**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas

**Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de
mancha branca: análise *in vitro* e *in situ***

**BAURU
2015**

Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas

**Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de
mancha branca: análise *in vitro* e *in situ***

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de DOUTORA em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Dentística.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Fidela de Lima Navarro

Versão Corrigida

**Bauru
2015**

Freitas, Maria Cristina Carvalho de Almendra

F884e   Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca: análise *in vitro* e *in situ* / Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas -- Bauru, 2015.

130 p. : il. ; 31 cm.

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

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

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 pra fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

DEDICATÓRIAS

*Aos meus pais, **Antônio Neto** e **Carlota**. Vocês são a minha inspiração. Cada um, à sua maneira, são exemplos diários e estímulo para tudo o que faço. Minha mãe: o maior exemplo de amor e dedicação com as filhas, de integridade, retidão e generosidade. Meu pai: sem dúvida, o maior incentivador em cada passo da minha carreira. Exemplo de respeito ao próximo, discrição, simplicidade e sabedoria. Ambos são pessoas admiráveis e admiradas por todos que conheço. O orgulho que sinto em ter pais tão maravilhosos me faz querer devolver esse orgulho de todas as maneiras que posso. É tudo por vocês e para vocês!*

*À minha irmã, **Carol**, minha metade, minha eterna companheira. Talvez a nossa ligação tão forte só se explique pela máxima “os opostos se atraem”. As nossas diferenças só vêm para somar e complementar. Eu não seria completa sem você.*

*À **minha família**, por serem os maiores torcedores e vibrarem com cada conquista minha. Por todo amor e carinho dispensado à “caçulinha” e eterna neném da família.*

*Aos meus **amigos do Piauí**, por se fazerem presentes sempre. A amizade de vocês é a minha certeza de que o que é de verdade não muda com o tempo nem com a distância. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Linda Wang**. Ter a oportunidade de trabalhar com você é, sem dúvida, um aprendizado constante. Sua dedicação em tudo que faz, sua competência e seu amor à profissão são admiráveis e inspiram todos os que convivem com você. Sou muito grata por esta oportunidade e saio daqui levando muitas lições para a minha carreira. Mas o maior agradecimento vai à amiga Linda. Muito mais que uma orientadora, ganhei uma conselheira, confidente, companheira de viagens e lanchinhos no fim da tarde, alguém com quem posso contar... Uma verdadeira amiga. Sua presença na minha rotina fará muita falta (não vamos falar muito sobre isso), mas sei que estará sempre presente, de coração (e via whatsapp), em cada passo que eu der daqui pra frente. Obrigada, de coração, por tudo o que representa para mim!*

*À minha eterna orientadora, **Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro**. Tudo o que a senhora representa profissionalmente já é conhecido e reconhecido mundialmente e já agradeço inúmeras vezes pela importância desse aprendizado. Mas só quem tem o prazer de conviver além da faculdade sabe a dimensão do ser humano que é. O alto astral contagiante, a simplicidade, a generosidade, a humildade, a dignidade, a positividade, a sabedoria e a coragem são só algumas das suas qualidades que me vêm à cabeça rapidamente quando penso na senhora. Fazer parte do seu time de “santinhos” foi um dos maiores presentes que ganhei aqui. Muito obrigada por todas as oportunidades que me concedeu e por todas as lições, muito além da Odontologia!*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a **Deus**, por todas as bênçãos na minha vida e especialmente por todas as pessoas tão especiais que ele coloca à minha volta.*

Às minhas amigas mais que especiais: Larissa Marinho, Marina Studart e Diana Gadelha.

***Larissa:** minha companheira em todos esses anos de Bauru. Minha colega da Especialização, amiga querida do Mestrado e minha irmã imprescindível do Doutorado. Nossa amizade foi crescendo com o tempo e a convivência, de uma forma natural. Nossas diferenças (e que diferenças!) nunca atrapalharam em nada por sabermos respeitá-las e acho que elas que fizeram você ser essencial na minha vida, pois aprendo demais com você. Acima de qualquer diferença, seus princípios e valores são admiráveis, seu coração é um dos maiores que já vi e suas relações com todas as pessoas são as mais verdadeiras. Obrigada por ter se mostrado além da sua “casca” de durona e ter me permitido entrar na lista tão seleta dos seus amigos. E agora que entrei, não saio. Ganhei até uma família cearense (já muito amada) por tabela. Nosso vínculo será para sempre. Sou muito feliz e honrada em ter acompanhado de perto do seu crescimento e em ter participado de alguma forma das maiores conquistas da tua vida. Foi só o começo!*

Marina: quantas vezes eu já te falei que sou sua fã? Você já deve ter perdido as contas, mas eu queria deixar claro mais uma vez. Admiro você em todos os sentidos. Você é uma pessoa maravilhosa, bem humorada, sincera, companheira, amiga, conselheira, compreensiva, madura, divertidíssima... Uma profissional competente e dedicada, que faz tudo o que se propõe com o maior amor e determinação e o resultado não poderia ser outro além de muito sucesso. Você é o tipo de pessoa que faz bem ter por perto e eu nunca mais vou deixar de participar da sua vida. Me aguarde em Fortaleza!

Diana: além de ser uma das grandes amigas, ainda é uma “irmã científica”. Participou de perto deste trabalho, sempre com a maior torcida e disponibilidade em ajudar. Seu jeito malquinho e estressado dava lugar à calma e confiança quando era disso que eu precisava, me dando a certeza de que eu faria um ótimo trabalho e tudo daria certo. Amiga sincera e leal, profissional super competente e “filha” atenciosa, que levava em conta todos os conselhos da “matriarca” aqui. Sei o quanto você sofre com despedidas, mas saiba que sinto o seu carinho esteja onde estiver e vou estar presente na sua vida sempre.

Às três: Vocês são os maiores presentes que o Doutorado me deu e sei que irá além. As brincadeiras constantes (de amigos homens - nossa principal característica!), as conversas sérias quando preciso, todo o apoio que vocês sempre me deram e a maior torcida do mundo que sei que vocês têm por mim, todas as idas sagradas ao Lokma, Bongo e Noboru, os dias cheios de músicas e danças no apartamento, as noites regadas a pipoca e programas bobos de TV, as conversas mais loucas no grupo do Whatsapp, os conselhos que vão desde “look do dia” até assuntos profissionais... A convivência com vocês nos últimos anos fizeram tudo ser mais leve. Amo muito cada uma de vocês!

---

*À minha orientada de Iniciação Científica, Larissa Vasconcellos Nunes, ou simplesmente a **Tchelsy**. Como diz a nossa orientadora, o que aconteceu conosco foi um encontro mesmo, criamos uma relação muito além da profissional e qualquer coleguismo. Você virou uma grande amiga, uma irmãzinha mais nova, ou como costumamos dizer: minha “filha”. Nem sei dizer o tamanho do orgulho que sinto em saber que sou inspiração para você. E acredite: você vai ser muito mais que a Kiki “quando crescer”. Ter você no meu dia-a-dia durante a execução dessa pesquisa foi uma alegria. Você foi um exemplo de orientada: dedicada, desenrolada, cumpriu o trabalho de forma exemplar, me ajudou em tudo o que precisei sempre com a maior disposição, um sorriso no rosto, muita conversa e vários passinhos de dança! Para completar, uma pessoa sensacional, de uma inteligência e perspicácia de poucos, sincera, engraçada, atenciosa e super amiga! Se você não existisse na minha vida, eu teria que te inventar. Distância nenhuma vai quebrar o vínculo que construímos. Sentirei saudades dos bilhetinhos deixados no meu carro, recadinhos na minha agenda, dos docinhos de uva e cada lembrancinha despretensiosa que alegrava os meus dias. Whatsapp, Snapchat, Instagram, Facebook e telefone estão a nosso favor, mas ainda te espero no Piauí. Só não vai me esperar casar para fazer essa visita prometida, hein? Obrigada por tudo! Amo você!*

*Às minhas queridas “**Lívias**”, minha primeira família bauruense, que não participaram fisicamente desta etapa, mas sempre estiveram presentes de coração.*

*Aos meus **companheiros de Doutorado**: Ana Carolina, Guilherme, e Larissa. A convivência no Doutorado foi menor com o passar dos anos, mas levarei para sempre o carinho e a amizade de vocês. Obrigada pelo conhecimento e experiências compartilhadas!*

***Carol:** uma amiga muito querida, que eu sei que mesmo não vendo ou falando todos os dias, está sempre torcendo por mim e vibrando com cada conquista minha. Para completar, me deu de presente o “Bolotinha” mais lindo do mundo, que alegrou muitos dos meus dias no último ano em Bauru. Conte comigo sempre!*

***Gui:** sem dúvidas, você será uma das maiores lembranças da minha vida bauruense. Companheiro desde o primeiro dia e assim continuou durante muito tempo. Quanta história temos para contar, não? Os caminhos diferentes nos afastaram fisicamente nos últimos anos, mas lembrarei de todos os momentos que compartilhamos para sempre. Apadrinhar seu casamento é a prova de que nosso vínculo não para por aqui. Obrigada pela sua amizade!*

*Aos **Professores** do Departamento de Dentística e Materiais Odontológicos, por todos os ensinamentos transmitidos:*

Prof. Dr. Adilson Furuse

Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Sanches Borges

Prof. Dr. Aquira Ishikiriana

Prof. Dr. Carlos Eduardo Francischone

Prof. Dr. Eduardo Batista Franco

Prof. Dr. José Carlos Pereira

Prof. Dr. José Mondelli

Prof^a. Dr^a. Juliana Bombonatti

Prof^a. Dr^a. Linda Wang

Prof^a. Dr^a. Maria Fidela de Lima Navarro

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Atta

Prof. Dr. Paulo Afonso Silveira Francisconi

Prof. Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli

Prof. Dr. Sérgio Kiyoshi Ishikiriana

---

*Um agradecimento especial à **Profa. Teresa** que é, sem dúvidas, um dos grandes exemplos de professora que eu pretendo seguir. Que entende que ser professor vai muito além de “dar aula”, acompanhando de perto seus alunos, percebendo dificuldades, ajudando a superá-las, estimulando o crescimento e, assim, crescendo junto com eles. Esse é o real sentido da profissão! Obrigada por me ensinar tudo isso. Além de grande exemplo, também se tornou uma amiga muito querida, garantia de diversão, boa conversa e comida melhor ainda.*

*À **Profa. Dra. Carol Magalhães**, “braço direito” durante toda a execução deste trabalho. Não sei se conseguiria me aventurar pelo mundo da Cariologia sem o seu apoio no Departamento de Bioquímica desde o início desta pesquisa, ainda na fase do projeto. Obrigada por ter sido tão solícita, nos atendendo sempre tão bem e apresentando as melhores soluções em um piscar de olhos. A forma como você sempre me recebeu, me ensinou e ajudou foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Você é uma das pessoas que me inspiram!*

*À **Profa. Dra. Anuradha Prakki**, minha orientadora no período de estágio na University of Toronto. Por ter acreditado no nosso trabalho e permitido a realização da pesquisa no exterior e de um sonho pessoal. Por ter me recebido tão bem, me oferecido todo o apoio que estava ao seu alcance, ter sido sempre tão disponível e, acima de tudo, por ser essa pessoa sensacional, agradável, bem humorada, sensível e amiga que eu tive o prazer de conviver. Sua alegria contagia a todos. Você é uma pessoa iluminada. Que Deus te abençoe!*

*Ao **Prof. Dr. Heitor**, pela contribuição com a estatística deste trabalho e toda disponibilidade, sempre nos atendendo com a maior atenção e garantia de uma boa conversa. Por saber simplificar o que pareceria impossível de entender e fazer a estatística não parecer mais um “Bicho de sete cabeças”. Só umas quatro...*

---

*À **Profa. Dra. Dani Rios**, talvez a maior responsável pelo início deste trabalho. Que nos deu a ideia inicial, mesmo sem perceber, quando ainda estávamos lutando para desenvolver um projeto interessante. E depois que resolvemos adentrar no assunto, sempre se mostrou tão solícita, nos apoiou, compartilhou conhecimento e experiências que fizeram toda a diferença durante todo o desenvolvimento da pesquisa.*

*Aos meus **professores da graduação**, que tanto me apoiaram, deram conselhos, vibraram com minhas conquistas e tiveram papel fundamental na minha formação.*

*Aos **contemporâneos de Pós-Graduação** em Dentística/Materiais Odontológicos: todos os colegas tiveram sua participação e importância, de alguma forma, nesta etapa. Seja por ajuda direta na pesquisa, conhecimento compartilhado, parcerias em outros trabalhos ou até mesmo as conversas aleatórias pelos corredores e laboratórios e as programações “extra-FOB” que fizeram a minha rotina ficar muito mais leve. Obrigada a todos!*

*Destes, não posso deixar de destacar alguns colegas. **Marina Giacomini**: nossa “Marininha”. Sempre tão querida e tão solícita... Essa é uma daquelas pessoas que representa unanimidade. Quem não adora esse doce de menina? Tive o maior prazer de conviver desde o seu tempo de graduação e acompanhar o crescimento, até que ela se tornasse minha “irmã científica”. Bixete querida, obrigada por ter sido sempre tão disponível quando precisei, por todas as conversas e o apoio que sempre me deu. Você não sabe do orgulho que senti quando ouvi alguém te chamar de “a nova Kiki”. **Odair**: a convivência com você trouxe muita diversão, fazendo até surgir uma palavra nova no nosso vocabulário - “odairzice”. Sua inteligência é admirável. Além disso, se tornou um amigo muito querido, que espero manter o contato sempre. **Rapha**: a “step”*

---

do grupo das nordestinas, sempre de bom humor, alegre e engraçada. Vou sentir falta dos nossos lanchinhos no Departamento de Materiais, sempre regados a muuuuuita conversa! **Lígia**: para mim, será sempre a Tchuca! Também tive o prazer de acompanhar desde os tempos de graduação e de me aproximar aos poucos para poder conhecer de fato a pessoa linda que é. Os encontros com você são garantia de um ótimo papo e diversão acima de tudo. Você é uma querida! Conte comigo sempre! **Letícia**: uma querida, mais uma unanimidade no Departamento. Seu jeitinho doce conquista a todos que têm o prazer de conhecer. Continue sempre assim! **Marília e Rafa Simões**: os mais novos “lindinhos”! Apesar do pouco tempo de convivência, vocês foram sempre tão atenciosos e disponíveis comigo que eu só posso sentir muito de não ter tido a oportunidade de aproveitar mais tempo com vocês, mas estarei sempre à disposição para o que precisarem, de coração.

Às “meninas da **Bioquímica**”: **Bia, Cris, Livia, Luiza, Mileni e Senda** pelas dicas em todas as fases do trabalho, por estarem sempre dispostas a me ajudar e pela companhia na faculdade e fora dela - garantia de diversão! Um agradecimento especial à **Livia Comar**: sem você para me guiar no início desse trabalho, ele poderia até ser possível, mas seria bem mais difícil, sem dúvidas. Obrigada por me “ciceronear” em um Departamento estranho para mim, por todos os ensinamentos, pela paciência para me ensinar toda a metodologia, por todas as dicas e o apoio de sempre. Esse trabalho também é seu! Estendo o agradecimento ainda à ex-aluna **Bruna Moron**, que também foi muito atenciosa e me deu muitas dicas lá no comecinho, quando eu ainda estava planejando me aventurar nessa pesquisa. Muito obrigada!

Aos meus queridos voluntários da fase in situ: Ana Flávia, Audria, Bhenya, Elaine, Letícia, Lígia, Luara, Maria Angélica, Marília, Marina, Marlyni, Melody, Rafael Menezes e Rafael Simões. Sei que não é fácil nem cômodo, mas vocês entenderam que sem vocês não seria possível e abraçaram a causa. O quanto eu agradecer, será pouco. Muito obrigada!

A todos os funcionários do Departamento de Dentística e Materiais Odontológicos: Alcides, Audria, Charlene, Elízio, Lígia, Nat, Nelson, Rita, Sandrinha e Zuleica, sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

Audria e Nat: vocês se tornaram amigas muito queridas, sempre torcendo muito por mim e ajudando em tudo o que precisei! Se todos trabalhassem com o prazer que vocês trabalham, tudo seria bem mais fácil. Além disso, tive o prazer de levar essa relação além da faculdade, de conhecer melhor duas pessoas tão especiais e de estender essa relação até para as famílias. Minhas amadinhas, vocês estão no meu coração sempre! Nelson: mesmo atolado de trabalho, sempre me atendeu prontamente e me ajudou em tudo o que eu precisei. Para melhorar, a ajuda vinha sempre com uma piada e um sorriso no rosto. Sua presença no Departamento é essencial. E já falei: se daqui a 10 anos alguém falar de mim e você perguntar “mas quem é essa Kiki?”, eu volto aqui para acertar minhas contas contigo, ok? Rita: ainda vamos descobrir como você faz para dar conta de todo o seu trabalho e ainda atender bem e imediatamente os alunos todas as vezes que precisamos (que são muitas). Obrigada por tudo o que faz por nós e pela pessoa tão querida que é! Alcides: muito obrigada pela disponibilidade, por sempre dar um jeitinho para tudo o que precisamos e pelos lanchinhos no Departamento. Só falta mesmo eu aprender a fazer café igual a você! Charlene: com aquele jeitinho quieto, mas sempre com um sorriso no rosto e disposta a ajudar. E depois que ganha intimidade, essa vem muito bate-papo e altas risadas. Muito obrigada pela ajuda na execução da pesquisa!

