagem; aplicação de flúor fosfato acidulado 1,23% (APF) por 4min; remoção dos excessos.
P-Al-F	Condicionamento com ácido fosfórico 37% (30s), seguido de lavagem e secagem; aplicação de nitrato de alumínio 0,05M (1min), com remoção de excessos; aplicação de flúor fosfato acidulado 1,23% (APF) por 4min; remoção dos excessos.

O tratamento foi realizado semanalmente, durante 4 semanas. Entre as aplicações, os espécimes foram mantidos em solução de saliva artificial (composição no quadro 3), renovada semanalmente, a uma temperatura de 37°C.

Quadro 3: Composição da saliva artificial (pH 7,0):

0,70 mM CaCl_2 0,20 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4,00 mM KH_2PO_4 30,0 mM KCl 0,30 mM NaN_3 20,0 mM Tampão HEPES (ácido)

Solução elaborada no laboratório de Bioquímica da FOB/USP, com composição ajustada de acordo com a descrita por Eisenburger et al. (2001), com modificações (adição de NaN_3).

4.7 Análise da microdureza de superfície após o tratamento remineralizador

Após o tratamento de remineralização, os espécimes de cada grupo foram submetidos a uma nova leitura de microdureza de superfície, conforme descrito no item 4.4.

Na sequência, mais uma porção de 1,5mm na extremidade esquerda do espécime recebeu duas camadas de esmalte de unha vermelho, protegendo uma pequena área da porção remineralizada do novo desafio ácido que foi realizado posteriormente.

4.8 Novo desafio ácido

Os espécimes de cada grupo foram submetidos a um novo desafio ácido, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.5.

4.9 Análise da microdureza de superfície final do esmalte

Após o novo desafio ácido, a análise de microdureza de superfície final do esmalte foi realizada nos espécimes conforme descrito no item 4.4.

4.10 Corte longitudinal dos espécimes

Após a leitura de MS final, os espécimes foram submetidos a um corte longitudinal utilizando o mesmo aparelho de corte de precisão citado no item 4.2, com o disco diamantado de dupla face posicionado perpendicularmente à superfície vestibular, no sentido de maior dimensão do espécime mantendo-se refrigeração com água deionizada. Como resultado, foram obtidas duas porções com dimensões de 6mm x 2mm. Uma das metades foi incluída em resina acrílica com a parte interna voltada para a superfície externa da resina, utilizando-se pó de resina acrílica e uma Embutidora (Arotec, Cotia, SP, Brasil). Na sequência, o polimento foi realizado com as lixas de granulação 320, 600, 1200 e feltro na Politriz Metalográfica conforme

descrito anteriormente. Essa metade foi submetida a análise de microdureza longitudinal descrita no item 4.11.

A outra metade foi fixada com cera pegajosa em base de acrílico com a porção interna voltada para a superfície e submetida ao polimento com lixa 600 até que fossem obtidos espécimes com cerca de aproximadamente 100µm, os quais foram submetidos à análise de conteúdo mineral através de microrradiografia transversal, descrita no item 4.13.

4.11 Análise de microdureza longitudinal do esmalte

A dureza longitudinal, tanto nas áreas protegidas como desafiadas, foi realizada através de duas sequências de sete indentações (25g/10s) nas distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220µm da superfície externa do esmalte. As médias de dureza foram calculadas em cada distância, por espécime.

4.12 Processamento dos dados

Os dados obtidos foram tabelados, sendo a condição inicial hígida considerada como *baseline*. As demais etapas foram analisadas utilizando esta condição como referência, determinando-se no final os %PDS (perda de dureza de superfície) e %PDL (perda de dureza longitudinal), respectivamente para os valores de microdureza de superfície e longitudinal.

Assim, valores foram calculados em porcentagem, conforme a fórmula abaixo:

$$\frac{M_1 - M_0}{M_0} \times 100$$

Sendo, M_0 o valor de microdureza inicial e M_1 , o valor de microdureza da condição analisada. Esta fórmula se aplica tanto para as análises de microdureza de superfície e longitudinal.

4.13 Microrradiografia transversal

Os espécimes foram fixados em base de acrílico utilizando cera colorida para escultura, de forma que a porção mais externa do espécime estivesse voltada para cima. Em seguida, os espécimes foram polidos manualmente utilizando lixa de granulação 600, até a obtenção de espécimes com 100+10µm de espessura medidos com micrometro digital (Mitutoyo America, Aurora, IL, USA).

Na sequência, o processo de obtenção da microrradiografia dos espécimes foi realizado, juntamente com uma escala de calibração de alumínio (*step wedge*), contendo 14 graus de variação (30 µm/ 99,9% Al). Os espécimes foram fixados em uma placa de acetato dispostos em sequência a partir de um mapeamento previamente realizado para a sua identificação. A partir deste preparo, uma placa de vidro foi exposta à ação de raios-X, por 13min utilizando-se padronização de 20kV e 20mA, sendo a distância focal até o filme de 30cm. Após a exposição, a placa de vidro foi submetida aos procedimentos de revelação da imagem, sendo imersa na solução reveladora seguida da solução fixadora, ambos por 7min. Ao final, a placa foi lavada em água corrente por 10min. As radiografias foram submetidas à análise através de microscopia por luz transmitida, com aumento de 20x (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para obtenção das imagens, foi utilizada máquina fotográfica digital (XC-77 CE, Sony, Toquio, Japão). Os dados foram obtidos e calculados através de software específico (TMR 2012 e TMR 2006 Inspector Research BV, Amsterdam, Holanda)

A perda mineral foi calculada a partir da escala de cinza fornecida pelo *step wedge*, utilizando a fórmula de Angmar et al. (1963), assumindo que a densidade mineral seja de 3,15 kg/l e que o conteúdo mineral do esmalte sadio seja 87% em volume. A profundidade da lesão (LD) foi calculada usando o limiar de 95% do conteúdo mineral de um esmalte sadio. A perda mineral integrada (ΔZ), a média de mineral perdido ao longo da profundidade da lesão (R) e a espessura média da camada superficial relativamente intacta também foram calculados (Apêndice A).

4.14 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias pelo teste Levene, permitindo a análise estatística paramétrica pela análise de variâncias (ANOVA).

Para as análise de microdureza de superfície, os dados foram analisados através de ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas (fatores protocolo e etapa, sendo a última considerada como medida repetida), seguida do Teste de Tukey para comparações múltiplas.

A análise dos dados obtidos na microdureza longitudinal foi realizada através de ANOVA a 3 critérios de medidas repetidas (fatores protocolo, profundidade e etapa, sendo a última considerada como medida repetida), seguida do Teste de Tukey.

Os dados de microrradiografia, processados pelo parâmetro LD, foram analisados por ANOVA a dois critérios (tratamentos e etapas).

Em todas as condições, o nível de significância adotado foi 5%

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos através da análise realizada por MS estão descritos na tabela 1. Durante a análise da dureza de superfície, encontrou-se que os fatores protocolo e fase apresentaram significância estatística ($p < 0,001$), havendo interação entre esses dois fatores ($p < 0,001$).

Tabela 1: Médias e desvio padrão do percentual de perda de dureza de superfície (% PDS) entre cada etapa comparada aos valores de dureza da condição hígida

Protocolo	% PDS Hígido/1º desafio (H/D)	% PDS Hígido/Tratamento (H/T)	% PDS Hígido/Novo desafio (H/N)
V	-96,89(1,93) Aa	-87,09(6,74) Aa	-87,07(6,42) Aa
F	-93,15(7,64) Aa	-41,98(18,02) Bd	-65,27(6,47) Cbc
AI-F	-95,80(6,14) Aa	-61,47(14,98) Bc	-76,05(8,37) Cab
P-F	-97,82(0,69) Aa	-69,28(13,19) Bb	-74,27(9,65) Babc
P-AI-F	-95,48(2,12) Aa	-48,76(18,15) Bcd	-62,27(6,71) Cbc

N=12; $p < 0,05$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre as colunas de uma mesma linha ($p < 0,05$)

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre as linhas de uma mesma coluna ($p < 0,05$)

A comparação entre protocolos em cada fase do estudo revelou que o percentual de perda de dureza após o primeiro desafio (H/D) ácido foi semelhante para todos os grupos, sendo que esta perda foi superior a 90%. Na análise de fases, a fase H/T revelou que o grupo F apresentou menor perda de dureza após a realização do tratamento embora não tenha sido diferente de P-AI-F. Por outro lado, o grupo V foi o que alcançou menor capacidade de reestabelecimento da MS, não sendo diferente da sua condição inicial.

Quando o novo desafio ácido foi realizado (H/N), o grupo V foi novamente o que apresentou maior %PDS, não se diferenciando, entretanto, de AI-F e P-F.

Ao compararmos os valores de %PDS entre as fases de um mesmo protocolo, apenas o grupo V não apresentou diferença de H/T para H/D e para H/N. Em todos os grupos restantes, a fase H/D diferiu das demais fases analisadas, observando-se ganho significativo de dureza na fase H/T.

Tabela 2: Médias e desvio-padrão da perda de dureza longitudinal (% PDL) entre cada etapa comparada aos valores de dureza da condição hígida

Protocolo	Profundidade (µm)	%PDL Hígido/1º desafio (H/D)	%PDL Hígido/Tratamento (H/T)	%PDL Hígido/Novo desafio (H/N)
V	10	-93,41(3,75)Aa	-90,57(6,29)Aa	-88,58(4,28)Aa
	30	-84,18(7,47)Aa	-63,28(8,5)Aa	-63,029(11,44)Aa
	50	-51,77(10,19)Aa	-30,32(13,02)Aa	-27,51(17,09)Aa
	70	-23,64(15,74)Aa	-9,51(13,16)Aa	-7,5(8,6)Aa
	90	-7,57(12,11)Aa	-4,92(13,12)Aa	-2,13(13,27)Aa
	110	1,5(10,12)Aa	-3,09(10,38)Aa	-0,85(9,36)Aa
	220	-2,66(7,57)Aa	0,041(5,7)Ba	0,745(6,28)Aa
F	10	-81,56(12,24)Ab	-100,00(0,00)Ba	-98,06(6,41)Bab
	30	-63,51(17,18)Aa	-77,58(33,31)Aa	-90,56(14,56)Aab
	50	-35,27(19,02)Aa	-56,78(40,29)Aa	-60,80(35,2)Aab
	70	-9,73(23,3)Aa	-31,93(40,13)Aa	-13,90(29,52)Aa
	90	-4,17(15,00)Aa	-12,96(29,68)Aa	-1,62(23,50)Aa
	110	-8,86(11,65)Aa	-9,56(19,86)Aa	-6,40(14,10)Aa
	220	-2,57(10,17)Aa	2,34(12,93)Ba	-1,68(11,46)Aa
AI-F	10	-91,85(8,9)Aa	-100,00(0,00)Aa	-100,00(0,00)Ab
	30	-78,73(9,93)Aa	-64,54(32,46)Aa	-74,41(29,35)Aab
	50	-39,24(9,20)Aa	-27,58(17,22)Aa	-40,87(34,39)Aab
	70	-9,14(7,84)Aa	-5,15(11,09)Aa	-13,66(26,41)Aa
	90	-4,30(11,83)Aa	-1,03(10,39)Aa	-4,93(12,43)Aab
	110	-0,13(10,79)Aa	-0,49(10,51)Aa	-3,95(15,88)Aa
	220	-1,69(7,19)Aa	-1,35(6,4)Ba	-2,95(11,18)Aa
PA-F	10	-94,49(2,62)Aa	-100,00(0,00)Aa	-100,00(0,00)Ab
	30	-78,88(13,64)Aa	-81,43(27,56)Aa	-82,50(28,61)Aab
	50	-49,44(18,03)Aa	-35,97(18,71)Aa	-49,13(49,98)Aab
	70	-15,98(12,79)Aa	-9,32(10,95)Aa	-38,04(39,79)Aa
	90	-12,48(11,48)Aa	-14,78(14,54)Aa	-29,054(24,69)Ab
	110	-7,58(15,24)Aa	-7,47(13,79)Aa	-11,66(23,26)Aa
	220	-4,61(13,12)Aa	1,17(16,96)Ba	-6,64(19,84)Aa
PA-AI-F	10	-80,55(20,72)Ab	-100,00(0,00)Ba	-100,00(0,00)Bb
	30	-68,24(32,03)Aa	-51,32(50,97)Ba	-98,07(6,68)ABb
	50	-26,97(33,48)Aa	-17,92(32,85)Aa	-75,37(30,94)Bb
	70	-9,92(17,77)Aa	-3,35(28,89)Aa	-29,51(28,31)Aa
	90	-7,26(17,44)Aa	-4,87(20,62)Aa	-11,17(26,19)Aab
	110	-6,39(11,50)Aa	1,49(21,13)Aa	0,29(15,27)Aa
	220	-0,89(12,83)Aa	4,27(13,75)Ba	-6,35(18,43)Aa

N=12, p<0,05

Letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significante entre diferentes fases de um mesmo protocolo

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os diferentes protocolos dentro de uma mesma fase

Considerando a comparação entre H/T e H/N, os grupos F, Al-F e P-Al apresentaram significativa perda de dureza. Os valores de dureza finais (H/N) foram maiores do que os encontrados na fase H/D para todos os grupos analisados, indicando ganho de dureza final.