Às **funcionárias** do Departamento de Bioquímica, **Aline, Larissa e Thelma**, pela disponibilidade e atenção dispensada sempre que precisei.

Às **funcionárias** da Pós Graduação, em especial a **Cleusa e Hebe**, pela colaboração nos trabalhos realizados e, acima de tudo, pelo carinho demonstrado sempre.

Aos demais funcionários da Faculdade, que sempre desempenharam suas funções com muita competência.

Ao **Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)** e às **turmas de graduação da FOB-USP: XLVIII, XLIX e L**, por permitirem que eu começasse a exercitar a docência. Agradeço a todos os alunos da graduação pela confiança e o carinho enorme que sempre me trataram. Em especial, à **Turma L**, por terem me escolhido como Pós-graduanda homenageada. A emoção desse reconhecimento só é compreendida por quem passa por ela. O meu “muito obrigada”, mais uma vez!

A todos os meus **amigos bauruenses**, por me fazerem amar essa cidade que já se tornou a minha segunda casa.

A todos os **amigos canadenses**, que fizeram esta experiência ser ainda mais incrível. E um agradecimento especial aos **companheiros da UofT: Tati, Carlos, Terry, Rafael, Bia, Yaoyang e Luis**, que fizeram a rotina de trabalho ser mais prazerosa e divertida. Levarei vocês sempre comigo! À técnica do laboratório **Keying** e à **Miria**, técnica do Advanced Optical Microscopy Facility (AOMF), pela disponibilidade e ajuda na execução da pesquisa.

---

*À **Faculdade de Odontologia de Bauru** - Universidade de São Paulo, por meio de sua diretora Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado e à **Comissão de Pós-graduação** da FOB-USP, na pessoa de seu presidente Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.*

*À **FAPESP** pela concessão das bolsas de Doutorado e de Estágio em Pesquisa no Exterior.*

A todos que, direta ou indiretamente, participaram ou contribuíram para a execução deste trabalho.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”

(Johann Goethe)

“Se o conhecimento pode criar problemas, não será através da ignorância que os resolveremos.”

(Isaac Asimov)

RESUMO

Dentre as estratégias de tratamento de lesões incipientes de cárie, no estágio de mancha branca ativa, o infiltrante resinoso tem sido empregado, preenchendo os poros do esmalte e impedindo a sua progressão. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do infiltrante de cárie (Icon®) sobre lesões cariosas artificiais produzidas por diferentes protocolos e a eficiência deste tratamento após novo desafio ácido por modelos experimentais *in vitro* e *in situ*, utilizando a microdureza de superfície (MS) e longitudinal (ML). Na fase *in vitro*, lesões cariosas artificiais foram produzidas em 45 espécimes de esmalte bovino (6x4mm) através de três diferentes protocolos (ciclagem DES-RE, gel MC e solução MHDP). Os espécimes foram tratados com o infiltrante e submetidos a novo desafio ácido por ciclagem DES-RE. Este delineamento resultou em 4 condições em um mesmo espécime: hígida (H), após a desmineralização (D), após o tratamento com o infiltrante (I) e após o novo desafio ácido (N). Na fase *in situ*, 15 voluntários usaram dispositivos palatinos contendo dois espécimes por 14 dias, induzindo a lesão por meio de gotejamento de solução de sacarose 8x/dia. Nas duas fases, a MS e ML foram avaliadas em todas as condições dos espécimes até 220µm. Os dados foram coletados e processados pela porcentagem da diferença com os valores iniciais da condição hígida para serem analisados estatisticamente de acordo com ANOVA (medidas repetidas) e teste de Tukey ($p<0,05$). No estudo *in vitro* e *in situ* todos os protocolos de desmineralização foram capazes de produzir lesões de cárie de subsuperfície. Todos os protocolos *in vitro* promoveram perda de dureza de superfície maior que 75%, enquanto o protocolo *in situ* promoveu quase 40%. Há uma redução da perda de dureza à medida que a profundidade aumenta em todos os casos, sendo as particularidades mais observadas até 50 µm. O infiltrante avaliado em todas as condições foi capaz de re-equilibrar parcialmente a dureza interna, entretanto sua resistência e efeito após o novo desafio ácido apresentou-se limitado.

Palavras-chave: Cárie dentária. Desmineralização. *In vitro*. Testes de dureza. Resinas.

ABSTRACT

Effect of a resinous infiltrant on the treatment of white spot lesions: *in vitro* and *in situ* analysis

Among the strategies for early caries lesions treatment as active white spot, the resin infiltrant has been employed filling the enamel pores and preventing their progression. The aim of this study was to evaluate the effect of caries infiltrant (Icon®) on artificial carious lesions produced by different protocols, and the efficiency of this treatment after new challenge acid by *in vitro* and *in situ* experimental models, using the surface microhardness (SH) and cross-sectional microhardness (CSH). In the *in vitro* phase, artificial carious lesions were performed on 45 enamel bovine specimens (6x4mm) by three different protocols (DE-RE cycling, MC gel and MHDP solution). The specimens were treated with the infiltrant and subjected to a new challenge by DE-RE cycling. This design resulted in four conditions at the same specimen: sound (S), after demineralization (D), after the treatment with infiltrant (I) and after the new acid challenge (N). In the *in situ* phase, 15 volunteers wore intra-oral appliances containing two specimens for 14 days, inducing the lesion formation by sucrose solution dripping 8x/day. In both models, SH and CSH were evaluated in all conditions of the specimens up to 220µm. Data were collected and processed as percentage from the difference to each condition compared to sound stage to be statistically analyzed with ANOVA (repeated measures) and Tukey test ($p < 0.05$). For all tested conditions, demineralization protocols were able to produce subsurface carious lesions. All *in vitro* protocols promoted hardness loss higher than 75% while *in situ* protocol promoted almost 40%. There is a reduction in the hardness loss as the depth increases, in which the main differences can be noticed up to 50µm. The infiltrant evaluated in all conditions was able to partially re-balance the internal hardness, however its strength and effect after the new challenge acid had been limited.

Keywords: Dental caries. Demineralization. *In vitro*. Hardness tests. Resins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Cortes sendo feitos com os dois discos e o uso de espaçadores.....	52
Figura 2:	Aparência do espécime pronto, após polimento.	53
Figura 3:	Ponta Knoop utilizada.	54
Figura 4:	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, sendo H: controle (esmalte hígido), D: esmalte desmineralizado (pelos diferentes protocolos), I: esmalte desmineralizado e tratado com o Infiltrante, N: esmalte submetido a novo desafio ácido após tratamento com o infiltrante.....	55
Figura 5:	Imagem representativa em TMR de espécime desmineralizado pelo protocolo de ciclagem DES-RE.	57
Figura 6:	Imagem representativa em TMR de espécime desmineralizado pelo protocolo do gel MC.	57
Figura 7:	Imagem representativa em TMR de espécime desmineralizado pelo protocolo da solução MHDP.....	58
Figura 8:	Espécimes embutidos em resina acrílica para leituras longitudinais.	60
Figura 9:	Aparelho intrabucal palatino.....	62
Figura 10:	Gráfico representativo mostrando as diferenças de perda de dureza entre as profundidades para todos os protocolos de desmineralização da etapa <i>in vitro</i>	71
Figura 11:	Gráfico representativo mostrando as diferenças de perda de dureza entre as profundidades da etapa <i>in situ</i>	74

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADROS

Quadro 1:	Tipos de protocolos utilizados para indução de lesão de cárie artificial	55
Quadro 2:	Sequência de tratamento com o infiltrante Icon®.	59

- TABELAS

Tabela 1:	Médias e desvio-padrão da perda de dureza de superfície ΔMS (%) entre cada etapa comparada aos valores de dureza da condição hígida.	69
Tabela 2:	Médias e desvio-padrão da perda de dureza longitudinal ΔML (%) entre cada etapa comparada aos valores de dureza da condição hígida.	70
Tabela 3:	Valores de mediana e quartis da perda de microdureza de superfície ΔMS (%) entre cada etapa comparada à fase inicial hígida.	72
Tabela 4:	Valores de média e desvio-padrão da perda de microdureza longitudinal ΔML (%) entre cada etapa comparada à fase inicial hígida.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
D	Esmalte desmineralizado
DES	Desmineralização
g	Gramas
H	Esmalte hígido
I	Esmalte desmineralizado e tratado com infiltrante
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MC	Metilcelulose
MHDP	Metilenodifosfanato
ML	Microdureza longitudinal
MS	Microdureza de superfície
N	Esmalte submetido a novo desafio ácido após tratamento com o infiltrante
pH	Potencial hidrogênico
RE	Remineralização
s	Segundos
TEGDMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
TMR	Microradiografia
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
ΔML	Perda de dureza longitudinal
ΔMS	Perda de dureza de superfície

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Doença cárie: desenvolvimento e lesões incipientes.....	29
2.2	Modelos artificiais para indução de lesões de mancha branca.....	32
2.3	Emprego da análise de dureza em lesões artificiais de cárie	37
2.4	Tratamento de lesões de mancha branca	38
2.5	Infiltrante de cárie	40
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	Etapas de estudo.....	51
4.2	Seleção e preparo dos blocos de dentes bovinos (Etapas A e B)	51
4.3	Polimento do esmalte de dentes bovinos (Etapas A e B)	52
4.4	Análise de microdureza de superfície do esmalte inicial (Etapas A e B)	54
4.5	Fase experimental in vitro (Etapa A).....	54
4.5.1	Indução de lesão de cárie artificial em esmalte	55
4.5.2	Aplicação do Infiltrante de cárie (Icon®).....	58
4.5.3	Novo desafio ácido	59
4.5.4	Análise de microdureza de superfície do esmalte final.....	59
4.5.5	Análise de microdureza longitudinal do esmalte.....	60
4.6	Fase experimental in situ (Etapa B).....	61
4.6.1	Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	61
4.6.2	Seleção dos voluntários.....	61
4.6.3	Confecção dos aparelhos intrabucais palatinos	62
4.6.4	Fase experimental	63
4.6.5	Aplicação do Infiltrante de cárie (Icon®).....	63

4.6.6	Novo desafio ácido	64
4.6.7	Análise de microdureza de superfície do esmalte final.....	64
4.6.8	Análise de microdureza longitudinal do esmalte.....	64
4.7	Processamento dos dados	64
4.8	Análise estatística.....	65
5	RESULTADOS	67
5.1	Fase in vitro (Etapa A)	69
5.2	Fase in situ (Etapa B)	72
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS	103
	APÊNDICES.....	115

---

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

Uma grande evolução no conhecimento da doença cárie, nas últimas décadas, permitiu estratégias fundamentadas para o seu tratamento, incluindo a intervenção das lesões incipientes capaz de evitar a progressão para a fase de cavitação, o que exigiria abordagens mais agressivas (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986; TEN CATE, 1997; FEATHERSTONE, 2008; KIDD, 2011).

A maioria destes tratamentos se baseia na promoção do re-equilíbrio do processo entre a remineralização e a desmineralização, minimizando a continuidade da desmineralização (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; MOUNT; NGO, 2000; BUZALAF et al., 2011). Neste balanço, o uso de agentes fluoretados exerceu papel fundamental paralelamente à abordagem de conter e remover os demais agentes etiológicos da cárie (KEYES; SHOURIE, 1949; TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991; FEATHERSTONE, 2000; MAGALHÃES et al., 2007; CURY; TENUTA, 2009; BUZALAF et al., 2011; LYNCH et al., 2011; RAO; MALHOTRA, 2011).

O uso de produtos químicos é proposto considerando que a lesão de cárie inicial, que se manifesta clinicamente como uma mancha branca, resulta de um comprometimento incipiente em nível ultra-estrutural, ainda capaz de se reestruturar cristalinamente (FERJERSKOV; KIDD, 2005; TASHIMA, 2006). Neste momento, a lesão se caracteriza pela superfície externa aparentemente intacta, com desmineralização na subsuperfície (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986; TASHIMA, 2006).

Apesar do êxito destas abordagens, a ideia do uso de agentes mecânicos data da década de 70 (DAYILA et al., 1975; ROBINSON et al., 1976) e foi retomada, destacando-se o emprego do agente resinoso com o nome comercial de Icon®. Este produto em particular é composto essencialmente por um dimetacrilato, o TEGDMA, o que lhe confere um alto poder de penetração. Esta resina fluida teria a capacidade de preencher os poros do esmalte afetado, paralisando assim a sua progressão (PARIS; HOPFENMULLER; MEYER-LUECKEL, 2010; MEYER-LUECKEL et al., 2011; PARIS et al., 2011; ARAÚJO et al., 2014). Além da capacidade funcional de

---

paralisar a lesão, a vantagem estética do produto também é apontada, já que ele se mostra efetivo em mascarar as lesões de mancha branca, reproduzindo um índice de refração mais próximo a do esmalte não alterado (KIM et al., 2011; TORRES et al., 2011). Considerando esses benefícios em potencial, este novo produto tem sido objeto de estudo de vários trabalhos (PARIS; MEYER-LUECKEL, 2010; BELLI et al., 2011; MEYER-LUECKEL et al., 2011; TORRES et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014; PARIS et al., 2014; LAUSCH et al., 2015).

Entretanto, com base nos trabalhos que investigaram o mecanismo de ação dos infiltrantes, ainda existe uma falta de consenso de sua eficiência, considerando fatores como sua capacidade de penetração (profundidade) (PARIS et al., 2007; MEYER-LUECKEL; PARIS, 2008), o nível de comprometimento inicial da lesão ativa (PARIS et al., 2011), a forma de desmineralização prévia proposta (tipo e tempo de condicionamento ácido) (MEYER-LUECKEL; PARIS; KIELBASSA, 2007), o pré-tratamento da lesão (álcool, acetona ou nenhum) (PARIS et al., 2013b), o tempo de aplicação do material (MEYER-LUECKEL et al., 2006) e, principalmente, a sua resistência ao desafio ácido após aplicação (TORRES et al., 2012), averiguando, assim, a resistência deste tipo de tratamento frente a uma nova situação de desafio cariogênico.

Um dos fatores relevantes destas investigações recai sobre o uso de substratos cariados artificialmente produzidos (BELLI et al., 2011; PARIS et al., 2013a; ARAÚJO et al., 2014). Considerando que as lesões artificiais devem reproduzir desmineralizações subsuperficiais, com o mínimo de lesão superficial (MAGALHÃES et al., 2009), é preciso garantir uma forma mais aproximada desta condição para se interpretar os dados que possam ser extrapolados clinicamente.

Trabalhos como de Magalhães et al. em 2009 demonstraram por meio de análises de microdureza longitudinal e microradiografia, que os diferentes protocolos de indução de lesões incipientes de cárie determinam características distintas de desmineralização. A análise de microradiografia demonstrou a perda mineral, enquanto que a microdureza longitudinal apresentou informações referentes à resiliência do esmalte, o que pode ser interessante para o uso conjunto com um material resinoso como o infiltrante, que irá envolver os cristais de hidroxiapatita.

Nos estudos sobre a análise do efeito de diversos agentes químicos, sobretudo os fluoretados, na área de subsuperfície de lesões de cárie, a microdureza longitudinal tem sido eficiente nas análises comparativas entre estes produtos (KIELBASSA et al., 1999; MORON, 2011).

Desta forma, analisar os diferentes protocolos de indução de lesões incipientes de cárie seria interessante para analisar esta interação com o agente físico-mecânico do infiltrante.

Adicionalmente, o uso de infiltrante resinoso, tal qual o uso de agentes fluoretados deve ser utilizado simultaneamente ao controle dos fatores etiológicos da cárie. Um ambiente em constante desafio ácido ainda é esperado, despertando assim a atenção na resistência dos tratamentos oferecidos diante deste desafio (TORRES et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do infiltrante de cárie (Icon®) sobre lesões cariosas artificiais produzidas por diferentes protocolos, e a eficiência deste tratamento após novo desafio ácido por modelos experimentais *in vitro* e *in situ*, utilizando a microdureza de superfície e longitudinal.

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença cárie: desenvolvimento e lesões incipientes

A cárie é uma doença infecciosa multifatorial que necessita de um hospedeiro suscetível, uma flora microbiana cariogênica e uma dieta rica em carboidratos para progredir (KEYES, 1958; NEWBRUN, 1982; HOLLOWAY et al., 1983; MOUNT; NGO, 2000; FEATHERSTONE, 2008).

A partir deste conceito é que estratégias populacionais eficazes foram adotadas permitindo a significativa redução de sua prevalência nos mais diversos países e faixas etárias, tanto no aspecto curativo quanto preventivo (MASSLER; LUDWICK; SCHOUR, 1952; DUBEY; LEHNHOFF; RADIKE, 1965; ISMAIL; BURT; BRUNELLE, 1987; LEROUX et al., 1996; BARDAL et al, 2005; RAMIRES; BUZALAF, 2007). Medidas de controle simultâneo dos fatores etiológicos e abordagens específicas localizadas têm sido a base do controle desta doença e suas consequências (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; OGAARD; SEPPA; ROLLA, 1994; MARINHO et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2007; KUGEL; ARSENAULT; PAPAS, 2009; MARTIGNON et al., 2012) .