A análise de ML revelou que os fatores tratamento, profundidade e fase foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Também observou-se a interação entre todos os fatores ($p < 0,001$). Os valores de média e desvio padrão obtidos através da ML estão descritos na tabela 2.

Comparando-se as diferentes fases de estudo, para cada protocolo de tratamento utilizado, dentro de uma mesma profundidade analisada, observamos, de uma forma geral, que os valores de H/T não diferiram de H/D. Entretanto, as análises realizadas em 10 μ m nos grupos F e P-Al-F apresentaram significativa perda de dureza em H/T quando comparada à H/D. Nas análises realizadas em profundidade de 220 μ m, todos os grupos revelaram ganho de dureza para a fase H/T, com valores de %PDL próximos a zero.

A fase H/N, quando analisada na profundidade de 10 μ m para os grupos F e P-Al-F diferiu da fase H/D e foi semelhante à fase H/T, com valores significativamente superiores quando comparados à H/D. No grupo tratado com P-Al-F, na profundidade de 30 μ m, o valor de %PDL foi similar a H/D, porém com maior perda que H/T.

A comparação entre os diferentes protocolos, para uma mesma fase, em cada profundidade analisada, revelou semelhante %PDL em H/D, para todos os grupos, com exceção dos valores encontrados aos 10 μ m para os grupos F e P-Al-F, que se revelaram inferiores aos demais grupos para esta mesma profundidade. De uma forma geral, fase H/T apresentou valores de dureza semelhantes para todos os grupos testados em todas as profundidades analisadas.

A fase H/N revelou um maior número de diferenças entre os protocolos, indicando menores valores de %PDL para o grupo V, quando comparado aos demais. Em profundidade de 10 μ m, os grupos Al-F, P-F e P-Al-F apresentaram valores de PDL significativamente superiores ao encontrado em V, apesar de não serem diferentes do encontrado para F. É possível observar a ocorrência de valores significativamente superiores para P-Al-F em profundidades de 30 e 50 μ m, quando comparados ao encontrado em V. Ainda nestas profundidades, os grupos F, Al-F e P-F foram ao mesmo tempo semelhantes a V e a P-Al-F. A análise em 90 μ m

revelou %PDL significativamente maior para o grupo P-F, sendo que este não diferiu do encontrado em AI-F e P-AI-F.

Ainda sobre a análise de ML, foi possível observar uma relação entre os valores de %PDL obtidos com a profundidade analisada, independente do protocolo de tratamento utilizado e da fase do estudo (Gráfico 1). Os resultados revelaram a ocorrência de %PDL significativamente menor à medida que a análise foi realizada em porções mais internas do esmalte.

Gráfico 1: Gráfico representativo da relação entre PDL e profundidade. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,005$).

Tabela 3: Valores e desvio padrão da profundidade da lesão (LD) em µm

Protocolo	Desmineralizado	Tratado	Novo desafio
V	74,25 (19,80)	85,90 (47,86)	68,41 (39,40)
F	97,61 (47,79)	75,81 (53,51)	73,87 (47,58)
AI-F	86,73 (41,52)	64,81 (27,50)	68,16 (35,53)
P-F	77,80 (28,18)	76,58 (49,81)	68,14 (50,60)
P-AI-F	85,81 (48,02)	47,72 (37,35)	63,85 (73,09)

$P < 0,05$

Quando analisados através da microrradiografia, os fatores avaliados não foram estatisticamente significantes em relação ao conteúdo mineral na profundidade de lesão - LD (protocolo- $p=0,876$ / fase- $p=0,296$) e nem a interação ($p=0,968$), de forma que apenas o teste ANOVA foi aplicado.

O poder de teste mostrou-se baixo, sendo de 0,05; 0,08 e 0,05 para protocolo, fase e interação respectivamente.

Os dados dos parâmetros ΔZ e R e a espessura da camada externa forma obtidos, porém, devido a sua inconsistência e perdas de espécimes durante o preparo não foram processados estatisticamente. Estes valores estão apresentados na tabela em anexo.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Diante da efetividade do tratamento com fluoreto para remineralização de lesões de manchas brancas por cárie, diferentes estratégias buscando otimizar a retenção e potencializar a ação deste íon vêm sendo relatadas (AANSENDEN, BRUDEVOLD, MCCANN, 1968; MCCANN, 1969; GERHARDT e WINDELER, 1972; BOHRER e GEDALIA, 1980; HOOK et al., 1994; AL-KHATEEB et al., 2000, ALVES et al., 2011; COMAR et al., 2012). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo comparar o desempenho do tratamento realizado com o verniz fluoretado ao uso de flúor gel acidulado, combinado ou não a diferentes pré-tratamentos do esmalte, além do seu comportamento frente a um novo desafio ácido.

Para este estudo, a produção de lesões artificiais padronizadas é fundamental para que a resposta seja válida (ALVES et al., 2011; LIPPERT et al., 2012b). Dessa forma, a ciclagem DES-RE foi adotada baseada no protocolo descrito por Vieira et al. (2005), por ser o método que mais se assemelha às trocas de pH ocorridas em ambiente oral. A principal modificação em relação a este método de referência foi a manutenção das mesmas soluções ao longo de toda a ciclagem, uma vez que estudos pilotos revelaram que, desta maneira, lesões de subsuperfície também foram induzidas, com a vantagem de necessitar manipular uma menor quantidade de solução. Nesta indução, a verificação de produção de lesões subsuperficiais com a presença da camada externa aparentemente intacta tornou possível a padronização e a sua confiabilidade.

Após a indução das lesões, os diferentes protocolos de tratamento foram aplicados e avaliados para comparar em um primeiro momento, o seu potencial remineralizador. Além disso, averiguar a sua efetividade depende também da sua capacidade em resistir a novos desafios (CARVALHO et al., 2015; COMAR et al., 2012), buscando conhecer o potencial do tratamento em prevenir a progressão das lesões de cárie.

A lesão de mancha branca caracteriza-se por ser uma lesão de subsuperfície, que mantém uma camada superficial relativamente intacta (DEYHLE et al., 2014). Segundo Rehder Neto et al. (2009), a maioria das interações do esmalte em ambiente oral ocorre na superfície da estrutura, fazendo com que a análise de microdureza de superfície seja bem aplicada, além de ser um método simples,

rápido e fácil de ser utilizado. Apesar de algumas limitações, a utilização desta metodologia é relevante na avaliação das alterações ocorridas na superfície do substrato utilizado durante as diferentes fases do estudo (CURY et al., 2005; REHDER NETO et al., 2009). Neste trabalho especificamente, espera-se que os protocolos propostos promovam de fato uma reação imediata na camada mais externa, não apenas quanto à formação de depósitos minerais que possam se agregar quimicamente, mas também na promoção de uma barreira mecânica. O entendimento inicial do que ocorre nesta camada é o ponto de comparação ao que ocorre em profundidade. Desta forma, a análise na subsuperfície se torna interessante por complementar a informação, uma vez que, de uma forma geral, as lesões incipientes produzidas artificialmente comprometem a estrutura até cerca de 50µm (MAGALHÃES et al., 2009), sendo que este tipo de análise fornece informações sobre a resistência mecânica do esmalte desmineralizado em profundidade (MAGALHÃES et al., 2009). Por este motivo, a avaliação associada da microdureza de superfície com a microdureza longitudinal foi utilizada para que o entendimento dos eventos ocorridos na camada externa se complementem com o que ocorre internamente.