Fatores necessários e determinantes para a manifestação da doença são: a presença de biofilme aderido à superfície dentária e açúcares na dieta (CURY; TENUTA, 2009). As bactérias contidas no biofilme estão metabolicamente ativas todo o tempo, degradando carboidratos fermentáveis e gerando ácidos orgânicos (ácidos acético e lático, principalmente), que são responsáveis pelas alterações constantes no pH oral (KIDD, 2011). Estes ácidos são capazes de penetrar na subsuperfície do dente, desmineralizando os tecidos conforme se difundem, causando a destruição localizada dos tecidos dentários duros (FEATHERSTONE, 1996).

O ambiente oral passa pelo processo de desmineralização-remineralização (DES-RE) constantemente em condição considerada balanceada. O metabolismo bacteriano presente na cavidade oral produz ácidos na presença de açúcar, que consequentemente provocam uma redução do pH no ambiente oral. Quando essa

---

situação se torna constante, há um desequilíbrio no processo DES-RE, de forma que a DES é intensificada (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1986; FEJERSKOV; KIDD, 2005). Enquanto o equilíbrio for mantido não haverá perda nem ganho significativo de minerais, porém quando ocorre o desequilíbrio onde a DES é maior do que a RE, ocorre a perda de substância no esmalte e haverá então uma manifestação clínica (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; BUZALAF et al., 2011; KIDD, 2011; FERREIRA ZANDONÁ et al., 2012).

As lesões localizadas nos tecidos mineralizados são consideradas sinais da doença, os quais podem ser distribuídos em uma escala que se comporta desde perdas incipientes em nível ultra-estrutural, até a destruição total do dente (CLARK; FINTZ; TAYLOR, 1974; FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A primeira manifestação clínica da doença cárie é conhecida como mancha branca, que se caracteriza pela superfície externa aparentemente intacta, porém a subsuperfície apresenta-se desmineralizada (TASHIMA, 2006). Esta lesão se inicia por uma pequena desmineralização superficial, mas com a continuidade deste processo, os ácidos atingem a camada subsuperficial, mantendo uma camada superficial “pseudo-intacta”. Esta camada superficial mais mineralizada ocorre pela deposição de fluoretos e de minerais da própria estrutura dentária (THEUNS et al., 1984; FEJERSKOV; KIDD, 2005). Do ponto de vista clínico, um pequeno aumento da porosidade do esmalte conduz a uma mudança nas propriedades ópticas de tal forma que a luz é dissipada. Com o aumento da porosidade do tecido, de forma gradual o esmalte torna-se menos translúcido, pois os poros formados na estrutura do esmalte são preenchidos por ar ou água, cujos índices de refração são diferentes da apatita, o que clinicamente pode ser observado como alterações esbranquiçadas (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).

A lesão de mancha branca pode se apresentar de forma ativa ou inativa. Quando está ativa, a superfície do esmalte se apresenta áspera e opaca, e quando está inativa esta superfície apresenta-se lisa e brilhante (ZERO, 1999).

A compreensão dos aspectos histológicos da lesão de cárie e sua associação com os sinais clínicos de mancha branca, permitiram entender que se tratava da

---

mesma manifestação da doença, em estágios distintos de progressão (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Com relação a estes aspectos histológicos, o esmalte é um tecido dentário altamente mineralizado e ordenado, composto de 97% em peso de substâncias minerais, 3% de água e alguns traços proteicos, sendo apontado até recentemente como um tecido formado prioritariamente por cristais de hidroxiapatita, os quais se reúnem para formar prismas de formato hexagonal, interligados por um líquido interprismático (MINE et al., 2010). Estudos mais avançados descreveram esta estrutura de forma mais detalhada e sua organização estrutural apresenta-se divididas em 7 níveis da seguinte forma: o nível 1 é formado pelos cristais de hidroxiapatita, que formam as nanofibrilas (nível 2), que se alinham em fibrilas (nível 3), que estão agrupadas formando as fibras (nível 4). O nível 5 é constituído pelos primas e espaços interprismáticos, e estes prismas se arranjam em bandas (nível 6), que estão direcionadas na camada de esmalte (nível 7) (CUI; GE, 2007).

O mecanismo de desmineralização se dá pela ação dos íons hidrogênio que são liberados pelos ácidos (produto do metabolismo bacteriano) que irão se ligar aos íons cálcio ou fosfato presentes na estrutura dentária (LARSEN, 1991; BARBOUR et al., 2005). Assim, a hidroxiapatita é perdida, levando a um desarranjo molecular e desorganização da estrutura prismática do esmalte, descrita anteriormente (SILVERSTONE, 1970; MORENO; ZAHRADNIK, 1979).

Devido à porosidade, uma lesão de mancha branca pode se tornar cavitada se sofrer desafios ácidos constantes, mas evidências também indicaram que a progressão desta lesão pode ser controlada (KIDD, 2011; FERREIRA ZANDONÁ et al., 2012). Por isso torna-se tão importante a intervenção precoce ainda nesta fase da doença, com o intuito de paralisá-la, reduzindo assim o risco de cavitação e consequentes intervenções mais agressivas.

2.2 Modelos artificiais para indução de lesões de mancha branca

As lesões de mancha branca representam uma manifestação inicial da lesão de cárie e, dependendo dos cuidados a partir do diagnóstico, este processo pode ser controlado, evitando sua evolução até a cavitação (KIDD, 2011; FERREIRA ZANDONÁ et al., 2012). Todos os aspectos em torno das características destas lesões devem ser estudados para que se tome decisões a respeito das estratégias de prevenção e tratamento precoce. Para isso, muitos estudos, tanto laboratoriais quanto clínicos têm sido realizados.

Apesar da importância dos ensaios clínicos controlados, metodologias *in vitro*, que simulam as lesões de cárie artificial são muito empregadas nos estudos na área da Cariologia (VIEIRA et al, 2005; MAGALHÃES et al., 2007; SPIGUEL et al., 2009; LYNCH et al., 2011). Avanços no entendimento das particularidades de cada fator envolvido nesta doença têm sido especialmente compreendidos com base nesses estudos pelas vantagens de possuírem maior controle do experimento, menor variabilidade menor tamanho de amostra, padronização, rapidez, facilidade e reprodutibilidade (WHITE, 1995; REDHER NETO et al., 2009).

Existem diversos modelos experimentais descritos na literatura que são utilizados para indução de lesões de cárie *in vitro* e estes foram reproduzidos em busca de uma lesão de cárie inicial da forma mais próxima possível daquela que encontramos *in vivo* (FEATHERSTONE, 1996). Para tal, espécimes de tecido dentário duro são geralmente expostos a soluções ou géis desmineralizantes, simulando as condições do fluido do biofilme dentário e, conseqüentemente, permitindo a formação de lesão de cárie inicial (KIELBASSA et al., 2005; LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; QUEIROZ et al., 2008).

Alguns fatores devem ser considerados nos diferentes protocolos de indução de cárie artificial como grau inicial de saturação de minerais, concentração de fluoreto, pH, tipo de ácido e viscosidade dos agentes desmineralizantes, que interagem uns com os outros, dificultando o estabelecimento de um modelo ideal (BUZALAF et al., 2010). Estes fatores podem resultar em diferenças consideráveis nas características físicas e mecânicas do tecido dentário desmineralizado, como a

---

distribuição mineral (ARENDS; DIJKMAN; CHRISTOFFERSEN, 1987), composição química (LYNCH; TEN CATE, 2006) e dureza (MAGALHÃES et al., 2009).

As lesões iniciais se apresentam como lesões de subsuperfície e, microscopicamente, elas podem ser divididas em quatro zonas: a camada superficial mais mineralizada; a zona translúcida, com perda mineral em torno de 1%; zona escura, na qual se encontra cerca de 5% de perda mineral; e o corpo da lesão, com grande quantidade de dissolução mineral, podendo-se chegar a uma perda de 50% ou mais (ROBINSON, 2009). Esta camada superficial mais mineralizada existe porque durante os episódios de flutuações de pH, a saliva atua proporcionando tamponamento do meio, além de fornecer íons cálcio e fosfato que participam do processo de remineralização (BUZALAF et al., 2011). Além disso, a formação desta camada ocorre pela deposição de fluoretos oriundos de fontes externas. Na presença de fluoreto, o pH crítico para a dissolução de minerais à base de apatita é reduzido. Desta forma, a perda mineral é minimizada e favorece uma reposição desses íons, que acontece principalmente na superfície, que é a área de contato com a saliva (ØGAARD et al, 2001; BUZALAF et al, 2011).

Diferentes protocolos de indução de cárie artificial implicam nas distintas características das lesões e também nas suas respostas ao tratamento remineralizante subsequente, pois diferentes camadas superficiais, porosidades e profundidades das lesões poderão alterar a difusão mineral (BUZALAF et al., 2010). Na literatura, é descrito que lesões mais porosas são mais facilmente remineralizadas (SCHÄFER; RAVEN; PARR, 1992), lesões rasas têm uma distribuição mineral mais próxima das lesões *in vivo* e lesões mais profundas são mais indicadas para se analisar a eficiência de abordagens remineralizantes (TEN CATE et al., 2008). Sendo assim, uma comparação entre diferentes protocolos de indução de lesões artificiais se torna importante para se analisar o efeito de um tratamento de paralisação de lesões cáries incipientes (LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007).

A literatura é ampla e variada com relação a diferentes protocolos de indução de lesões cáries artificiais. Estes modelos podem ser do tipo químico, sendo subdividido em estático (onde é feita a imersão do substrato em soluções ou géis desmineralizantes) (MAGALHÃES et al., 2009; TORRES et al., 2011) ou dinâmico

---

(onde passam por ciclos de desmineralização e remineralização) (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003; VIEIRA et al., 2005). Há ainda os modelos microbiológicos, que expõem o substrato a microrganismos cariogênicos (GILMOUR; EDMUNDS; DUMME, 1990; HAVATI et al., 2011). Todos os modelos apresentam suas vantagens e limitações (COSTA, 2011).

De forma geral, as soluções desmineralizantes são produzidas de modo a tentar simular a dinâmica do fluido do biofilme durante um desafio cariogênico. Para a produção destas soluções, são utilizados ácidos em concentrações entre 0,05 e 0,1M, ajustadas em um pH próximo de 5 (MORON, 2011). O tipo e a concentração do ácido irão determinar a taxa de desmineralização e a característica da lesão que será formada (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; MORON, 2011). Sais de cálcio, fosfato e fluoreto são frequentemente adicionados também a essas soluções para diminuir o seu grau de insaturação termodinâmica, evitando assim uma desmineralização superficial, similar àquela encontrada nos casos de erosão dentária (FEJERSKOV; KIDD, 2005; MORON, 2011).

O protocolo de indução de cáries artificiais chamado DES-RE, através da ciclagem de pH é um modelo dinâmico e é dos mais utilizados, pois simula a condição de perda e ganho de minerais, presente na cavidade oral (FEATHERSTONE et al., 1998; KLEIN et al., 2005). Este modelo baseia-se em submeter a amostra a soluções desmineralizantes e remineralizantes alternadamente, simulando o que ocorre *in vivo*: os períodos em que a cavidade oral se submete aos desafios ácidos, durante a alimentação (DES), e nos períodos de reparo, que são proporcionados pela saliva (RE). A composição das soluções e o período de ciclagem variam de acordo com o desafio que cada um se propõe a desenvolver no estudo (THEUNS et al., 1985; VIEIRA et al., 2005; QUEIROZ et al., 2008). Vieira et al. 2005 e Queiroz et al. 2008, por exemplo, investigaram protocolos dinâmicos considerando distintas particularidades de fatores que pudessem influenciar. No primeiro estudo, os autores variam tempo de permanência da solução, quantidade de flúor, pH e outros fatores, considerando 3 diferentes protocolos, enfatizando o efeito do flúor na dinâmica da indução de lesão de cárie. Queiroz et al. em 2008 testaram outros 2 protocolos, também objetivando essencialmente a avaliação do papel do flúor por meio de dentifrícios com baixa concentração de flúor. Mais trabalhos similares demonstram que a diversidade de

---

protocolos dinâmicos são importantes e sua escolha estará na dependência dos fatores analisados.

Os modelos estáticos têm sido muito utilizados pela sua facilidade técnica, não sendo necessária a ciclagem em diferentes soluções (COMAR et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014; GELANI et al., 2014). Existem os mais variados protocolos para os modelos estáticos, variando os sais, concentrações, saturações de minerais, tipo de ácido e viscosidade dos materiais. Todos esses fatores podem resultar em diferenças nas características das lesões formadas (ARENDS; DIJKMAN; CHRISTOFFERSEN, 1987; LYNCH; TEN CATE, 2006; MAGALHÃES et al., 2009).

A solução MHDP é uma solução a base de de ácido láctico 0,05M, com metilenodifosfanato, cálcio e fosfato, com pH 5,0 e que deve permanecer por 6 dias em contato com os espécimes. Foi inicialmente desenvolvida por Buskes, Christoffersen e Arends, que também estudaram as características desta solução e sua desmineralização sobre o esmalte e dentina (ARENDS et al., 1992).

O protocolo do gel MC é formado pelo gel de metilcelulose 8%, sobre o qual se adiciona ácido láctico 0,1M, pH 4,6, permanecendo por 14 dias. Este protocolo foi inicialmente proposto por Ten Cate et al. (1996), que também estudaram as característica das lesões produzidas com este protocolo (LYNCH, TEN CATE, 2006). Vale ressaltar que para o protocolo com o gel MC não se faz necessária a adição dos sais de cálcio e fosfato conforme apontado anteriormente sobre a composição das soluções desmineralizantes. Isso acontece porque o gel é mais denso, reduzindo assim a velocidade de difusão do ácido, e mantendo os íons que foram perdidos pelo dente ainda próximos à superfície, permitindo uma precipitação superficial e produzindo, assim, a lesão de subsuperfície (DAMATO; STRANG; STEPHEN, 1988; MORON, 2011).

Estes dois modelos estáticos têm sido utilizados com êxito na relação reprodutibilidade de lesões de cárie e exequibilidade, demonstrando particularidades como a de que a solução MHDP produziu lesões com maior perda mineral na subsuperfície e profundidade do que o gel MC e a ciclagem de pH (MAGALHÃES et al., 2009; MORON, 2011).

Apesar das vantagens dos métodos *in vitro* para indução de lesões cariosas, estes ainda apresentam limitações, por não conseguirem simular completamente o processo biológico complexo que ocorre *in vivo* para a formação da lesão de cárie. Já os desafios *in situ* estão posicionados entre as condições laboratoriais e os trabalhos clínicos. Estes também são muito utilizados e produzem lesões semelhantes às encontradas no processo natural de formação da lesão de cárie e constituem uma excelente alternativa para estudos em Cariologia (FEATHERSTONE, 1992; TEN CATE, 1994; ZERO, 1995).

A maior vantagem dos modelos *in situ* é que este simula melhor a condição *in vivo* do que os modelos laboratoriais. Por ser realizado no ambiente oral, garante a presença da saliva e desenvolvimento da película adquirida e do biofilme, que são essenciais para o desenvolvimento de uma lesão natural (TEN CATE, 1994; ZERO, 1995).

O modelo *in situ* é desenvolvido através da utilização de espécimes que são mantidos em ambiente oral por meio de dispositivos intra-bucais, sendo submetidos a um desafio cariogênico através de um protocolo de aplicação de solução de sacarose com uma frequência pré-estabelecida (TEN CATE, 1994; ZERO, 1995; PARIS; MEYER-LUECKEL, 2010; WANG et al., 2010).

Outras vantagens dos modelos *in situ* são: apesar de ser realizado no ambiente oral, em contraste com os modelos laboratoriais, não apresentam todas as variações pessoais encontradas no ambiente dos ensaios clínicos (como hábitos alimentares e de higiene oral); facilidade de controle de variáveis experimentais e flexibilidade no desenho experimental, que não é encontrada nos estudos clínicos; apresenta um tempo mais curto e um custo menor, quando comparado aos estudos *in vivo* (ZERO, 1995).

Vários trabalhos que produzem modelos artificiais para indução de lesões cariosas utilizam diferentes tipos de protocolo, sem preocupação quanto ao tipo de lesão produzida com relação ao efeito do agente preventivo que será testado subsequentemente em cada trabalho. Este mostra-se ser um ponto importante já que tem sido mostrado que o tipo de lesão pode sim influenciar na resposta ao tratamento (LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007).

2.3 Emprego da análise de dureza em lesões artificiais de cárie

Existem muitas técnicas utilizadas para mensurar as alterações que ocorrem nos tecidos dentários após a formação de uma lesão cáriosa e sua remineralização, tais como: microscopia eletrônica de varredura (HICKS; FLAITS; SILVERSTONE, 1986), microscopia de luz polarizada (TASHIMA, 2006; COSTA, 2011), microradiografia (MAGALHÃES et al., 2009), microscopia confocal a laser (ARAÚJO et al., 2014), espectroscopia raman (OLIVEIRA, 2011), tomografia de coerência óptica (OLIVEIRA, 2011) e testes de microdureza (MORON et al., 2013).