Diante do encontrado nos resultados do presente estudo, é possível afirmar que a primeira hipótese nula testada foi negada, já que através da análise de microdureza de superfície foi possível encontrar diferenças entre os protocolos de tratamento. Por outro lado, a segunda hipótese nula foi aceita já que nenhum dos tratamentos remineralizantes foi capaz de resistir aos efeitos da nova ciclagem ácida, apesar do verniz ter apresentado os menores valores de perda de dureza finais na região de subsuperfície quando comparado aos demais grupos.

Na comparação entre a efetividade dos protocolos testados, há de se destacar que os valores de microdureza de superfície e longitudinal demonstraram similaridade entre os grupos na condição inicial (em esmalte hígido) e após a etapa de desmineralização, um dado de extrema relevância para que ateste que todos foram analisados, sob condições iguais para a validação das comparações.

Na investigação da efetividade dos tratamentos utilizados neste estudo, verificou-se que a literatura reporta resultados que demonstraram capacidade de remineralização do verniz fluoretado no tratamento de lesões de mancha branca quando avaliado por meio de diferentes testes (COMAR et al., 2012; CONSTANZA et al., 2014). Este comportamento positivo pode estar, em parte relacionado à alta

concentração de NaF presente nesta formulação (5%) e ao maior tempo de contato do verniz com a superfície do esmalte tratado, agindo também como uma película protetora (DU et al., 2012).

Entretanto, no presente estudo, contrariamente ao esperado, o verniz fluoretado não foi eficaz na remineralização e nem na resistência ao novo desafio ácido quando analisados pela microdureza de superfície. Para interpretar esse desempenho adequadamente, há de se considerar que uma melhor atuação do fluoreto após a sua aplicação ocorre quando há variações de pH do meio. Nos momentos de queda de pH (acidificação) do meio ocorre a dissociação do fluoreto de cálcio presente na camada externa do esmalte, liberando os íons flúor e cálcio. Estes, juntamente com os íons fosfato, tornam o meio supersaturado em relação à estrutura dental, promovendo deslocamento dos íons para a superfície desmineralizada, reestruturando-a (MORENO; ZAHRANDNK, 1979). No presente estudo, os espécimes foram intencionalmente armazenados em saliva artificial durante a fase de tratamento, com o objetivo de avaliar unicamente a ação do protocolo no papel essencialmente remineralizador sobre a superfície (IJIMA et al., 1999; LIPPERT et al., 2012), fazendo com que, conseqüentemente, este substrato não fosse submetido às variações de pH durante a etapa de tratamento, o que poderia ter dificultado a dissociação do fluoreto de cálcio. Além disso, é possível que tenha ocorrido perda de CaF_2 para a saliva durante o armazenamento (GANSS; SCHLUETER; KLIMEK, 2007).

Ainda com relação à efetividade da ação do verniz, dois aspectos precisam ser ressaltados: a frequência e a finalidade da aplicação (prevenção ou inibição na progressão da lesão), estando estes dois fatores intimamente relacionados. Quando aplicado com finalidade preventiva, Arruda et al. (2012) encontraram que, após um ano de acompanhamento, houve redução na incidência de cárie nos grupos de crianças que receberam uma ou duas aplicações de verniz fluoretado durante o período, sendo que duas aplicações por ano foram mais efetivas do que apenas uma aplicação. Como abordagem terapêutica, o fluoreto é usado com a intenção de remineralizar uma lesão instalada, o que pode ser conseguido progressivamente através de aplicações sequenciais do produto, fornecendo continuamente altas concentrações de fluoreto.

Apesar das vantagens e perspectivas favoráveis descritas na literatura, o verniz fluoretado apresenta algumas limitações clínicas, dentre as quais destacamos

a dependência direta da colaboração do paciente para que o produto permaneça em ambiente oral durante pelo menos 4h (DU et al., 2012).

Nesse contexto, a utilização do flúor em gel surge como alternativa no tratamento remineralizador do esmalte (LEE et al., 2010). Na avaliação da camada mais externa da lesão, observou-se que o APF demonstrou melhor desempenho como agente de tratamento na superfície, apresentando-se também como um dos métodos mais eficazes na resistência a um novo desafio ácido, embora não prevenindo completamente a perda de dureza. Quando os dados da avaliação da subsuperfície realizada através das análises de microdureza longitudinal foram analisados, este protocolo não foi capaz de reverter a perda mineral nas profundidades avaliadas, percebendo-se a tendência de uma continuidade desta perda. Para uma correta interpretação deste evento, torna-se importante ressaltar algumas observações realizadas por meio da microrradiografia. Em todos os protocolos em que o APF foi utilizado, sem ou com pré-tratamento associado, foi evidenciada a ocorrência de erosão na profundidade de 10 μ m, o que está de acordo com a análise de microdureza longitudinal nesta área, uma vez que não foi possível a leitura nesta profundidade (sendo considerada como perda de 100%).

Este defeito erosivo e fragilidade dos tratamentos a base de APF também podem ser parcialmente explicados pela relação encontrada entre os géis fluoretados de baixo pH e lesões com grande percentual de perda de dureza (GONZALES-CABEZAS et al., 2012). Segundo estes autores, o flúor fosfato acidulado desmineraliza parcialmente o esmalte criando sítios que aumentam a difusão na lesão e que posteriormente são preenchidos por material semelhante ao fluoreto de cálcio. Em um período de subsaturação, o flúor seria lançado no meio promovendo remineralização e criação de cristais mais resistentes. Entretanto, melhor resultado foi obtido em espécimes que sofreram uma menor desmineralização, uma vez que em lesões mais avançadas (mesmo as não-cavidades), a desmineralização causada pelo APF pode danificar os cristais em fase avançada de desmineralização, reduzindo o número de sítios disponíveis para a remineralização, o que conseqüentemente afeta a eficácia do tratamento. Diante da falha erosiva encontrada, a avaliação do efeito dos tratamentos propostos pode ter sido limitada para a precisão na afirmação consistente de uma ação positiva dos tratamentos na recuperação da dureza dos espécimes tratados.

A ocorrência dessa erosão pode estar associada também a uma fragilidade da camada superficial das lesões obtidas, que, além de apresentarem espessura muito pequena, podem não ter apresentado o conteúdo mineral mínimo necessário para resistir ao baixo pH do gel fluoretado utilizado.