O teste de microdureza é feito através da penetração de uma ponta de diamante piramidal (penetrador Knoop) na amostra. É um método muito empregado por ser rápido, confiável e sensível. Ainda como vantagem, o penetrador Knoop produz indentações rasas, estreitas e bem definidas, reduzindo fraturas no substrato analisado, sendo um método não-destrutivo. Antigamente, se afirmava que o comprimento das indentações produzidas possibilitariam uma relação com o conteúdo mineral do esmalte, demonstrando que a perda mineral levava a uma diminuição da dureza (FEAGIN; KOULOURIDES; PIGMAN, 1969; ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1979). Atualmente, sabe-se que este método não estima com segurança a quantidade mineral, mas continua sendo utilizado para analisar lesões cárias, pois ele oferece uma grande evidência sobre as propriedades mecânicas e integridade estrutural do esmalte (KIELBASSA et al., 1999; BUCHALLA et al., 2008). Ainda é um método bastante utilizado para os estudos na área de Cariologia, para mensurar a desmineralização/remineralização por diferentes protocolos e tratamentos (KIELBASSA et al., 1999; MAGALHÃES et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009; TORRES et al., 2012; PARIS et al., 2013a). Mas se os dados de conteúdo mineral são imprescindíveis para os resultados, a metodologia de escolha recomendada seria a microradiografia (BUCHALLA et al., 2008).

A microdureza de superfície isoladamente foi muito utilizada para quantificar lesões cárias *in vitro* (MAGALHÃES et al., 2008), pois se relatava que o comprimento das indentações realizadas na superfície pelo teste refletia no grau de desmineralização das lesões (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1979), conteúdo mineral da camada superficial, assim como profundidade da lesão

---

(ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980). Atualmente essa questão é controversa. Embora muitos trabalhos ainda utilizem a microdureza de superfície do esmalte para o estudo do desenvolvimento de cárie (TORRES et al., 2012), esta metodologia isoladamente é considerada pouco precisa, uma vez que as lesões cariosas se formam na subsuperfície, sob uma camada superficial mais mineralizada (MAGALHÃES et al., 2009).

Devido a esta limitação, é importante que o teste de microdureza seja feito também em cortes longitudinais, para que se realize uma avaliação mais detalhada das lesões subsuperficiais. Assim, a avaliação da microdureza longitudinal pode ser utilizada, pois oferece maiores informações sobre as propriedades mecânicas das lesões, de caráter subsuperficial (MAGALHÃES et al., 2009).

2.4 Tratamento de lesões de mancha branca

A Odontologia minimamente invasiva tem modificado a forma com que os profissionais deveriam compreender e tratar as lesões nos tecidos duros originados pela doença cárie. Se a abordagem clínica para as lesões cavitadas eram as restaurações com os mais diversos materiais restauradores diretos ou indiretos, o conhecimento disponível permite viabilizar estratégias mais condizentes com as lesões incipientes, incluindo as manifestações não cavitadas (MOUNT; NGO, 2000; KIDD, 2011; RAO; MALHOTRA, 2011).

O tratamento das lesões incipientes começa desde o controle dos fatores etiológicos que estão relacionados no aparecimento da doença cárie, envolvendo controle de placa e dieta (KIDD, 2011). Quando um tratamento operatório é requerido, atualmente se segue os preceitos da Odontologia Minimamente Invasiva. A intervenção mínima concentra-se nas opções de tratamento menos invasivos possíveis a fim de minimizar a perda de tecido e desconforto do paciente. Assim, elege-se principalmente a prevenção e a intervenção precoce da lesão de cárie, sendo o princípio primordial a remineralização de lesões iniciais, defendendo uma abordagem biológica ou terapêutica ao invés da abordagem cirúrgica tradicional para lesões superficiais iniciais (RAO; MALHOTRA, 2011). A remineralização é o

---

primeiro passo para tratar as lesões, uma vez que estas são decorrentes de um desequilíbrio de íons no processo DES-RE (MOUNT; NGO, 2000).

Nem todas as lesões são passíveis de remineralizar apenas pela remoção dos fatores etiológicos. Nesse estágio, as principais técnicas envolvem o uso de um agente que favoreça a remineralização e iniba a desmineralização, sendo o fluoreto o principal agente utilizado nas mais diversas formas (KIDD, 2011; LYNCH et al., 2011). Esta abordagem ainda é apontada, baseada em evidências clínicas, como a melhor forma de prevenção e tratamento de lesões de manchas brancas (BERGSTRAND; TWETMAN, 2011).

Independente da forma de apresentação, a base da ação do flúor 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. Nesse contexto, a hidroxiapatita é dissolvida na sub-superfície enquanto a fluorhidroxiapatita forma uma camada superficial mais resistente. Com o tempo, a formação de fluorhidroxiapatita durante esse processo cria uma camada protetora que retarda a difusão de agentes desmineralizantes através da estrutura dentária (TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991; ROBINSON, 2009; BUZALAF et al., 2011).

Quando fornecido ao meio oral em altas concentrações (aplicações tópicas), o fluoreto se adsorve na superfície do esmalte sob a forma de fluoreto de cálcio (CaF_2), atuando como um reservatório de íons cálcio e fluoreto. Em situações de queda do pH, esse composto se dissocia liberando os íons. O fluoreto liberado se adsorve na superfície dos cristais, atraindo íons cálcio para a formação de um novo composto, semelhante a fluorapatita, que exclui o carbonato de sua composição. A incorporação do fluoreto, menos solúvel, torna o esmalte mais resistente a futuros desafios ácidos (TEN CATE, 1997; MARINHO et al., 2003; BUZALAF et al., 2011).

A presença contínua e disponível de baixos níveis de íons fluoreto no ambiente bucal ajuda a prevenir lesões de cárie e promover a remineralização do esmalte desmineralizado pelos ácidos produzidos por bactérias cariogênicas (PESSAN et al., 2008; SUYAMA et al., 2011).

O flúor se apresenta associado a diferentes sais, como o fluoreto de sódio (NaF) (SEPPA, 1988), fluoreto estanhoso (SnF₂) (SCHLUETER; KLIMEK; GANSS, 2009) e os tetrafluoretos de titânio (TiF₄) (MAGALHÃES et al., 2008). Com relação à forma de apresentação, pode ser encontrado na forma de soluções, géis, mousses e vernizes (LEE et al., 2010). Os vernizes apresentam a vantagem de prolongar o tempo de contato entre o agente fluoretado e a superfície dentária, aumentando a incorporação de fluoreto na superfície (CLARK, 1982). Outra vantagem do verniz é sua segurança em relação à toxicidade, pois é utilizado em pequenas quantidades, sendo menos absorvido no trato gastrointestinal (OLYMPIO et al., 2009).

Estratégias para otimizar a atividade positiva do flúor no processo de remineralização têm sido estudadas e uma destas se baseia na realização de tratamentos no esmalte previamente à aplicação do agente fluoretado. Esta ideia 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 o esmalte. A partir daí, outros autores passaram a estudar a influência de tratamentos do esmalte com objetivo de melhorar a retenção do flúor. A associação do flúor com compostos metálicos tem demonstrado bons resultados na remineralização da estrutura dentária e na proteção do esmalte contra os desafios cariogênicos (NAVARRO et al., 1985; COMAR et al., 2012).

Existem outras estratégias preventivas e terapêuticas investigadas em diversas ocasiões, que podem contribuir para a manutenção da estabilidade do biofilme oral, com diferentes mecanismos durante desafios ácidos presentes neste ambiente, como: goma arábica (ONISHI et al., 2008), produtos contendo CPP-ACP (KUGEL; ARSENAULT; PAPAS, 2009; BERGSTRANT; TWETMAN, 2011; RAO; MALHOTRA, 2011), xilitol (KUGEL; ARSENAULT; PAPAS, 2009; RAO; MALHOTRA, 2011), a associação de fluoretos com zinco (LYNCH et al., 2011) e nanocristais de hidroxiapatita (RAO; MALHOTRA, 2011).

2.5 Infiltrante de cárie

Todas as abordagens apresentadas até o presente momento foram baseadas em mecanismo químico para remineralização das lesões cariosas. A proposta de uma estratégia baseada em agente mecânico foi retomada com potencial de sucesso para evitar a progressão de lesões iniciais em esmalte ainda não cavitadas (PHARK et al., 2009; PARIS; MEYER-LUECKEL, 2010; MEYER-LUECKEL et al., 2011; PARIS et al., 2011).

A ideia é a utilização de um agente resinoso com alto poder de penetração que irá infiltrar o tecido dentário com o objetivo de preencher os poros do esmalte afetado pela lesão cariosa, impedindo assim a sua progressão. Esta ideia do uso de um infiltrante em lesões cariosas não é recente, uma vez que outros trabalhos já demonstravam este tipo de manobra (DAYILA et al., 1975; ROBINSON et al., 1976), tentando utilizar materiais resinosos para penetrar as lesões iniciais e reduzir a passagem dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano. Entretanto, a modificação química do agente infiltrante para um componente resinoso a base de TEGDMA, permitiu características de molhabilidade e de penetração deste agente até os poros mais internos (PARIS; HOPFENMULLER; MEYER-LUECKEL, 2010; MEYER-LUECKEL et al., 2011; PARIS et al., 2011).

Este novo produto, conhecido comercialmente como Icon®, tem sido objeto de estudo de vários trabalhos *in vitro* (BELLI et al., 2011; MEYER-LUECKEL et al., 2011; PARIS et al., 2011; TORRES et al., 2011; TORRES et al., 2012), *in situ* (PARIS; MEYER-LUECKEL, 2010) e até ensaios clínicos (EKSTRAND; BAKHSHANDEH; MARTIGNON, 2010; PARIS; HOPFENMULLER; MEYER-LUECKEL, 2010; MARTIGNON et al., 2012).

O surgimento do infiltrante de cárie aconteceu de forma evolutiva, por meio de vários estudos de um grupo de pesquisadores da Alemanha. A ideia de utilizar materiais resinosos para penetrar em lesões de mancha branca já era antiga (DAYILA et al., 1975; ROBINSON et al., 1976) e apresentava boas perspectivas, mas por características inerentes aos materiais testados, essa técnica não obteve o êxito esperado.

Este grupo de pesquisa retomou os estudos acerca deste tipo de material em meados dos anos 2000. Sabendo que a característica primordial para este tipo de material seria a permeabilidade na estrutura dentária, Paris et al. (2007) avaliaram o coeficiente de penetração de 6 materiais disponíveis no mercado (adesivos e selante) e mais 66 materiais experimentais. Para estabelecer este coeficiente, os materiais foram avaliados quanto às suas viscosidades, tensão superficial e ângulo de contato. Os materiais experimentais mostraram coeficiente de penetração mais alto do que os materiais disponíveis no mercado. Os maiores coeficientes de penetração foram encontrados em misturas contendo TEGDMA, HEMA e 20% de etanol.

O tempo de aplicação do material sobre a superfície dentária também demonstrou ter influência na penetração deste e por isso também foi objeto de estudo deste grupo (MEYER-LUECKEL et al., 2006; MEYER-LUECKEL et al., 2011; PARIS et al., 2012).

Conforme descrito anteriormente, as lesões de mancha branca apresentam a superfície externa mais mineralizada (THEUNS et al., 1984; FEJERSKOV; KIDD, 2005) e essa superfície poderia atrapalhar a difusão do material resinoso para a área subsuperficial. Assim, alguns estudos foram realizados com o objetivo de encontrar um material ideal para remover essa camada superficial (MEYER-LUECKEL; PARIS; KIELBASSA, 2007; PARIS; MEYER-LUECKEL KIELBASSA, 2007). Meyer-Lueckel, Paris e Kielbassa (2007) avaliaram a eficácia de 3 diferentes tipos de condicionamento ácido (ácido fosfórico a 37% e ácido clorídrico a 5 ou 15%, em variados tempos de atuação) para remover essa camada mais superficial em dentes humanos com lesões de mancha branca naturais. O protocolo que se apresentou mais efetivo para a redução da camada mais mineralizada foi o condicionamento com o ácido clorídrico a 15% por 90 a 120 segundos.

O tratamento prévio à aplicação do infiltrante também foi avaliado. Nenhum tipo de tratamento, secagem com jato de ar ou a aplicação de solventes (acetona ou etanol) foram avaliados em pré-molares humanos com lesões de mancha branca naturais. A aplicação de solventes, seguida de jato de ar, mostrou ser o tratamento adequado para receber o infiltrante, pois os poros bem secos do esmalte auxiliam na penetração do material (PARIS et al., 2013b).

Depois de vários estudos acerca de todos os pontos mencionados anteriormente, o material foi introduzido no mercado em 2009. O sistema Icon é composto por 3 passos, onde cada um desempenha sua função: o gel ácido (Icon Etch) é utilizado previamente com o objetivo de remover a camada superficial de esmalte, permitindo que os poros afetados sejam expostos; o etanol (Icon Dry) é um solvente utilizado para remover a água que está acumulada no interior das porosidades da lesão; após este tratamento prévio, é aplicado então o Icon Infiltrant, que é a resina fluida em si que irá preencher os poros da lesão, composta basicamente do monômero TEGDMA.

Apesar de vir apresentando bons resultados, já existem trabalhos propondo alterações na composição do infiltrante. As alterações têm sido relacionadas com a adição de etanol ou acetona como solventes no próprio material, o que poderia aumentar o coeficiente de penetração, e a adição do monômero Bis-GMA ao TEGDMA já encontrado no produto comercial, o que permitiria reduzir a contração de polimerização e aumentar a resistência do produto (PARIS et al, 2007;. PARIS et al, 2013a;. ARAÚJO et al, 2014). No entanto, nenhuma das modificações propostas até então apresentou melhores resultados do que o infiltrante disponível comercialmente e este continua sendo o único produto no mercado com esta função específica. Seu uso tem sido cada dia mais difundido, abrangendo inclusive tratamentos que seriam inicialmente contra-indicados para o seu uso, como o de lesões de erosão (OLIVEIRA et al., 2015) e de lesões de cárie de cicatrículas e fissuras (PARIS et al., 2014; LAUSCH et al., 2015)

Os trabalhos que utilizaram este produto, isolado ou em associação com outros agentes remineralizadores, têm demonstrado sucesso para se limitar a lesão de cárie em esmalte (PARIS; HOPFENMULLER; MEYER-LUECKEL, 2010; MEYER-LUECKEL et al., 2011). Além da propriedade de paralisar a lesão, a vantagem estética do produto também é apontada, uma vez que ele preenche os poros do esmalte, fazendo com que o índice de refração daquela área volte a se assemelhar com o esmalte hígido, mascarando as lesões de mancha branca (KIM et al., 2011; TORRES et al., 2011).

No entanto, não existem trabalhos avaliando o efeito do infiltrante em lesões induzidas por diferentes modelos de cárie artificial. Sabendo-se que as

---

características da lesão pode afetar o tratamento subsequente, este seria um ponto importante a ser estudado.

Além disso, poucos trabalhos realizaram um desafio ácido posteriormente à aplicação do infiltrante para se averiguar a resistência deste tipo de tratamento. Este é mais um ponto importante a ser avaliado, uma vez que os fatores que levam ao desenvolvimento da doença ainda podem persistir no ambiente oral, reconduzindo a estrutura dentária remanescente à instalação de novas lesões (TORRES et al., 2011; TORRES et al., 2012; PARIS et al., 2013a). Por estas razões, julgou-se importante a realização desta investigação.

3 PROPOSIÇÃO

---

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca ativas de cárie promovidas por modelo experimental *in vitro* e *in situ*.

As hipóteses nulas testadas foram:

1. O infiltrante resinoso Icon® não promove diferente eficiência no tratamento de lesões artificiais de cárie produzidas com distintos protocolos;
2. O infiltrante resinoso Icon® não conferirá aumento de resistência ao substrato dentário frente a novo desafio ácido.

4 MATERIAL E MÉTODOS

---

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Etapas de estudo

O presente estudo foi desenvolvido em 2 etapas: *in vitro* (Etapa A) e *in situ* (Etapa B). Etapa A: o fator em estudo foi o efeito do infiltrante sobre esmalte bovino desmineralizado por indução sob três modelos de cárie artificial produzidos *in vitro*. A seguir, foi avaliada a resposta deste tratamento frente a um novo desafio ácido, para se avaliar a eficiência do tratamento realizado. Etapa B: foi realizado um desafio cariogênico *in situ*, cujo os espécimes foram subsequentemente tratados com infiltrante. Em seguida, um novo desafio ácido *in situ* foi realizado para se avaliar a eficiência do infiltrante a esta condição. Para as etapas A e B, as variáveis de resposta foram análises de microdureza de superfície e longitudinal, considerando sempre a diferença entre cada condição com a inicial, sem desafio e sem tratamento.

4.2 Seleção e preparo dos blocos de dentes bovinos (Etapas A e B)

Para o estudo proposto, foram utilizados 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 apresentavam 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 cera pegajosa em bastão aquecida (Asfer, São Caetano do Sul, SP, Brasil) em um dispositivo metálico acoplado a uma máquina de corte de precisão (Isomet Low Speed Saw - Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Dois

---

discos diamantados dupla face Extec Dia, Wafer blade 5"x. 015x1/2 (Extec Corp, Enfield, CT, EUA), intercalados dois espaçadores de Aço inoxidável (7 cm de diâmetro e orifício central de 1,3 cm, sendo um com 4 mm de espessura e outro com 2 mm de espessura), foram utilizados para a realização dos cortes longitudinais no sentido vestibulo-lingual. Os primeiros cortes foram no sentido cervico-incisal (Figura 1). Após a realização deste corte, o espaçador de 2 mm de espessura foi removido, o dispositivo foi reposicionado transversalmente à direção anterior e o dente foi novamente submetido ao corte, agora no sentido mesio-distal. Ao final, foi obtido um fragmento de esmalte/dentina bovino retangular de 6mm X 4mm da porção mais plana da coroa.