Sob esta forma de apresentação, o fluoreto se encontra em menor concentração quando comparado ao verniz fluoretado e, por esse motivo, estratégias são utilizadas como meio de potencializar a retenção do fluoreto sob a forma de fluoreto de cálcio e, conseqüentemente, sua ação remineralizadora, baseadas na acidificação do meio e/ou uso de substâncias (baixo pH do gel fluoretado) (AL-KHATEEB et al., 2000, ALVES et al., 2011; COMAR et al., 2012; GONZALES-CABEZAS et al., 2012).

Segundo a literatura, o condicionamento do esmalte com ácido fosfórico associado à aplicação de nitrato de alumínio previamente ao uso do agente fluoretado tem como objetivo aumentar a capacidade de penetração do gel na subsuperfície da lesão, pela maior facilidade de difusão criada pelo ácido (AL KHATEEB et al., 2000) e pela maior retenção do fluoreto a partir da formação de complexos metálicos com o alumínio (McCANN, 1969; HOOK et al., 1994).

Quando as lesões artificiais deste estudo foram tratadas com nitrato de alumínio associado ao flúor fosfato acidulado, um comportamento menos efetivo na remineralização foi encontrado quando comparado ao flúor fosfato acidulado isoladamente, contrariando a perspectiva inicial.

Apesar de estudos como de McCann 1969 e Hook *et al.* 1994 demonstrarem melhor desempenho para estes pré-tratamentos, as conclusões de ambos foram obtidas por análises químicas e por microrradiografia, respectivamente. Nenhum outro estudo prévio avaliou esta ação por meio de microdureza. Na análise de microdureza longitudinal, os grupos com pré-tratamento não demonstraram efetividade por não apresentarem uma reversão no percentual de perda de dureza, sendo o comportamento semelhante ao encontrado quando o flúor fosfato acidulado foi aplicado isoladamente.

Adicionalmente, nos grupos nos quais o ácido fosfórico foi utilizado como pré-tratamento, o efeito de remoção da camada superficial provocada pelo agente ácido, com o objetivo de aumentar a permeabilidade do flúor dentro da lesão (AL-KHATEEB, 2000), pode ter contribuído para intensificar a ocorrência dos defeitos

erosivos encontrados, o que confronta a ideia de que este princípio de ação colaboraria para aumentar a efetividade do APF.

Neste mesmo contexto, tanto nas análises de microdureza de superfície como longitudinal, o grupo tratado com condicionamento ácido prévio e no grupo tratado com condicionamento ácido e nitrato de alumínio associados ao flúor fosfato acidulado, apresentaram desempenho similares ao do grupo associado ao nitrato de alumínio. Este padrão indica que nenhum dos pré tratamentos resultou em uma diferença significativa em relação ao flúor fosfato acidulado, não potencializando a ação remineralizadora nem mesmo proporcionando maior resistência à progressão da lesão.

Além disso, outra observação importante deve ser feita a cerca do pH do gel utilizado que, neste estudo, encontrou-se mais baixo que a média esperada (entre 3,5 e 4,0), em torno de 2,9-3,0. Esta condição pode ter resultado no fato de que a própria acidez do APF seja suficiente para promover a erosão já observada no grupo em que o APF foi utilizado de forma isolada.

Também é importante considerar as diferenças existentes entre lesões de cárie artificiais e as lesões de cárie naturais. Considerando as diferentes zonas da lesão de mancha branca, Barbosa de Sousa, Dias Soares e Sampaio Vianna (2013) encontraram que o volume médio de água encontrado para os dois tipos de lesões foi menor que o previsto. Entretanto, o déficit foi três vezes maior em lesões naturais quando comparadas às lesões artificiais. Estes autores afirmam que o maior volume de água em lesões artificiais sugere que, entre outros fatores, a permeabilidade pode ser aumentada, apesar do volume mineral nos dois tipos de lesões serem semelhantes. Associando esta informação aos resultados encontrados no presente estudo, é possível que o efeito erosivo causado pelo baixo pH do meio no grupos tratados APF poderia ser minimizado em lesões de cárie naturais.

Algumas verificações pontuais podem ser destacadas, como na comparação do tratamento realizado apenas com flúor gel acidulado e o grupo no qual foi realizado pré-tratamento do esmalte com ácido fosfórico e nitrato de alumínio, que apresentaram desempenho superior às demais situações, já que foram capazes de reduzir os valores de perda de dureza na análise de superfície.

Esta diferença de comportamento entre os grupos apenas na fase após o tratamento, na MS, pode estar relacionada à interação entre a ação do agente remineralizador e superfície. Zhang et al. (2011) afirmou que quando os íons fluoreto

entram em contato com os íons cálcio e fosfato na superfície do esmalte ocorre uma rápida formação de fluorapatita, dificultando a penetração do íon para a subsuperfície da lesão. Dentro do contexto do presente estudo, essa rápida reação e formação de um composto mais complexo e estável poderia dificultar a penetração do íon para a subsuperfície da lesão. Além disso, Elkassas et al. (2014) afirmaram que a lenta rede de remineralização promovida pela saliva artificial tende a um ganho mineral na superfície devido ao baixo gradiente de concentração do íon proveniente da saliva no interior da lesão, o que também pode ter ocorrido com os espécimes do presente estudo uma vez que estes foram armazenados em saliva artificial durante as quatro semanas de tratamento, colaborando para a menor difusão de íons para a região subsuperficial do esmalte.

Quando a situação de perda de dureza final na superfície, avaliada após o novo desafio ácido, foi comparada à situação de desmineralização inicial dos espécimes, foi possível perceber que os grupos tratados com o flúor fosfato acidulado também mostraram menores valores de perda de dureza, indicando uma possível capacidade dos tratamentos empregados de promover uma certa resistência na camada mais externa do esmalte mesmo quando submetido a nova ciclagem ácida.

É interessante ressaltar que as limitações encontradas durante a análise de microdureza longitudinal podem ter refletido nos resultados obtidos a partir da análise de microdureza de superfície, uma vez que a remoção da camada superficial da lesão devido à ocorrência de defeito erosivo levanta a hipótese de que algumas das leituras de dureza de superfície tenham sido realizadas em regiões de subsuperfície da lesão, as quais apresentam um menor grau de desmineralização a medida que se tornam mais profundas, determinando valores de dureza aparentemente mais altos.

As dificuldades de interpretação encontradas pela imprecisão na determinação da profundidade em análises de microdureza longitudinal poderiam ser contornadas a partir da análise por microrradiografia. A análise por TMR é capaz de medir o conteúdo mineral do espécime a cada 2 µm de profundidade, sendo impreciso apenas nos 10 µm iniciais (MAGALHÃES et al., 2009). Na expectativa de obter resultados mais concretos quanto ao conteúdo mineral perdido, uma análise por TMR também foi realizada.