Figura 1: Cortes sendo feitos com os dois discos e o uso de espaçadores.

Todos os cortes foram feitos com velocidade média de 300 rpm e sob refrigeração constante com água deionizada. Estes fragmentos foram armazenados em recipientes plásticos e recobertos por gaze embebida em água deionizada sob refrigeração.

4.3 Polimento do esmalte de dentes bovinos (Etapas A e B)

Inicialmente, foi realizada uma planificação da superfície de dentina, de maneira a obter superfícies de esmalte e dentina paralelas, apresentando uma espessura de aproximadamente 2 mm. 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, sendo então levados à Politriz Metalográfica Aropol 2V (Arotec, Cotia, SP, Brasil) para desgaste. Neste processo, foram utilizadas lixas de carbetto de silício de granulação 320 (Carbimet, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), com peso de 172g sobre os espécimes, durante, em média, 30 segundos sob refrigeração.

Em seguida, 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 sequência: lixa #320, 172g, por 2 minutos em média, em baixa velocidade; lixa #600, 172g, por 2-3 minutos, em baixa velocidade; lixa #1200, 172g, por 2-3 minutos, em alta velocidade. Para finalizar o polimento, foi utilizado um disco de feltro (Extec Corp, Enfield, CT, EUA) com suspensão de diamante de $1\mu\text{m}$ (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), por 2 minutos, peso de 172g, em velocidade alta.

Entre cada polimento e ao final de todo o processo, os corpos-de-provas foram submetidos à limpeza no ultrassom (USC 750 - Unique Group, Indaiatuba, SP, Brasil), em água deionizada durante 2 minutos (Figura 2).

Figura 2: Aparência do espécime pronto, após polimento.

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

Até o momento da análise de microdureza de superfície inicial do esmalte para seleção dos blocos a serem efetivamente utilizados, os fragmentos foram conservados em ambiente úmido em geladeira.

4.4 Análise de microdureza de superfície do esmalte inicial (Etapas A e B)

Para a análise de microdureza inicial das superfícies de esmalte, foi utilizado o Microdurômetro Buehler Micromet 5114 (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com penetrador tipo Knoop (Figura 3), carga estática de 25g com tempo de 10 segundos, acoplado ao Software para análise de imagem Buehler Omni Met (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA).

Figura 3: Ponta Knoop utilizada.

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

4.5 Fase experimental *in vitro* (Etapa A)

Nesta fase, o mesmo espécime de esmalte bovino foi dividido em quatro áreas, cada uma apresentando uma etapa do experimento. As áreas foram avaliadas no final da fase experimental e estão demonstradas no desenho esquemático a seguir para melhor entendimento (Figura 4).

Figura 4: 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, sendo H: controle (esmalte hígido), D: esmalte desmineralizado (pelos diferentes protocolos), I: esmalte desmineralizado e tratado com o Infiltrante, N: esmalte submetido a novo desafio ácido após tratamento com o infiltrante.

4.5.1 Indução de lesão de cárie artificial em esmalte

Para a etapa *in vitro* foram utilizados 45 corpos-de-prova distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n= 15) de acordo com o tipo de protocolo de indução de lesão de cárie artificial (Quadro 1).

Grupo	Solução/Gel	pH/Temperatura	Tempo
DES-RE (ciclagem)	Solução desmineralizante: 2,0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,075 M tampão de acetato, 0,04 ppm NaF; Solução remineralizante: 1,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 150 mM KCl, 0,02 M Tampão tris, 0,05 ppm NaF.	Solução desmineralizante: pH 4,7 / 37°C Solução remineralizante: pH 7,0 / 37°C	7 dias
MC (gel)	Gel de metilcelulose 8%; após 12h foi adicionado 1,5 mL de ácido láctico 0,1M (Sigma) no mesmo conteúdo que o gel.	pH 4,6 / 37°C	14 dias
MHDP (solução)	3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3 mM KH_2PO_4 ; 0,05 M ácido láctico; 6 μM tetraetil metilenodifosfanato-MDHP;; Traços de timol. Ajuste do pH com solução de KOH 10M (30 ml de solução/espécime)	pH 5,0 / 37°C	6 dias

Quadro 1 – Tipos de protocolos utilizados para indução de lesão de cárie artificial

Antes de submeter os espécimes aos protocolos de desmineralização, os espécimes foram lateralmente protegidos com cera, expondo apenas a superfície

vestibular polida. Nesta superfície, cada um recebeu duas camadas de esmalte de unha vermelho ocupando cerca de 1/4 do espécime, denominada superfície controle hígida (H), deixando exposta uma janela de esmalte dentário com a largura de 3/4 do espécime. Essa proteção foi feita para que se conservasse uma parte do espécime hígido, para posterior comparação.

Para o grupo DES-RE, as amostras foram submetidas a ciclagem de pH por 7 dias, conforme descrito em Vieira et al. (2005). Durante 5 dias, as amostras foram imersas em solução desmineralizante por 6 horas e solução remineralizante por 18 horas. Nos últimos 2 dias, as amostras foram mantidas apenas em solução remineralizante.

Para o grupo MC, o gel de metilcelulose 8% foi manipulado em farmácia. O espécime foi colado no fundo de um pote J10 com esmalte de unha e, posteriormente, coberto com uma camada de gel (0,5 cm de altura) que permaneceu sobre o espécime por 12 horas em câmara fria, a 4°C. Passado este tempo, foi adicionado o mesmo conteúdo (1,5 ml) de ácido láctico a 0,1M, pH 4,6 ajustado com KOH 10M, permanecendo sobre o espécime por 14 dias, na estufa a 37°C.

Para o grupo da solução MHDP, foi adicionado ácido láctico a água deionizada, seguido pelos sais de cálcio, fosfato, tetraetil metilenodifosfanato e traços de timol nas concentrações descritas no Quadro 1. O pH foi ajustado a 5,0 pela adição de solução KOH a 10M. Um conteúdo de 30 ml de solução foi despejado em potes plásticos, cada um com um espécime fixado no disco de acrílico no fundo. Os espécimes permaneceram por 6 dias imersos nesta solução, na estufa a 37°C.

Para estes dois grupos, MC e MHDP, a metodologia seguida foi a de Moron (2011). As soluções foram todas confeccionadas no laboratório de Bioquímica da FOB-USP, com exceção do gel de metilcelulose 8%, que foi adquirido em farmácia de manipulação.

Após a confecção, a validação dos protocolos de desmineralização foi realizada em microrradiografia (TMR) através de 9 espécimes (3 de cada grupo) preparados e submetidos à indução de lesões artificiais pelos diferentes protocolos em teste-piloto. A película com as imagens foi analisada utilizando um microscópio de luz transmitida com uma objetiva de 20X (Axioplan; Zeiss, Oberkochen,

---

Alemanha) e uma câmera (XC-77CE, Sony, Tóquio, Japão). O software utilizado foi TMR 1,25E (Inspector Research BV, Amsterdam, Holanda). Todos os protocolos foram capazes de provocar lesões subsuperficiais características de lesão de cárie (Figuras 5, 6 e 7).

Por meio de todos os protocolos, verificou-se uma camada subsuperficial e a presença de uma camada externa pseudo-intacta. Essas observações caracterizam a solução com capacidade de reproduzir lesões de cárie artificialmente.

Figura 5: Imagem representativa em TMR de espécime desmineralizado pelo protocolo de ciclagem DES-RE.

Figura 6: Imagem representativa em TMR de espécime desmineralizado pelo protocolo do gel MC.

Figura 7: Imagem representativa em TMR de espécime desmineralizado pelo protocolo da solução MHDP.

4.5.2 Aplicação do Infiltrante de cárie (Icon®)

Após a realização dos diferentes protocolos de desmineralização, os espécimes receberam o tratamento nas lesões cariosas produzidas artificialmente. O material utilizado foi o sistema de resina infiltrante Icon® (DMG, Hamburgo, Alemanha).

Antes de realizar o tratamento, cada espécime recebeu duas camadas de esmalte de unha vermelho ocupando mais 1/4 do espécime, além da camada aplicada anteriormente (previamente à desmineralização). Esta nova área foi denominada de desmineralizada (D), sendo de um dos três protocolos desmineralizantes propostos. Assim, a nova janela de esmalte dentário que ficou exposta tinha a largura de 2/4 do espécime. Essa proteção foi feita para que se conservasse uma parte do espécime desmineralizado, para posterior comparação.

Após a produção de cáries artificiais por cada protocolo, os blocos de esmalte foram limpos em água corrente e secos com gaze, para então serem tratados com o infiltrante Icon® de acordo com o protocolo do fabricante, apresentado no quadro a seguir:

- Profilaxia com escova Robinson e pasta profilática;
- Lavagem com água;
- Aplicação do Icon Etch (ácido clorídrico a 15%) e espera por 2 minutos;
- Lavagem por 30 segundos e secagem com jatos de ar;
- Aplicação do Icon Dry (etanol 99%) por 30 segundos;
- Secagem com jato de ar;
- Aplicação do Icon Infiltrant por 3 minutos;
- Remoção de excessos com rolete de algodão ou microbrush;
- Fotoativação por 40 segundos;
- Nova aplicação de Icon Infiltrant por 1 minuto;
- Remoção de excessos;
- Fotoativação por 40 segundos;
- Polimento com discos e borrachas abrasivas.

Quadro 2 – Sequência de tratamento com o infiltrante Icon®.

Após finalizada a aplicação do infiltrante de cárie, os espécimes foram mantidos em ambiente úmido em geladeira.

4.5.3 Novo desafio ácido

Antes de submeter os espécimes ao novo desafio ácido, cada um recebeu duas camadas de esmalte de unha vermelho ocupando mais 1/4 do espécime, além das duas camadas já aplicadas anteriormente, agora sobre a área tratada com infiltrante (I). Assim, a janela de esmalte dentário que ficou exposta tinha a largura de 1/4 do espécime. Essa proteção foi feita para que se conservasse uma parte do espécime tratado com o infiltrante, para posterior comparação.

Após a proteção com esmalte, os espécimes de todos os grupos foram então submetidos a um novo desafio ácido, seguindo o protocolo de ciclagem DES-RE, que está descrito no item 4.5.1. Esta área final foi denominada de N (novo desafio).

4.5.4 Análise de microdureza de superfície do esmalte final

A dureza de superfície foi avaliada novamente em todos os espécimes conforme apontado no item 4.4.

Especial atenção se refere ao fato de que foram realizadas leituras de microdureza nas diferentes áreas que foram protegidas com esmalte de unha. Antes das leituras, as proteções com esmalte de unha foram removidas delicadamente e

limpas com acetona. Durante todas as medições, foi feita a comparação das leituras de superfície e longitudinais das seguintes áreas: hígida, desmineralizada, tratada com infiltrante, e após novo desafio ácido (Figura 4). Dessa forma, foi calculada a porcentagem de perda/ganho de dureza de superfície em cada fase.

4.5.5 Análise de microdureza longitudinal do esmalte

Após análise da microdureza de superfície do esmalte, foram feitas secções longitudinais no centro de cada espécime usando o mesmo aparelho de corte de precisão anteriormente citado, com o disco diamantado de dupla face posicionado perpendicularmente à superfície e refrigerado com água deionizada. O corte foi feito de forma que passasse pelas 4 diferentes áreas (hígida, desmineralizada, tratada com infiltrante, e após novo desafio ácido) para que fosse possível a análise e comparação destas. Após o corte, 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 (Figura 8).

Figura 8: Espécimes embutidos em resina acrílica para leituras longitudinais.

A dureza longitudinal foi realizada, para cada uma das 4 áreas de um mesmo espécime, através de duas sequências de sete indentações (25g/10s) a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μm da superfície externa do esmalte. Cada espécime teve então 8 sequências de endentações. As médias de dureza foram calculadas em cada distância, por área.

Alguns espécimes foram perdidos na fase de polimento ou houve a impossibilidade de execução das leituras de microdureza. Sendo assim, houve uma alteração no tamanho da amostra, passando de 15 para 13 espécimes por grupo (n=13).

4.6 Fase experimental *in situ* (Etapa B)

4.6.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

O protocolo de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, juntamente com a carta de informação ao voluntário e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, bem como as instruções a serem seguidas (Anexos). O protocolo teve aprovação pelo CEP em 31/10/2012, sob CAAE número 07182912.7.0000.5417.

4.6.2 Seleção dos voluntários

Foram selecionados 15 voluntários adultos jovens, residentes na cidade de Bauru, a partir de uma anamnese, avaliação de parâmetros salivares e da condição de saúde bucal. Os voluntários foram selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- Fluxo salivar estimulado > 1ml/min;
- Fluxo salivar não estimulado > 0,25ml/min;
- pH salivar > 6;
- Boa saúde bucal;
- Ausência de lesões dentárias cavitadas e doença periodontal.

Os critérios de exclusão foram relacionados com o estado de saúde geral (gestantes, pacientes com doenças sistêmicas e com uso crônico de qualquer tipo de medicação) e de saúde bucal (usuários de aparelhos ortodônticos e produtos com fluoreto e agentes anti-placa, cárie ativos e com doença periodontal).

4.6.3 Confeção dos aparelhos intrabucais palatinos

Os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso e de um aparelho intrabucal palatino em resina acrílica. Em cada aparelho foram criados 2 nichos (um de cada lado) com um espaço de 4 mm de profundidade em cada para posterior fixação de espécimes de dente bovino (n= 30), de forma a acomodar 2 blocos por voluntário.

Os espécimes a serem fixados nos aparelhos foram confeccionados da mesma forma da fase Etapa A (seguindo os itens 4.2 e 4.3) e apresentavam as mesmas características: espécimes retangulares de esmalte/dentina bovino com as dimensões de 6mm X 4mm.

Os espécimes estavam armazenados em solução de timol a 0,1% por 2 semanas e posteriormente, para desinfecção, foram imersos em solução de etanol a 70% por 30 minutos (GANSS et al., 2004). Antes de serem fixados nos aparelhos, foi feita a análise da dureza de superfície inicial para seleção dos espécimes com dureza média de 350 KHN (conforme descrito no item 4.4) e a aplicação de esmalte de unha em ¼ do espécime (área controle hígida).

Os espécimes foram fixados com cera pegajosa nos nichos dos aparelhos, deixando um espaço de 1,0 mm sobre eles. Uma tela plástica plana foi fixada sobre este espaço com auxílio de cera de incrustação para permitir o acúmulo de biofilme na superfície dos espécimes e protegê-lo contra distúrbios mecânicos (WANG et al., 2010) (Figura 9).

Figura 9: Aparelho intrabucal palatino.

4.6.4 Fase experimental

Uma semana antes do início da fase *in situ*, que durou 14 dias, os voluntários receberam dos pesquisadores dentífrico sem fluoreto, escova dentária e fio dental para utilizarem desde então até o final do experimento. Esta padronização de higiene bucal foi realizada para reduzir os vestígios de agente fluoretado presente na cavidade bucal do voluntário que pudesse interferir no experimento.

Os aparelhos foram instalados um dia antes do início da fase experimental, à noite, após a última higiene bucal. Durante toda a fase *in situ*, os voluntários só deveriam remover o aparelho para a realização das refeições diárias e ingestão de água. Nestes momentos, os dispositivos ficaram envolvidos em gaze umedecida por água deionizada. O intervalo entre as refeições deveria ser de pelo menos 2 a 3 horas. Após as refeições, a higiene bucal foi realizada e o aparelho reposicionado na boca.

Oito vezes ao dia, uma solução de sacarose a 20% foi gotejada sobre os espécimes de esmalte por 5 minutos (AIRES et al., 2006). Em seguida, o aparelho foi reposicionado na boca. A solução de sacarose preparada pelos pesquisadores foi trocada em média a cada três dias para evitar crescimento de bactérias e fungos, e os voluntários foram orientados a agitar o recipiente com a solução antes do uso.

Os voluntários foram proibidos de usar produtos fluoretados ou antimicrobianos durante a fase *in situ* e de higienizar o aparelho na área das telas plásticas.

Ao término do experimento, os espécimes foram cuidadosamente removidos do dispositivo e fixados em discos de acrílico com o auxílio de cera pegajosa, e mantidos em ambiente úmido e refrigerado.

4.6.5 Aplicação do Infiltrante de cárie (Icon®)

Após a realização da fase experimental onde foram desenvolvidas cáries artificiais pelo desafio cariogênico *in situ*, os espécimes receberam tratamento com o infiltrante Icon®, conforme já apresentado no item 4.5.2.

4.6.6 Novo desafio ácido

Após o tratamento com o infiltrante, os espécimes foram colocados em novos aparelhos intrabucais palatinos e então submetidos a um novo desafio ácido, seguindo novamente o protocolo *in situ*, que está descrito no item 4.6.4.

Nas mesmas etapas, as proteções com duas camadas de esmalte de unha para proteção da área com as distintas fases de um mesmo espécime, foi procedida para que se realizasse as posteriores leituras de microdureza de superfície, conforme descrito para a etapa *in vitro*.

4.6.7 Análise de microdureza de superfície do esmalte final

A dureza de superfície foi avaliada novamente em todos os espécimes, da mesma forma que foi feita na etapa *in vitro*, conforme apontado nos itens 4.4 e 4.5.4, e esquematizado na Figura 4.

4.6.8 Análise de microdureza longitudinal do esmalte

Após análise da microdureza de superfície do esmalte, foram feitas as leituras de microdureza longitudinal, seguindo os passos do item 4.5.5.