Entretanto, com relação à profundidade da lesão, a análise realizada no presente estudo não revelou diferenças entre grupos e fases, o que pode estar associado ao baixo poder de teste encontrado para a análise estatística realizada, cerca de 5%, enquanto o valor médio esperado em análises estatísticas é aproximadamente 80%. Esta limitação ocorreu devido ao número pequeno da amostra utilizada para esta análise, sendo que os resultados obtidos poderiam ter apresentado diferenças estatísticas a partir da análise de uma amostra maior. O “N” insuficiente foi decorrente das dificuldades metodológicas encontradas durante o desenvolvimento do estudo, como a perda de espécimes por fratura durante o polimento para a TMR e a irregularidade da superfície dos espécimes nas áreas de erosão, que dificultaram ou impediram a obtenção de dados pelo software.

Diante das informações analisadas e discutidas, percebe-se que no presente estudo os protocolos de pré-tratamento não foram capazes de diminuir o percentual de perda de dureza da superfície e, quando associados, revelaram resultados semelhantes ao encontrado para o uso isolado do APF, indicando que o pré-tratamento não foi efetivo em aumentar a capacidade de remineralização da superfície do gel fluoretado e não proporcionou uma maior capacidade de resistência a um novo desafio ácido.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados descritos e discutidos neste estudo, foi possível concluir que:

- A ação remineralizadora foi semelhante para os diferentes protocolos avaliados, com ou sem tratamento prévio da superfície do esmalte;
- Nenhum dos tratamentos remineralizantes foi capaz de resistir a um novo desafio ácido, sendo o verniz o o tratamento que apresentou melhor desempenho em subsuperfície quando comparado aos grupos tratados com APF.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aasenden R, Brudevold F, McCann HG. The response of intact and experimentally altered human enamel to topical fluoride. *Arch Oral Biol.* 1968 May;13(5):543-52.

Al-Khateeb S, Exterkate R, Angmar-Mansson B, ten Cate JM. Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol Scand.* 2000;58(1):31-6.

Alves KM, Franco KS, Sassaki KT, Buzalaf MA, Delbem AC. Effect of iron on enamel demineralization and remineralization in vitro. *Arch Oral Biol.* 2011 Nov;56(11):1192-8.

Angmar B, Carlström D, Glas JE: Studies on the ultrastructure of dental enamel. 4. The mineralization of normal tooth enamel. *J Ultrastruct Res* 1963; 8: 12–23.

Arruda AO, Senthamarai Kannan R, Inglehart MR, Rezende CT, Sohn W. Effect of 5% fluoride varnish application on caries among school children in rural Brazil: a randomized controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2012.

Attin T, Hartmann O, Hilgers RD, Hellwig E. Fluoride retention of incipient enamel lesions after treatment with a calcium fluoride varnish in vivo. *Arch Oral Biol.* 1995;40(3):169-74.

Barbosa de Sousa F, Dias Soares J, Sampaio Vianna S. Natural enamel caries: a comparative histological study on biochemical volumes. *Caries Res.* 2013;47(3):183-92.

Basha S, Mohamed RN, Swamy HS. Prevalence and associated factors to developmental defects of enamel in primary and permanent dentition. *Oral Health Dent Manag.* 2014;13(3):588-94.

Bibby BG, Zander HA, McKelleget M, Labunsky B. Preliminary reports on the effect on dental caries of the use of sodium fluoride in a prophylactic cleaning mixture and in a mouthwash. *J Dent Res.* 1946 Aug;25:207-11.

Bixler D, Muhler JC. The relation of systemic fluoride and thyroid gland activity to the incidence of dental caries in the rat. *J Dent Res.* 1957 Apr;36(2):304-6.

Bohrer J, Gedalia I. Fluoride concentration in enamel treated with 50% phosphoric acid and NaF with subsequent decalcification in "acid-gel". J Dent Res. 1980;59(6):1022-5.

Botelho JN, Del Bel Cury AA, Silva WJ, Tenuta LM, Cury JA. The effect of fluoride toothpaste on root dentine demineralization progression: a pilot study. Braz Oral Res. 2014;28 Spec No:1-5.

Bradshaw DJ, Lynch RJ. Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. Int Dent J. 2013 Dec;63 Suppl 2:64-72.

Büyükyılmaz T, Ogaard B, Rølla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. Eur J Oral Sci. 1997 Oct;105(5 Pt 2):473-7.

Buzalaf MA, Pessan JP, Honório H, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. Monogr Oral Sci. 2011;22:97-114.

Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. Monogr Oral Sci. 2011;22:20-36.

Carvalho TS, Peters BG, Rios D, Magalhães AC, Sampaio FC, Buzalaf MA et al. Fluoride varnishes with calcium glycerophosphate: fluoride release and effect on in vitro enamel demineralization Braz Oral Res. 2015;29(1):1-7.

Comar LP, Wiegand A, Moron BM et al. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. Eur J Oral Sci. 2012;120(4):342-8.

Cury JA, Simões GS, Del Bel Cury AA, Gonçalves NC, Tabchoury CP. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on in situ enamel remineralization. Caries Res. 2005 May-Jun;39(3):255-7.

Damato FA, Strang R, Stephen KW. Comparison of solution- and gel-prepared enamel lesions--and in vitro pH-cycling study. J Dent Res. 1988 Aug;67(8):1122-5.

Deyhle H1, White SN, Bunk O, Beckmann F, Müller B. Nanostructure of carious tooth enamel lesion. Acta Biomater. 2014 Jan;10(1):355-64.

Du M, Cheng N, Tai B, Jiang H, Li J, Bian Z. Randomized controlled trial on fluoride varnish application for treatment of white spot lesion after fixed orthodontic treatment. Clin Oral Investig. 2012 Apr;16(2):463-8.

Duchin S, van Houte J. Relationship of *Streptococcus mutans* and lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man. *Arch Oral Biol.* 1978;23(9):779-86.

Eisenburger M1, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. *Caries Res.* 2001 May-Jun;35(3):211-5.

Elkassas D, Arafa A. Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *J Dent.* 2014 Apr;42(4):466-74.

Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999 Feb;27(1):31-40.

Fernández CE, Tenuta LM, Zárate P, Cury JA. Insoluble NaF in Duraphat® may prolong fluoride reactivity of varnish retained on dental surfaces. *Braz Dent J.* 2014;25(2):160-4.

Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral Biol.* 2007 Jan;52(1):9-14.

Gao XJ, Elliot JC, Anderson P. Scanning and contact microradiographic study of the effect of degree of saturation on the rate of enamel demineralization. *J Dent Res* 1991 70: 1332–1337.