4.7 Processamento dos dados

Todos os dados foram tabelados estabelecendo a condição inicial hígida como *baseline*. As etapas foram assim analisadas sempre tendo esta condição como referência, determinando os valores de ΔMS ou ΔML 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.

4.8 Análise estatística

Para a fase *in vitro*, os dados da microdureza de superfície 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.

Os dados de microdureza longitudinal, ainda para a fase *in vitro*, foram analisados individualmente para cada uma das 7 profundidades (10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μ m) pelos mesmos testes utilizados para a microdureza de superfície. Para comparação das profundidades, foi realizada ANOVA a 3 critérios de medidas repetidas (fatores protocolo, profundidade e etapa, sendo a última considerada como medida repetida), seguida do Teste de Tukey.

Para a fase *in situ*, os dados foram coletados tendo cada voluntário sido considerado uma unidade experimental. Na análise da microdureza de superfície, os dados foram avaliados por um teste não paramétrico (Teste de Friedman). Os dados serão apresentados pelos valores de mediana, 1º quartil (25%) e 3º quartil (75%).

Os valores de dureza longitudinal em cada uma das profundidades foram submetidos ao Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk) e Homogeneidade de variância (Levene). Considerando que não houve distribuição normal em todas as profundidades, a comparação entre as etapas foi realizada pelo Teste não-paramétrico de Friedman, seguido pelo Teste de Tukey para múltiplas comparações.

Para comparar as profundidades, foi utilizada ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas (fatores profundidade e etapa, sendo a última considerada como medida repetida) e as diferenças individuais analisadas por Teste de Tukey.

Os softwares utilizados foram Statistica 10 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) e SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA, EUA). Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%.

---

5 RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

5.1 Fase *in vitro* (Etapa A)

As comparações da dureza de superfície estão descritas na Tabela 1. Por meio da análise de microdureza de superfície, todos os protocolos de desmineralização promoveram perda equivalente de dureza, sendo maior que 75% em todos os casos.

Para superfícies de lesões reproduzidas pelo protocolo DES-RE, ambas as condições após o tratamento com Icon (H/I) e após o novo desafio ácido (H/N) mostraram dureza aumentada quando comparadas à primeira etapa (H/D). Para o grupo de lesões simuladas por MC, essa diferença ocorreu apenas entre a análise após o tratamento com Icon (H/I) e o novo desafio ácido (H/N), que levou a uma maior perda de dureza. Quando a solução MHDP foi utilizada, as diferenças foram observadas entre todas as comparações.

Tabela 1: Médias e desvio-padrão da perda de dureza de superfície Δ MS (%) entre cada etapa comparada aos valores de dureza da condição hígida.

Protocolo	Δ MS Hígido/1º desafio (H/D)	Δ MS Hígido/ ICON (H/I)	Δ MS Hígido/Novo desafio ácido (H/N)
DES-RE	-91,76(9,17) Aa	-42,81(20,67)Ba	-58,54(8,15) Ba
MC	-75,20(9,04) ABa	-62,80(20,52) Aab	-92,25(15,16) Bb
MHDP	-92,50(3,60) Aa	-48,46(21,28) Bb	-66,81(8,17) Ca

N = 13; $p < 0,05$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as etapas, considerando cada protocolo individualmente.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os protocolos, para cada etapa isoladamente.

Quando a dureza longitudinal foi avaliada (Tabela 2), as diferentes profundidades foram consideradas e os resultados mostraram resultados diferentes àqueles apresentados para a dureza de superfície.

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

Protocolo	Profundidade (μ m)	Δ ML Hígido/1º desafio (H/D)	Δ ML Hígido/ICON (H/I)	Δ ML Hígido/Novo desafio ácido (H/N)
DR	10	-73,42(20,54) Aa	-100,00(0,00) Ba	-100,00(0,00) Ba
	30	-38,33(28,45) Aa	-98,65(4,87) Ba	-100,00(0,00) Ba
	50	-21,40(17,52) Aa	-65,83(27,84) Ba	-100,00(0,00) Ca
	70	-7,00(18,78) Aa	-9,44(31,29) Aa	-96,89(7,62) Ba
	90	-0,10(14,99) Aa	13,52(22,47) Aa	-72,69(39,55) Ba
	110	5,53(12,95) Aa	19,87(20,39)Aa	-51,64(45,13) Ba
	220	-4,68(10,72) Aa	4,12(24,90) ABa	-0,93(21,69) Ba
MC	10	-33,62(36,96) Ab	-100,00(0,00) Ba	-100,00(0,00) Ba
	30	-37,83(37,77) Aab	-94,08(5,88) Bab	-98,96(3,37) Bab
	50	-30,83(31,37) Aa	-66,66(23,00) Ba	-95,43(12,06) Ca
	70	-11,24(17,65) Aa	-4,21(16,24) Aa	-79,62(38,54) Ba
	90	-3,29(11,84) Aa	3,07(21,72) Aa	-59,71(47,61) Ba
	110	-6,96(16,46) Aa	2,08(13,91) Aa	-36,35(44,55) Ba
	220	-0,84(19,60) Aa	10,24(27,06) ABa	6,98(22,05) Ba
MHDP	10	-24,40(30,81) Ab	-100,00(0,00) Ba	-100,00(0,00) Ba
	30	-12,83(27,20) Ab	-90,38(17,44) Bb	-98,61(5,01) Bb
	50	-13,15(13,94) Aa	-58,5(34,79) Ba	-94,04(21,49) Ca
	70	-8,91(13,83) Aa	-29,59(39,50) Aa	-90,50(23,77) Ba
	90	-10,18(13,64) Aa	-5,62(30,05) Aa	-73,57(35,33) Ba
	110	-9,81(14,34) Aa	3,25(17,22) Aa	-50,58(49,25) Ba
	220	-8,54(14,98) Aa	5,59(24,78) ABa	-3,12(32,79) Ba

N = 13; $p < 0,05$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as etapas, para um mesmo protocolo, na mesma profundidade.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os protocolos, para cada etapa, na mesma profundidade.

As análises para os 3 protocolos (DES-RE, MC e MHDP) foram exatamente as mesmas, mostrando diferença estatisticamente significativa da etapa H/D, com menor perda de dureza, comparativamente às outras etapas até a profundidade de 50 μm . A partir da profundidade de 70 μm , H/D foi estatisticamente diferente em comparação apenas com H/N. Na comparação entre H/I e H/N, estas etapas foram estatisticamente diferentes nas profundidades de 50 a 110 μm .

Na comparação da mesma profundidade para os grupos desmineralizados com os diferentes protocolos, levando H/D em conta, o protocolo DES-RE promoveu maior perda de dureza em 10 μm em comparação com os outros protocolos, os quais não foram diferentes entre si. Aos 30 μm , DES-RE diferiu apenas do MHDP. Para todas as outras comparações em relação à mesma profundidade, não foram detectadas diferenças estatísticas.

Em relação à comparação das colunas individuais em H/I e H/N separadamente, apenas DES-RE e MHDP foram estatisticamente diferentes em 30 μm .

A comparação entre a perda de dureza em diferentes profundidades para todos os protocolos, é apresentada na Figura 10. Os resultados mostram que há uma redução desta perda quando a profundidade aumenta.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as profundidades.

Figura 10: Gráfico representativo mostrando as diferenças de perda de dureza entre as profundidades para todos os protocolos de desmineralização da etapa *in vitro*.

5.2 Fase *in situ* (Etapa B)

Por meio da análise de microdureza de superfície, o protocolo *in situ* promoveu perda de dureza de quase 40%.

As comparações da dureza de superfície estão descritas na Tabela 3. Pode-se observar uma perda de dureza crescente, à medida que se avança nas etapas.

Tabela 3 – Valores de mediana e quartis da perda de microdureza de superfície ΔMS (%) entre cada etapa comparada à fase inicial hígida.

	ΔMS Hígido/1° desafio (H/D)	ΔMS Hígido/ ICON (H/I)	ΔMS Hígido/2° desafio (H/N)
Mediana	-38,72A	-55,28A	-71,48B
1° quartil (25%)	-75,70	-62,08	-81,56
3° quartil (75%)	-20,57	-49,96	-57,49

N = 15 $p < 0,05$

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre a comparação das diferenças entre as etapas.

Para a avaliação da dureza longitudinal (Tabela 4), as diferentes profundidades foram consideradas e os resultados mostraram resultados distintos àqueles apresentados para a dureza de superfície.

Tabela 4 – Valores de média e desvio-padrão da perda de microdureza longitudinal ΔML (%) entre cada etapa comparada à fase inicial hígida.

Profundidade (μm)	ΔML Hígido/1° desafio (H/D)	ΔML Hígido/ ICON (H/I)	ΔML Hígido/2° desafio (H/N)
10	-47,65 (36,39) Aa	-100,00 (0,00) Ba	-100,00 (0,00) Ba
30	-44,87 (32,99) Aa	-76,43 (38,16) Bb	-81,54 (33,09) Ba
50	-32,81 (29,76) ABab	-26,92 (34,34) Ac	-41,28 (33,24) Bb
70	-20,34 (24,28) ABbc	-9,67 (18,17) Acd	-27,70 (28,65) Bbc
90	-10,29 (16,25) Ac	-6,65 (13,37) Acd	-17,82 (25,26) Acd
110	-4,17 (10,37) Ac	-3,39 (6,76) Ad	-10,05 (18,81) Ad
220	-1,58 (6,08) Ac	-1,16 (5,08) Ad	-1,80 (5,61) Ad

N = 13; $p < 0,05$

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as etapas, considerando a mesma profundidade.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as profundidades para uma mesma etapa.

Nas profundidades de 10 e 30 μm , a perda de dureza foi equivalente entre H/I e H/N e ambas com perda superior a H/D. A partir de 50 μm , estas etapas apresentam-se equivalentes.

Para cada situação individualmente, a perda de dureza comparativamente a profundidade de 10 μm , ocorreu significativamente até 70 μm para a situação H/D, até 30 μm para H/I e até 50 μm para H/N.

A comparação entre a perda de dureza em diferentes profundidades está apresentada na Figura 11. Assim como na fase *in vitro*, os resultados mostram que há uma redução na perda de dureza à medida que a profundidade aumenta.

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as profundidades.

Figura 11: Gráfico representativo mostrando as diferenças de perda de dureza entre as profundidades da etapa *in situ*.

6 DISCUSSÃO

---

6 DISCUSSÃO

Com a compreensão de que a lesão cariosa decorrente da doença cárie se inicia em nível ultra-estrutural, esta evolução do processo de perda mineral e dissolução dos tecidos dentários poderia ser estagnada mais precocemente, evitando consequências mais agressivas (KIDD, 2011).

Neste contexto, uma ação efetiva é possível a partir da observação das manchas brancas de esmalte localizadas nas áreas de deposição de biofilme (CURY; TENUTA, 2009). A partir desta detecção, estratégias terapêuticas devem ser acionadas, paralelamente a uma abordagem local para reequilibrar o processo DES-RE (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; MARINHO et al., 2003; KUGEL; ARSENAULT; PAPAS, 2009; MARTIGNON et al., 2012). Independentemente da opção eleita, o tratamento eficaz envolve necessariamente uma reversão da condição bucal com controle do biofilme (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A maioria dos tratamentos apresentados para lesões incipientes recorrem ao restabelecimento e potencialização da remineralização por meio do uso de agentes fluoretados por diferentes fontes (BERGSTRAND; TWETMAN, 2011; LYNCH et al., 2011).

Perspectivas atuais possibilitaram também o uso de agentes mecânicos que preenchem os poros alargados do substrato de esmalte, base do mecanismo dos infiltrantes de cárie, representado atualmente pelo produto comercial Icon (MEYER-LUECKEL et al., 2011; PARIS et al., 2011). Vários trabalhos têm demonstrado um desempenho interessante deste material em trabalhos laboratoriais, apresentando a capacidade de um molhamento adequado para se infiltrar e oferecer em muitos casos inclusive, a perspectiva de melhorar a condição estética (TORRES et al., 2011; TORRES et al., 2012).

Trabalhos clínicos estão sendo desenvolvidos para analisar esta eficácia, mas a continuação dos trabalhos laboratoriais tem permitido detalhar características de sua performance.

Este trabalho se propôs a investigar a eficiência de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca ativas de cárie promovidas por modelo experimental *in vitro* e *in situ*. As hipóteses nulas de que o Icon® não promove diferente eficiência no tratamento de lesões artificiais de cárie produzidas com distintos protocolos e de que não conferirá mais resistência ao substrato dentário frente a novo desafio ácido foram aceitas.

Primeiramente há de se considerar que uma das questões fundamentais em trabalhos laboratoriais é o tipo de lesão artificial que é utilizada para a análise desse infiltrante. Por este trabalho, foi comparada a lesão artificial criada de três protocolos distintos: ciclagem de DES-RE, gel de MC ou solução de MHDP. Cada um desses métodos visa criar lesões reais de subsuperfície, sem o envolvimento da superfície externa, que seria característica de lesões erosivas (MAGALHÃES et al. 2009). As figuras apresentadas neste trabalho obtidas pela microradiografia evidenciam que independente dos três protocolos usados, todos foram capazes de promover essas lesões, validando as lesões criadas artificialmente (Figuras 5, 6 e 7).

A escolha destes três protocolos está no fato de serem amplamente utilizados em trabalhos de simulação de lesões artificiais de cáries incipientes (MAGALHÃES et al., 2009; MORON, 2011; MORON et al., 2013) e apresentarem particularidades distintas de desmineralização em esmalte. Apesar de ser atribuído à solução MDHP a capacidade de produzir lesões com maior perda mineral na subsuperfície e em maior profundidade do que o gel MC e a ciclagem de pH (MAGALHÃES et al., 2009; MORON, 2011), a maior perda ocorreu quando do uso da ciclagem DES-RE aos 10 e 30 μm , sem diferir de MC. Podemos especular que esse desempenho possa ter sido provocado pela característica dinâmica desta solução, atuando sobretudo na camada mais externa.

O protocolo DES-RE foi aquele que apresentou uma maior perda de dureza na camada mais superficial (10 μm), o que foi sendo igualado aos outros protocolos a partir de 30 μm (para o MC) e 50 μm (para o MHDP). Não houve diferença entre as profundidades das lesões, como apresentado em estudos prévios, porém a menor perda de dureza na camada mais superficial para o grupo MHDP já havia sido relatada (MAGALHÃES et al., 2009; MORON, 2011). Esse protocolo tem sido apontado como importante para a formação da camada superficial, reduzindo a

---

progressão da desmineralização (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985), o que pode explicar o resultado deste estudo. O gel MC apresentou resultados semelhantes à solução MHDP, com menor perda de dureza na camada mais superficial. Conforme descrito anteriormente, por se apresentar em forma de gel, este material é mais denso, o que reduz a velocidade de difusão do ácido e mantém os íons que foram perdidos pelo dente ainda próximos à superfície, mantendo a superfície mais mineralizada (DAMATO; STRANG; STEPHEN, 1988; MORON, 2011).

Reconhecer o protocolo de desmineralização sempre foi um requisito relevante para compreender a eficácia dos tratamentos remineralizantes. Em relação aos infiltrantes, os diferentes protocolos também podem trazer fundamentos interessantes. Dessa forma, ainda sem este intuito em particular, em trabalhos em que a ação do infiltrante também foi avaliada em lesões artificiais, diferentes tipos de protocolo de indução de cárie artificial foram utilizados (TORRES et al., 2011; PARIS et al., 2013a; ARAÚJO et al., 2014; GELANI et al., 2014). Conforme descrito anteriormente, protocolos de desmineralização diferentes levam a distintas características de lesões e conseqüentemente influenciam nas respostas ao tratamento remineralizante subsequente (LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; BUZALAF et al., 2010).

No presente estudo, os diferentes protocolos permitiram respostas similares frente ao tratamento com o infiltrante, a partir da camada de 50 μm . Vale ressaltar que estas respostas distintas nas camadas mais superficiais podem se apresentar para tratamentos remineralizadores, com mecanismo de ação química. O flúor, que é o principal agente remineralizador, age principalmente nas camadas mais superficiais, sendo adsorvido e formando um complexo na superfície dentária, tornando o esmalte mais resistente e criando uma camada protetora que retarda a difusão de ácidos através da estrutura dentária (TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991; ROBINSON, 2009; BUZALAF et al., 2011).

Em contrapartida, o mecanismo de ação do infiltrante é mecânico, não há nenhuma reação química com a estrutura dentária. Um monômero resinoso com alto poder de penetração infiltra o tecido dentário, preenche os poros do esmalte afetado pela lesão cariosa, impedindo assim a sua progressão (PARIS; HOPFENMULLER;

MEYER-LUECKEL, 2010; MEYER-LUECKEL et al., 2011; PARIS et al., 2011).

Portanto, esta diferença nos mecanismos de ação dos materiais acarreta em relações diferentes com a estrutura dentária afetada. Os tratamentos remineralizadores são diretamente influenciados pelas características das lesões porque eles irão reagir quimicamente com esta estrutura, o que não acontece com o infiltrante. Assim, os resultados apresentados são importantes para ressaltar que o tipo de lesão artificialmente produzida com diferentes protocolos poderia determinar resposta semelhante em relação ao desempenho do infiltrante, sendo adequado para os estudos que se proponham a avaliar as propriedades aplicadas deste produto. O infiltrante por ser constituído basicamente por monômero com melhor poder de molhamento e menor peso molecular pode envolver os cristais, permitindo que uma estrutura mais consistente, mesmo que a dureza da resina não seja tão alta quanto a do esmalte.