Gerhardt DE, Windeller AS. Fluoride uptake in natural tooth surfaces pretreated with aluminum nitrate. *J Dent Res.* 1972;51(3):870.

Gerhardt DE, Windeller AS. Fluoride uptake in natural tooth surfaces pretreated with aluminum nitrate. *J Dent Res.* 1972 May-Jun;51(3):870.

González-Cabezas C, Jiang H, Fontana M, Eckert G. Effect of low pH on surfasse rehardening efficacy of high concentration fluoride treatments on non-cavitated lesions. *J Dent.* 2012;40(6):522-6.

Hellwig E, Lennon AM. Systemic versus topical fluoride. *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):258-62.

Höök M, Christoffersen J, Christoffersen MR, Leonardsen ES, Rassing MR, Rostrup E. Effects of aluminum (III) and fluoride on the demineralization of bovine enamel: a longitudinal microradiographic study. *Scand J Dent Res*. 1994;102(4):198-201.

Iijima Y, Koulourides T. Fluoride incorporation into and retention in remineralized enamel. *J Dent Res*. 1989 Aug;68(8):1289-92.

Ingram GS, Agalamanyi EA, Higham SM. Caries and fluoride processes. *J Dent*. 2005 Mar;33(3):187-91.

Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, Pitts NB. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2007 Jun;35(3):170-8.

Jardim JJ, Pagot MA, Maltz M. Artificial enamel dental caries treated with different topical fluoride regimes: an in situ study. *J Dent*. 2008 Jun;36(6):396-401.

Katz CR, de Andrade Mdo R, Lira SS, Ramos Vieira EL, Heimer MV. The concepts of minimally invasive dentistry and its impact on clinical practice: a survey with a group of Brazilian professionals. *Int Dent J*. 2013 Apr;63(2):85-90.

Kim Y, Son HH, Yi K, Kim HY, Ahn J, Chang J. The color change in artificial white spot lesions measured using a spectroradiometer. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):139-46.

Koletsis-Kounari H, Mamai-Homata E, Diamanti I. An in vitro study of the effect of aluminum and the combined effect of strontium, aluminum, and fluoride elements on early enamel carious lesions. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Jun;147(1-3):418-27.

Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB. Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimes on enamel initial carious lesions. *J Dent*. 2010;38(2):166-71.

Lippert F, Lynch RJ. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Arch Oral Biol*. 2014 Jul;59(7):704-10.

Lippert F, Martinez-Mier EA, Zero DT. An in situ caries study on the interplay between fluoride dose and concentration in milk. *J Dent*. 2014 Jul;42(7):883-90.

Lippert F. Dose-response effects of zinc and fluoride on caries lesion remineralization. *Caries Res.* 2012;46(1):62-8.

Little MF, Steadman LT. Chemical and physical properties of altered and sound enamel. IV. Trace element composition. *Arch Oral Biol.* 1966;11(3):273-8.

Lynch RJ, Ten Cate JM. The effect of lesion characteristics at baseline on subsequent de- and remineralisation behaviour. *Caries Res.* 2006;40(6):530-5.

Magalhães AC, Comar LP, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF₄) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. *J Dent.* 2008 Feb;36(2):158-62.

Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MA. Effect of a single application of TiF₄ and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. *J Dent.* 2010 Feb;38(2):153-7.

Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res.* 2009;43(6):474-83.

Maltz M, Jardim JJ, Alves LS. Health promotion and dental caries. *Braz Oral Res.* 2010;24(Supl 1):18-25.

Marsh P; Martin M. *Microbiologia Oral.* 4^a Ed. São Paulo: Santos; 2005. p. 82-103.

McCann HG. The effect of fluoride complex formation on fluoride uptake and retention in human enamel. *Arch Oral Biol.* 1969 May;14(5):521-31.

McKay FS, Black GV. An investigation of mottled teeth. *Dental Cosmos* 1916;58:477-84.

McKay FS. The establishment of a definite relation between enamel that is defective in its structure as mottled enamel and its liability to decay. *Dental Cosmos* 1928;71:747-55.

Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992 Apr;71 Spec No:913-9.

Mesinkai PK, Ccahuana-Vasquez RA, Chedjieu I, Amaechi BT, Mackey AC, Walker TJ et al. In situ remineralization of white-spot enamel lesions by 500 and 1,100 ppm F dentifrices. *Clin Oral Investig*. 2012;16(4):1007-14.

Moreno EC, Zahradnik RT. Demineralization and remineralization of dental enamel. *J Dent Res*. 1979 Mar;58(Spec Issue B):896-903.

Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf MA, Magalhães AC. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Res*. 2013;47(2):162-70.

Moron BM, Miyazaki SS, Ito N, Wiegand A, Vilhena F, Buzalaf MA, Magalhães AC. Impact of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on tooth erosion/abrasion in vitro. *Aust Dent J*. 2013 Mar;58(1):106-11.

Nahsan FP, da Silva LM, Baseggio W et al. Conservative approach for a clinical resolution of enamel white spot lesions. *Quintessence Int*. 2011;42(5):423-6.

Navarro MFL, Franco EB, Mondelli J, Pereira JC, Martins LRM. Remineralização de manchas brancas em esmalte.. *Revista Estomatologia e Cultura*. 1985;15(4): 41-46.

Palamara J, Phakey PP, Rachinger WA, Orams HJ. Laminated zones in carious human dental enamel. *J Oral Pathol*. 1986;15(2):109-14.

Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J*. 2008;19(1):21-7.

Quensel CE, Gustafsson BE, Grahnen H. The Vipeholm dental caries study: reliability of the method in the determination of caries activity. *Acta Odontol Scand*. 1954 Sep;11(3-4):365-88.

Rehder Neto FC, Maeda FA, Turssi CP, Serra MC. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent*. 2009 Oct;37(10):786-90.

Robinson C. Fluoride and the caries lesion: interactions and mechanism of action. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(3):136-40.

Rodrigues E, Delbem AC, Pedrini D, Cavassan L. Enamel remineralization by fluoride-releasing materials: proposal of a pH-cycling model. *Braz Dent J*. 2010;21(5):446-51.

Soni NN, Brudevold F. Microradiographic and polarized light studies of initial carious lesions. *J Dent Res*. 1959 Nov-Dec;38:1187-94.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011 Mar;90(3):294-303.

Thylstrup A. Clinical evidence of the role of pre-eruptive fluoride in caries prevention. *J Dent Res*. 1990 Feb;69 Spec No:742-50.

Vieira AE, Delbem AC, Sassaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res*. 2005 Nov-Dec;39(6):514-20.

Wiktorsson AM, Martinsson T, Zimmerman M. Caries prevalence among adults in communities with optimal and low water fluoride concentrations. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1992 Dec;20(6):359-63.

Zhang Q, Zou J, Yang R, Zhou X. Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2011 Sep;21(5):374-81.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Valores de profundidade da lesão (LD), perda mineral integrada (ΔZ) e a média de mineral perdido ao longo da lesão (R) encontrados após análise de TMR

GRUPO	Amostra	Área	ΔZ	LD	R	Sslayer		Porção erodida
						μm	%	
V	83	D	1550	56,2	27,6			
V	83	R	440	17,4	25,5			
V	83	N	840	18,7	45,5			
V	92	D	3010	118,6	25,4			
V	92	R	1090	52,1	20,9			14,5
V	92	N	1020	48,8	20,9			
V	97	D	810	57,4	14,1			
V	97	R	870	41	21,3			
V	97	N	750	41	18,3			
V	99	D	1820	40,8	38			7,2
V	99	R	2090	67,4	31			
V	99	N	610	23,1	26,2			2,7
V	100	D	2170	63,6	34,2	7	49	
V	100	R	860	27,9	30,9			33,3
V	100	N	1740	129,3	13,4			
V	104	D	1330	70	19			
V	104	R	740	53,2	13,8			16,7
V	104	N	870	28,9	30,1			21
V	105	D	2560	97	26,4	7	23	
V	105	R	2250	130	17,3	9	50	
V	105	N	1370	58,8	21,9			3,9
V	111	D	1960	58,4	33,6	8	42	
V	111	R	470	25,3	18,5			16,2
V	111	N	510	24,3	21,1			10,4
V	113	D	1790	55,3	32,4			
V	113	R	2030	82	24,7	8	48	
V	113	N	2250	116,7	19,2			
V	114	D	1850	90,8	20,3			
V	114	R	1770	115,2	15,3			
V	114	N	1100	61,4	18,1			
V	129	D	1520	52,6	28,9	7	46	
V	129	R	620	32,2	19,2			14,4
V	129	N	630	25,4	24,9			5,3
V	133	D	2000	88,8	22,5			
V	133	R	2530	129,8	19,5			
V	133	N	1910	113,9	16,8			4
F	8	D	1500	62,1	24,1	2	30	
F	11	D	4140	112,8	36,7	0	40	
F	11	N	2160	142,2	49,8			43,3
F	20	D	1320	48,9	27	5	36	
F	20	R	1000	134,3	10,8			41,3

F	21	D	3010	77,2	39	92	86	
F	43	D	2430	79	30,7	4	32	
F	43	N	910	64	36,6			39,1
F	45	D	2440	173,8	14			
F	45	N	2240	140,9	17,8			15,1
F	18	R	1050	76,4	20,5			25,4
F	26	R	1000	134,3	10,8			41,3
F	45	R	3130	193,5	18,4			23,4
F	54	D	1380	63,3	21,8			
F	54	R	750	43,3	36,9			22,9
F	54	N	2920	101,5	28,7	73	83	
F	60	T	920	82,1	17,4			29,4
F	75	D	4880	163,8	29,8			
A+N	15	D	2770	75,6	36,6	9	6	
A+N	17	D	1840	60,1	30,6	5	25	
A+N	19	D	1140	26,2	43,5	2	27	
A+N	22	D	1560	44,8	34,9	120	87	
A+N	30	D	5440	164,2	33,1			
A+N	32	D	3120	114,3	27,3	5	20	
A+N	38	D	1660	115,5	19,4			
A+N	19	R	1490	135,2	14,5			32,4
A+N	23	R	890	63,4	32,4			35,8
A+N	30	R	720	56,5	18,7			18
A+N	52	R	500	52,4	22			30,4
A+N	15	N	2340	114	23			11,9
A+N	19	N	450	33,9	44,6			23,7
A+N	22	N	1400	48,9	28,6	352	87	
A+N	23	N	270	52,3	24,3			41,2
A+N	30	N	6030	213	310			18,4
A+N	32	N	620	47,8	38,5			31,6
A	87	D	1430	85,6	16,7			
A	87	R	960	41,7	23			
A	87	N	2120	72,1	29,5			
A	89	D	1610	46,4	34,6	7	55	
A	89	R	2720	131,6	20,7	3	36	
A	89	N	2960	145,1	20,4			
A	95	D	2330	50,2	46,4			
A	95	R	1340	44,6	29,9			
A	95	N	1520	77,6	19,6			
A	107	D	1290	30,8	37,1			5,1
A	107	R	420	21,7	19,2			19,6
A	107	N	620	32,9	19			43,5
A	109	D	1520	100,3	15,2			14,3
A	115	D	2830	108,8	26			
A	115	R	3360	130,4	25,8			
A	115	N	560	31,1	17,8			49

A	117	D	3100	98	31,6	11	32	
A	117	R	1180	34,6	34			33,3
A	117	N	330	14,8	22,2			9,5
A	118	D	2020	117,1	17,2			15,7
A	118	R	2080	131,4	15,8			
A	118	N	1370	119,4	11,5			
A	128	D	830	32,1	25,8			6,2
A	128	R	620	32,2	19,2			14,4
A	128	N	630	25,4	24,9			5,3
N	78	D	1450	53,5	23,9			7,2
N	78	R	710	32,8	21,5			17,7
N	78	N	2400	178,8	13,4			
N	85	D	2820	167,6	16,8	6	51	
N	85	R	1350	54,1	25			2,6
N	85	N	1130	80,2	14,1			7,9
N	86	D	1300	42	30,9	4	58	
N	86	R	1690	48,8	34,6	7	51	
N	86	N	1100	46,6	23,5			4,7
N	91	D	1400	51,4	27,2	6	67	
N	91	R	1319	52,4	25	5	59	
N	91	N	2160	84	25,7			
N	94	D	1420	73,9	19,2			
N	94	R	880	44,3	19,9			
N	94	N	830	27,5	30,3			53,3
N	96	D	1000	57,6	17,3			6,2
N	96	R	840	76,4	11,1			
N	96	N	350	18,2	19,2			26,7
N	108	D	2410	102,2	23,6			
N	108	R	1300	59,9	21,8			
N	108	N	1370	49,2	27,8			12,3
N	110	D	3530	132	26,7			
N	110	R	3630	133,3	27,3			
N	110	N	1800	139,6	12,9			
N	112	D	2040	79,7	25,6	5	44	
N	112	R	1430	50,8	28,2	12	60	
N	112	N	1560	39,4	39,5			17,5
N	120	D	1750	48,1	36,4	9	49	
N	120	R	1830	78,4	23,4	16	55	
N	120	N	1190	48,6	24,6			8,7
N	124	D	1590	86,3	18,5			24,4
N	124	R	1510	101,1	15			
N	124	N	1690	127,6	13,2			15,6
N	130	D	1190	83,7	14,2	12	67	
N	130	R	1430	61,3	23,3	11	56	
N	130	N	2600	98,4	26,4	15	28	