Para as análises de desmineralização dentária, a microradiografia transversal (TMR) é considerada o padrão ouro, pois ela fornece o conteúdo mineral do espécime, enquanto a microdureza longitudinal reflete a resiliência mecânica do esmalte (MAGALHÃES et al., 2009; MORON, 2011; MORON et al., 2013). Portanto, a metodologia de escolha foi a microdureza pelo fato de o mecanismo de ação do infiltrante não ser através de uma remineralização. Sendo assim, o infiltrante não influenciaria no conteúdo mineral dos espécimes. Por isso, decidiu-se considerar as comparações da microdureza longitudinal das diferentes etapas com os valores iniciais (controle-hígido) como variável de resposta.

A avaliação de dureza de superfície não foi considerada como uma variável de resposta, mas foi avaliada para ser usada como um parâmetro do envolvimento da superfície sob protocolos de desmineralização. A dureza de superfície é considerada uma análise frágil quando a pergunta-chave envolve um desempenho de subsuperfície. Uma vez que as lesões de mancha branca de cárie se desenvolvem na subsuperfície, sob uma camada mineralizada do esmalte, a dureza longitudinal parece ser mais apropriada para este caso (MAGALHÃES et al., 2009). Assim, a avaliação da dureza longitudinal foi analisada como a variável de resposta principal, refletindo uma resposta mecânica (MAGALHÃES et al., 2009; HONÓRIO et al., 2010). Além disso, o infiltrante permanece sobre a superfície do esmalte, apesar

---

do acabamento e polimento após a sua aplicação, acarretando em uma leitura mais irregular e com maior dificuldade, por não estar em uma superfície bem polida.

Magalhães et al (2009) e Moron et al. (2013) utilizaram protocolos de desmineralização semelhantes ao avaliado neste estudo, enfatizando que a dureza longitudinal pode trazer semelhança na interpretação do impacto sobre a produção de cárie artificial em esmalte. É uma medida confiável de propriedades mecânicas apesar de não poder traduzir exatamente a quantificação de perda de minerais, o que pode ser detectado por microradiografia. Eles também salientam que o uso de dureza de superfície não apresentaram resultados eficazes para esta finalidade. Portanto, apenas as medidas de dureza longitudinal foram consideradas neste estudo.

Pelas análises das comparações das relações das diferentes etapas com a inicial por meio da microdureza longitudinal, todos os protocolos foram capazes de induzir a formação de lesão de cárie artificial, o que pode ser observada na Tabela 2. Após o tratamento com o Icon, as leituras nas profundidades mais superficiais (10 e 30 μm) não foram possíveis, pois esta superfície foi desgastada. Como o padrão se repetiu em todos os grupos, podemos presumir que provavelmente o uso do ácido clorídrico a 15% por 2 minutos (segundo o protocolo do fabricante), causou um desgaste erosivo na camada superficial do esmalte (MEYER-LUECKEL; PARIS; KIELBASSA, 2007; PARIS, MEYER-LUECKEL; KIELBASSA, 2007). Vale ressaltar que este protocolo é aplicável a lesões cariosas naturais em dente humano. Estudos prévios demonstraram que lesões naturais normalmente apresentam uma camada superficial mais mineralizada, sendo mais resistente do que lesões artificiais em esmalte bovino (MEYER-LUECKEL et al., 2006). Porém, um estudo mais recente já propõe que, mesmo em lesões naturais em dentes humanos, a utilização de ácido fosfórico a 37% poderia aumentar a permeabilidade e minimizar a remoção da camada superficial, sem afetar o efeito do tratamento com o infiltrante (YIM; KWON; KIM, 2014).

Após o tratamento com o Icon, não foi apresentado um aumento na dureza das camadas mais superficiais, provavelmente ainda pelo efeito do ácido utilizado. Quando os valores de dureza foram se igualando à condição hígida, esta condição foi observada nas camadas mais profundas, onde a perda de dureza detectada foi

---

menor.

Na avaliação de H/I, observa-se que a partir de 70µm a perda de dureza é menor que as camadas mais externas, o que pode sugerir uma interação deste infiltrante com os cristais. O arranjo cristalino descrito por Cui e Ge em 2007 pode ser favorável a esta condição.

No presente estudo, espécimes de esmalte bovino foram utilizados por serem de fácil coleta e manipulação, além de terem dimensões mais favoráveis para obter os espécimes necessários. Apesar de serem menos mineralizados e mais porosos, eles ainda são bons substitutos para os dentes humanos (AMAECHI, HIGHAM, EDGAR, 1998). Como vantagem, o dente bovino tem uma composição química relativamente mais uniforme, resultando em uma menor variação de resultados. Além disso, apesar de sofrer a desmineralização mais rapidamente, as lesões nestes espécimes apresentam estrutura microscópica equivalente às humanas (ÖGAARD; RÖLLA, 1992; BUZALAF et al., 2010). Para a análise do infiltrante, um arranjo ordenado e prismático também do esmalte bovino pode seguir o mesmo padrão.

Vale retomar mais uma vez o mecanismo de ação do Icon, o que deve influenciar diretamente nos resultados apresentados. A partir do momento que o Icon não reage com a estrutura dentária, o esmalte que já estava fragilizado e poroso não é alterado em sua estrutura. O infiltrante penetra nos poros do esmalte e envolve os cristais, mas não altera sua estrutura. Sendo assim, a microdureza está sendo analisada sobre a superfície afetada envolvida pelo infiltrante. O infiltrante é composto basicamente do monômero TEGDMA, que apresenta valores de microdureza naturalmente inferiores aos da estrutura dentária (LARSEN; FREUND; MUNKSGAARD, 1992; CALHEIROS et al., 2008).

O Icon não ofereceu resistência completa a um novo desafio ácido para nenhum dos protocolos. Seu mecanismo age como uma barreira mecânica à passagem dos ácidos provenientes do metabolismo bacteriano, mas não se mostrou resistente o suficiente para impedir a recorrência da lesão de cárie. Provavelmente, a razão principal possa ser atribuída à sua composição à base de TEGDMA. Apesar do TEGDMA apresentar características favoráveis como um infiltrante de cárie, esse monômero apresenta desvantagens como alta hidrofília e consequente degradação

---

no ambiente oral, sendo um material não resistente (PARK et al., 2011). Retomando os aspectos histológicos da estrutura do esmalte, os prismas do esmalte estão ligados por um líquido interprismático (MINE et al., 2010), sendo assim, este monômero hidrofílico está constantemente em contato com um meio úmido, o que provavelmente justifica a resistência mais baixa. Este desempenho tem estimulado investigações que proponham formulações ou associações com outros produtos (ARAÚJO et al., 2014).

Torres et al. (2012) tiveram um propósito semelhante em seu estudo, também verificando diferentes etapas do tratamento com o Icon e, em seguida, submetido a novo desafio ácido. Eles avaliaram que o infiltrante foi capaz de oferecer melhor resistência do que o avaliado no presente trabalho. No entanto, deve ser considerado que as medições foram realizadas sobre a superfície e não internamente (microdureza longitudinal) como no presente estudo.

Os modelos de desmineralização *in vitro*, apesar das vantagens já descritas anteriormente, ainda apresentam limitações, principalmente por não conseguir simular o processo biológico complexo de formação da lesão cáries como acontece *in vivo* (WHITE, 1995). Por isso, uma fase *in situ* também foi desenvolvida neste trabalho. Nessa fase, a perda de dureza de superfície após o 1º desafio ácido se apresentou bem menor (40%) do que em todos os protocolos *in vitro* (>75%). Este resultado pode ser atribuído a uma maior variação dos valores de perda de dureza de acordo com os voluntários, onde se observou que algumas superfícies desenvolveram lesões mais brandas. Esse desempenho na fase *in situ* pode se justificar pela variabilidade dos indivíduos em relação à concentração de íons no fluido do biofilme, pela quantidade de biofilme acumulado e também pela microbiota presente (MORON, 2011). Essa variabilidade justifica os valores de desvio-padrão em todas as etapas dessa fase. Este panorama foi de certa forma esperado, uma vez que há diferenças individuais, porém a confiança pauta-se no delineamento experimental que envolveu critérios rígidos de inclusão e exclusão.

É interessante observar que tanto pela análise de menor perda de dureza de superfície nas profundidades do protocolo *in situ* comparado aos *in vitro*, principalmente nas camadas mais externas, que a saliva possa ter tido uma influência significativa. A saliva além de formar uma barreira mecânica como uma

---

camada protetora, apresenta a ação de lavagem mecânica que não ocorre nos protocolos reproduzidos laboratorialmente (TEN CATE, 1994; ZERO, 1995).

Apesar dessa diferença, assim como na fase *in vitro*, após a aplicação do Icon as leituras nas profundidades mais superficiais não foram possíveis, pois esta superfície foi desgastada. Observou-se que esta situação ocorreu em 100% dos casos na profundidade de 10 μm , e não 10 e 30 μm como foi apresentado nos protocolos *in vitro*. Provavelmente, o desgaste erosivo também ocorreu nessa fase, porém pode não ter sido tão agressivo uma vez que a desmineralização inicial havia sido menor na fase *in situ*.

O Icon também não ofereceu resistência completa a um novo desafio ácido na fase *in situ*, mesmo sob a ação protetora da saliva. Mais uma vez, esse resultado pode ser atribuído também ao arranjo cristalino que pode ter sido envolvido pelo infiltrante.

De forma geral, o comportamento nas fases *in vitro* e *in situ*, apesar de suas particularidades, foram semelhantes. Análise futura para o estabelecimento de comparação destas duas metodologias será estabelecida.

Para futuros estudos, sugere-se a utilização de um ácido mais fraco para o condicionamento prévio dos espécimes (ácido fosfórico a 37%), objetivando preservar as camadas mais superficiais (MEYER-LUECKEL; PARIS; KIELBASSA, 2007; PARIS, MEYER-LUECKEL; KIELBASSA, 2007) para que seja possível uma melhor comparação dos resultados.

A utilização do infiltrante resinoso pode ser inicialmente interessante, mas não ofereceu resistência completa ao novo desafio ácido. A indicação do uso do Icon, mesmo com limitações ainda parece promissora para minimizar lesões iniciais de cárie e sua aparência estética por meio da interação com os cristais, mas novas formulações experimentais ou condições devem ser investigadas para superar suas fragilidades.

---

7 CONCLUSÕES

---

7 CONCLUSÕES

Pela fase *in vitro*, podemos concluir que os protocolos DES-RE, MC e MHDP parecem ser confiáveis para induzir lesões artificiais de cárie de esmalte para testar o infiltrante, mostrando desempenho similar.

Ambas as fases, *in vitro* e *in situ*, demonstraram que mesmo o infiltrante se apresentando como uma opção de tratamento para as lesões iniciais de cárie, este não resgata a condição inicial e não oferece resistência a um novo desafio ácido completamente.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Aasenden R, Brudevold F, McCann HG. The response of intact and experimentally altered human enamel to topical fluoride. *Arch Oral Biol.* 1968;13(5):543-52.
- Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006;40(1):28-32.
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors affecting the development of carious lesions in bovine teeth in vitro. *Arch Oral Biol.* 1998;43(8):619-28.
- Araújo GS, Sfalcin RA, Araújo TG, Alonso RC, Puppim-Rontani RM. Evaluation of polymerization characteristics and penetration into enamel caries lesions of experimental infiltrants. *J Dent.* 2014;41(11):1014-9.
- Arends J, Christoffersen J, Buskes JA, Ruben J. Effects of fluoride and methanediol diphosphate on enamel and on dentine demineralization. *Caries Res.* 1992;26(6):409-17.
- Arends J, Christoffersen J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res.* 1986;65(1):2-11.
- Arends J, Dijkman T, Christoffersen J. Average mineral loss in dental enamel during demineralization. *Caries Res.* 1987;21(3):249-54.
- Arends J, Schuthof J, Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res* 1980;14: 190–195.
- Arends J, Schuthof J, Jongebloed WG. Microhardness indentations on artificial white spot lesions. *Caries Res* 1979; 13: 290–297.
- Argenta RM, Tabchoury CP, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(3):241-6.
- Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. An investigation of some food-approved polymers as agents to inhibit hydroxyapatite dissolution. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):457-61.
-

Bardal PA, Olympio KP, Buzalaf MA, Bastos JR. Dental caries and dental fluorosis in 7-12-year-old schoolchildren in Catalão, Goiás, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2005;13(1):35-40.

Belli R, Rahiotis C, Schubert EW, Baratieri LN, Petschelt A, Lohbauer U. Wear and morphology of infiltrated white spot lesions. *J Dent.* 2011;39(5):376-85.

Bergstrand F, Twetman S. A review on prevention and treatment of post-orthodontic white spot lesions - evidence-based methods and emerging technologies. *Open Dent J.* 2011;5:158-62.

Buchalla W, Imfeld T, Attin T, Swain MV, Schmidlin PR. Relationship between nanohardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. *Caries Res.* 2008;42(3):157-63.

Buskes JAKM, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. *Caries Res.* 1985;19:490-496.

Buzalaf MA, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(4):316-34.

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

Calheiros FC, Daronch M, Rueggeberg FA, Braga RR. Degree of conversion and mechanical properties of a BisGMA:TEGDMA composite as a function of the applied radiant exposure. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;84(2):503-9.

Clark CA, Fintz JB, Taylor R. Effects of the control of plaque on the progression of dental caries: results after 19 months. *J Dent Res.* 1974;53(6):1468-74.

Clark DC. A review on fluoride varnishes: an alternative topical fluoride treatment. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1982;10(3):117-23.

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.

Costa AMM. Produção de lesão artificial de cair em superfície oclusal e lisa: análise da microdureza do esmalte e profundidade de lesão em função do tempo de

---

desmineralização [tese]. Piracicaba (SP): Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2011.

Cui FZ, Ge J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1(3):185-91.

Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*. 2009; 23(Spec Iss 1):23-30.

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

Dayila JM, Buonocore MG, Greeley CB, Provenza DV. Adhesive penetration in human artificial and natural white spots. *J Dent Res*. 1975;54(5):999-1008.

Dubey SD, Lehnhoff RW, Radike AW. A statistical confidence interval for true per cent reduction in caries-incidence studies. *J Dent Res*. 1965;44(5):921-3.

Ekstrand KR, Bakhshandeh A, Martignon S. Treatment of proximal superficial caries lesions on primary molar teeth with resin infiltration and fluoride varnish versus fluoride varnish only: efficacy after 1 year. *Caries Res*. 2010;44(1):41-6.

Feagin F, Koulourides T, Pigman W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. *Arch Or Biol*. 1969;14(12):1407-17.

Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO2 laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*. 1998;77(6):1397-403.

Featherstone JD. Consensus Conference on Intra-oral Models: Evaluation Techniques. *J Dent Res*. 1992; 71 (Spec No): 955-956.

Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J*. 2008;53(3):286-91.

Featherstone JDB. Modeling the caries – inhibitory effects of dental materials. *Dent Mat* 1996;12:194-7.

Featherstone JDB. The science and practice of caries prevention. *JADA* 2000;131:887-99.

Fejerskov O, Kidd E. Cárie Dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Editora Santos; 2005.

Ferreira Zandoná A, Santiago E, Eckert GJ, Katz BP, Pereira de Oliveira S, Capin OR, Mau M, Zero DT. The Natural History of Dental Caries Lesions: A 4-year Observational Study. *J Dent Res*. 2012;91(9):841-6.

Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. *Caries Res*. 2004;38(6):561-6.

Gelani R, Zandona AF, Lippert F, Kamocka MM, Eckert G. In vitro progression of artificial white spot lesions sealed with an infiltrant resin. *Oper Dent*. 2014;39(5):481-8.

Gilmour ASM, Edmunds DH, Dumme MH. The production of secondary caries-like lesions on cavity walls and the assessment of microleakage using na in vitro microbial caries system. *J Oral Rehab*. 1990; 17 (6): 573-578.

Hayati F, Okada A, Kitasako Y, Tagami J, Matin K. An artificial biofilm induced secondary caries model for in vitro studies. *Aust Dent J*. 2011;56(1):40-7.

Hicks MJ, Flaitz CM, Silverstone LM. Secondary caries formation in vitro around glass ionomer restorations. *Quintessence Int*. 1986;17(9):527-32.

Holloway PJ, Moore WJ, Rugg-Gunn AJ, Murray JJ, Edgar WM, Drucker DB et al. The role of sugar in the aetiology of dental caries. *J Dent*. 1983;11(3):189-213.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Cross-sectional microhardness of human enamel subjected to erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges. *Caries Res*. 2010;44(1):29-32.

Ismail AI, Burt BA, Brunelle JA. Prevalence of total tooth loss, dental caries, and periodontal disease in Mexican-American adults: results from the southwestern HHANES. *J Dent Res*. 1987;66(6):1183-8.

Keyes PH, Shourie KL. Dental caries in the Syrian hamster; the effect of three different fluoride compounds on caries activity. *J Dent Res*. 1949;28(2):138-43.

Keyes PH. Dental caries in the molar teeth of rats. I. Distribution of lesions induced by high-carbohydrate low-fat diets. *J Dent Res*. 1958;37(6):1077-87.

Kidd E. The implications of the new paradigm of dental caries. *J Dent.* 2011 Dec;39 Suppl 2:S3-8.

Kielbassa AM, Oeschger U, Schulte-Monting J, Meyer-Lueckel H. Microradiographic study on the effects of salivary proteins on in vitro demineralization of bovine enamel. *J Oral Rehabil.* 2005;32(2):90-6.

Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1999;44(3):243-51.

Kim S, Kim EY, Jeong TS, Kim JW. The evaluation of resin infiltration for masking labial enamel white spot lesions. *Int J Paediatr Dent.* 2011;21(4):241-8.

Klein AL, Rodrigues LK, Eduardo CP, Nobre dos Santos M, Cury JA. Caries inhibition around composite restorations by pulsed carbon dioxide laser application. *Eur J Oral Sci.* 2005 Jun;113(3):239-44. Erratum in: *Eur J Oral Sci.* 2005;113(5):449.

Kugel G, Arsenault P, Papas A. Treatment modalities for caries management, including a new resin infiltration system. *Compend Contin Educ Dent.* 2009;30 Spec No 3:1-10.

Larsen IB, Freund M, Munksgaard EC. Change in surface hardness of BisGMA/TEGDMA polymer due to enzymatic action. *J Dent Res.* 1992;71(11):1851-3.

Larsen MJ. On the chemical and physical nature of erosions and caries lesions in dental enamel. *Caries Res.* 1991;25(5):323-9.

Lausch J, Paris S, Selje T, Dörfer CE, Meyer-Lueckel H. Resin Infiltration of Fissure Caries with Various Techniques of Pretreatment in vitro. *Caries Res.* 2014;49(1):50-55.

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.

Leroux BG, Maynard RJ, Domoto P, Zhu C, Milgrom P. The estimation of caries prevalence in small areas. *J Dent Res.* 1996;75(12):1947-56.

Lynch RJ, Churchley D, Butler A, Kearns S, Thomas GV, Badrock TC, Cooper L, Higham SM. Effects of zinc and fluoride on the remineralisation of artificial carious

---

lesions under simulated plaque fluid conditions. *Caries Res.* 2011;45(3):313-22.

Lynch RJ, Mony U, ten Cate JM. Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization in vitro. *Caries Res.* 2007;41(4):257-62.

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;36(2):158-62.

Magalhães AC, Furlani Tde A, Italiani Fde M, Iano FG, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on remineralisation of artificially demineralised enamel and on the composition of the dental biofilm formed in situ. *Arch Oral Biol.* 2007;52(12):1155-60.

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.

Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Systematic review of controlled trials on the effectiveness of fluoride gels for the prevention of dental caries in children. *J Dent Educ.* 2003;67(4):448-58.

Martignon S, Ekstrand KR, Gomez J, Lara JS, Cortes A. Infiltrating/sealing proximal caries lesions: a 3-year randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2012;91(3):288-92.

Massler M, Ludwick W, Schour I. Dental caries and gingivitis in males 17 to 20 years old (at the Great Lakes Naval training Center). *J Dent Res.* 1952;31(2):195-9.

Meyer-Lueckel H, Chatzidakis A, Naumann M, Dörfer CE, Paris S. Influence of application time on penetration of an infiltrant into natural enamel caries. *J Dent.* 2011;39(7):465-9.

Meyer-Lueckel H, Paris S, Kielbassa AM. Surface layer erosion of natural caries lesions with phosphoric and hydrochloric acid gels in preparation for resin infiltration. *Caries Res.* 2007;41(3):223-30.

Meyer-Lueckel H, Paris S, Mueller J, Cölfen H, Kielbassa AM. Influence of the application time on the penetration of different dental adhesives and a fissure

---

sealant into artificial subsurface lesions in bovine enamel. *Dent Mater.* 2006;22(1):22-8.

Meyer-Lueckel H, Paris S. Improved resin infiltration of natural caries lesions. *J Dent Res.* 2008;87(12):1112-6.

Mine A, De Munck J, Vivan Cardoso M, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T et al. Enamel-smear compromises bonding by mild self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2010;89(12):1505-9.

Moreno EC, Zahradnik RT. Demineralization and remineralization of dental enamel. *J Dent Res.* 1979;58(B):896-902.

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. Comparação entre diferentes métodos para produção e análise de lesão de cárie artificial em esmalte e dentina [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. *Quintessence Int.* 2000;31(8):527-33.

Navarro MFL, Franco EB, Mondelli J, Pereira JC, Martins LRM, Pinheiro CE. Remineralização de manchas brancas em esmalte. *Estomat Cult.* 1985;15(4):41-46.

Newbrun E. Sugar and dental caries: a review of human studies. *Science.* 1982;217(4558):418-23.

Ögaard B, Rølla G. Intra-oral models: comparison of in situ substrates. *J Dent Res.* 1992;71:920-923.

Ogaard B, Seppä L, Rølla G. Professional topical fluoride applications--clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):190-201.

Ögaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res.* 2001;35(Suppl. 1):40-44.

Oliveira G, Boteon A, Ionta F, Moretto M, Honório H, Wang L, Rios D. In Vitro Effects of Resin Infiltration on Enamel Erosion Inhibition. *Oper Dent*. 2015. Jan 14. [Em impressão]

Oliveira RVD. Análise da progressão e da reversão de lesões artificiais de cárie através de espectroscopia Raman e tomografia de coerência óptica [dissertação]. João Pessoa (PB): Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba; 2011.

Olympio KP, Cardoso VE, Bijella MF, Pessan JP, Delbem AC, Buzalaf MA. Urinary fluoride output in children following the use of a dual-fluoride varnish formulation. *J Appl Oral Sci*. 2009;17(3):179-83.

Onishi T, Umemura S, Yanagawa M, Matsumura M, Sasaki Y, Ogasawara T, Ooshima T. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Arch Oral Biol*. 2008;53(3):257-60.

Paris S, Bitter K, Naumann M, Dörfer CE, Meyer-Lueckel H. Resin infiltration of proximal caries lesions differing in ICDAS codes. *Eur J Oral Sci*. 2011;119(2):182-6.

Paris S, Hopfenmuller W, Meyer-Lueckel H. Resin infiltration of caries lesions: an efficacy randomized trial. *J Dent Res*. 2010;89(8):823-6.

Paris S, Lausch J, Selje T, Dörfer CE, Meyer-Lueckel H. Comparison of sealant and infiltrant penetration into pit and fissure caries lesions in vitro. *J Dent*. 2014;42(4):432-8.

Paris S, Meyer-Lueckel H, Cölfen H, Kielbassa AM. Penetration coefficients of commercially available and experimental composites intended to infiltrate enamel carious lesions. *Dent Mater*. 2007;23(6):742-8.

Paris S, Meyer-Lueckel H, Kielbassa AM. Resin infiltration of natural caries lesions. *J Dent Res*. 2007;86:662-666.

Paris S, Meyer-Lueckel H. Inhibition of caries progression by resin infiltration in situ. *Caries Res*. 2010;44(1):47-54.

Paris S, Schwendicke F, Seddig S, Müller WD, Dörfer C, Meyer-Lueckel H. Micro-hardness and mineral loss of enamel lesions after infiltration with various resins: Influence of infiltrant composition and application frequency in vitro. *J Dent*. 2013a;41(6):543-8.

Paris S, Soviero VM, Schuch M, Meyer-Lueckel H. Pretreatment of natural caries lesions affects penetration depth of infiltrants in vitro. *Clin Oral Investig*. 2013b;17(9):2085-9.

Paris S, Soviero VM, Seddig S, Meyer-Lueckel H. Penetration depths of an infiltrant into proximal caries lesions in primary molars after different application times in vitro. *Int J Paediatr Dent*. 2012;22(5):349-55.

Park J, Eslick J, Ye Q, Misra A, Spencer P. The influence of chemical structure on the properties in methacrylate-based dentin adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(11):1086-93.

Pessan JP, Al-Ibrahim NS, Buzalaf MA, Toumba KJ. Slow-release fluoride devices: a literature review. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(4):238-46.

Phark JH, Duarte S Jr, Meyer-Lueckel H, Paris S. Caries infiltration with resins: a novel treatment option for interproximal caries. *Compend Contin Educ Dent*. 2009;30 Spec No 3:13-7.

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.

Quintessence Int. 2010;41(10):e192-9.

Ramires I, Buzalaf MA. Fifty years of fluoridation of public water supplies in Brazil: benefits for the control of dental caries. *Cien Saude Colet*. 2007;12(4):1057-65.

Rao A, Malhotra N. The role of remineralizing agents in dentistry: a review. *Compend Contin Educ Dent*. 2011;32(6):26-33.

Rehder Neto FC et al. Potential agents to control enamel caries-like lesions. *J Dent*. 2009;37:786-790.

Robinson C, Hallsworth AS, Weatherell JA, Künzel W. Arrest and control of carious lesions: a study based on preliminary experiments with resorcinol-formaldehyde resin. *J Dent Res*. 1976;55(5):812-8.

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

Schafer F, Raven SJ, Parr TA. The effect of lesion characteristic on remineralization and model sensitivity. *J Dent Res.* 1992;71(special issue): 811–813.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine in situ. *Caries Res.* 2009;43(6):415-21.

Seppä L. Effects of a sodium fluoride solution and a varnish with different fluoride concentrations on enamel remineralization in vitro. *Scand J Dent Res.* 1988;96(4):304-9.

Silverstone LM. The histopathology of enamel lesions produced in vitro in teeth previously exposed to calcifying fluids. *Caries Res.* 1970;4(1):31-48.

Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC. Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study. *Caries Res.* 2009;43(4):302-7.

Suyama E, Tamura T, Ozawa T, Suzuki A, Iijima Y, Saito T. Remineralization and acid resistance of enamel lesions after chewing gum containing fluoride extracted from green tea. *Aust Dent J.* 2011;56(4):394-400.

Tashima AY. Avaliação in vitro da morfologia e da capacidade de paralização de lesões incipientes de cárie artificialmente induzidas em dentes decíduos após irradiação com laser de Er:YAG [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2006.

Ten Cate JM et al. Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. *J Dent Res.* 2008;87(10):943-947.

Ten Cate JM, Dundon KA, Vernon PG, Damato FA, Huntington E, Exterkate RA et al. Preparation and measurement of artificial enamel lesions, a four-laboratory ring test. *Caries Res.* 1996;30(6):400-7.

Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(3):283-96.

Ten Cate JM. In situ models, physico-chemical aspects. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):125-33.

Ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(5 Pt 2):461-5.

Theuns HM, van Dijk JW, Driessens FC, Groeneveld A. Effect of time, degree of saturation, pH and acid concentration of buffer solutions on the rate of in-vitro demineralization of human enamel. Arch Oral Biol. 1985;30(1):37-42.

Theuns HM. et al. Effect of the pH of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. Caries Res 1984;18:7-11.

Thylstrup A, Fejerskov O. Cariologia Clínica. 2 ed. São Paulo: Editora Santos; 1995.

Torres C, Rosa P, Ferreira N, Borges AB. Effect of Caries Infiltration Technique and Fluoride Therapy on Microhardness of Enamel Carious Lesions. Oper Dent. 2012.

Torres CRG, Borges AB, Torres LM, Gomes IS, de Oliveira RS. Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on the colour masking of white spot lesions. J Dent. 2011;39(3):202-7.

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

Wang L, Honorio HM, Rios D, Delbem AC, Palma-Dibb RG, Buzalaf MA, Atta MT, Tenuta LM. Short-term in situ/ex vivo study of the anticariogenic potential of a resin-modified glass-ionomer cement associated with adhesive systems.

White DJ. The application of *in vitro* models to research on demineralization and remineralization of the teeth. Adv Dent Res. 1995;9:175-93.

Yim HK, Kwon HK, Kim BI. Modification of surface pre-treatment for resin infiltration to mask natural white spot lesions. J Dent. 2014;42(5):588-94.

Zero DT. Dental caries process. Dent Clin North Am. 1999;43(4):635-664.

Zero DT. In situ caries models. Adv Dent Res. 1995;9(3):214-30.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca: análise in vitro, in situ e in vivo

Pesquisador: Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 07182912.7.0000.5417

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 138.226

Data da Relatoria: 31/10/2012

Apresentação do Projeto:

O presente estudo será desenvolvido em 3 etapas: in vitro, in situ e in vivo. Etapa A: o fator em estudo será o efeito do infiltrante sobre esmalte bovino desmineralizado por indução sob três modelos de cárie artificial. A seguir, será avaliada a resposta deste tratamento frente a um novo desafio ácido, para se avaliar a eficiência do tratamento realizado. Etapa B: será realizado um desafio cariogênico in situ, cujo os espécimes serão

subsequentemente tratados com infiltrante. A seguir, um novo desafio ácido in situ será realizado para se avaliar a eficiência do infiltrante a esta condição. Para as etapas A e B, as variáveis de resposta serão análises de microdureza superficial e longitudinal. Etapa C: o fator a ser estudado será o efeito funcional e estético do infiltrante por meio de um ensaio clínico controlado randomizado. Trata-se de um estudo intervencional,

longitudinal, paralelo e duplo cego (paciente e avaliador). As variáveis de resposta serão a análise clínica visual e o QLF.

Objetivo da Pesquisa:

Este trabalho tem o objetivo de avaliar a eficiência de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca ativas de cárie

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há nenhum risco para a saúde dos sujeitos de pesquisa com os protocolos realizados nesta

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: mferrari@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

pesquisa.

Benefícios:

Para a fase in vivo: os sujeitos receberão tratamento adequado para as lesões de cárie iniciais (manchas brancas) presentes, além de instruções de higiene bucal. Para a fase in situ: este experimento irá avaliar a eficácia de um novo tratamento de lesões iniciais de cárie e os voluntários irão contribuir com tal investigação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo apresenta as seguintes hipóteses nulas a serem testadas serão: 1. O infiltrante resinoso Icon® não promove diferente eficiência no tratamento de lesões artificiais de cárie produzidas com distintos protocolos em laboratório. 2. O infiltrante resinoso Icon® não conferirá mais resistência ao substrato dentário frente a novo desafio ácido (in vitro e in situ). 3. O infiltrante resinoso Icon® não promove efeito clínico diferente de um verniz fluoretado

A eficiência clínica será avaliada por um estudo clínico controlado randomizado comparando o uso do infiltrante com um verniz fluoretado em lesões de manchas brancas. Na fase in vitro, lesões cáries artificiais serão produzidas em 90 espécimes de esmalte bovino através de três diferentes protocolos (gel MC, solução MHPD e ciclagem DES-RE). Os espécimes serão tratados com o infiltrante e submetidos a novo desafio ácido por ciclagem DES-RE. A microdureza superficial e longitudinal dos espécimes será avaliada em 3 tempos: após a desmineralização pelos diferentes protocolos, após o tratamento com o infiltrante e após o novo desafio ácido. Na fase in situ participarão 12 voluntários, os quais usarão dispositivos palatinos contendo quatro espécimes de esmalte bovino por 14 dias. Durante este período, os voluntários irão gotejar solução de sacarose 8x/dia sobre os espécimes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória adequadamente preenchidos.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto não apresenta pendências ou inadequações

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP considera o projeto APROVADO por não apresentar impedimentos éticos.

Esse projeto foi considerado APROVADO. O CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatórios

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** mferrari@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

anuais (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado. Qualquer alteração na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores deverá ser prontamente comunicada. Lembramos que na apresentação do relatório final, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

BAURU, 05 de Novembro de 2012

Assinador por:
Maria Teresa Atta
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA   **CEP:** 17.012-901
UF: SP   **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356   **Fax:** (14)3235-8356   **E-mail:** mferrari@fob.usp.br

ANEXO B**Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa - Emenda**

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca: análise in vitro e in situ

Pesquisador: Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07182912.7.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 817.124

Data da Relatoria: 24/09/2014

Apresentação do Projeto:

O presente estudo será desenvolvido em 3 etapas: in vitro, in situ e in vivo. Etapa A: o fator em estudo será o efeito do infiltrante sobre esmalte bovino desmineralizado por indução sob três modelos de cárie artificial. A seguir, será avaliada a resposta deste tratamento frente a um novo desafio ácido, para se avaliar a eficiência do tratamento realizado. Etapa B: será realizado um desafio cariogênico in situ, cujo os espécimes serão subsequentemente tratados com infiltrante. A seguir, um novo desafio ácido in situ será realizado para se avaliar a eficiência do infiltrante a esta condição. Para as etapas A e B, as variáveis de resposta serão análises de microdureza superficial e longitudinal. Etapa C: o fator a ser estudado será o efeito funcional e estético do infiltrante por meio de um ensaio clínico controlado randomizado. Trata-se de um estudo intervencional, longitudinal, paralelo e duplo cego (paciente e avaliador). As variáveis de resposta serão a análise clínica visual e o QLF.

Objetivo da Pesquisa:

Este trabalho tem o objetivo de avaliar a eficiência de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca ativas de cárie.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 817.124

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há nenhum risco para a saúde dos sujeitos de pesquisa com os protocolos realizados nesta pesquisa.

Benefícios:

Para a fase in vivo: os sujeitos receberão tratamento adequado para as lesões de cárie iniciais (manchas brancas) presentes, além de instruções de higiene bucal. Para a fase in situ: este experimento irá avaliar a eficácia de um novo tratamento de lesões iniciais de cárie e os voluntários irão contribuir com tal investigação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo será desenvolvido em 2 etapas: in vitro e in situ. Etapa A: o fator em estudo será o efeito do infiltrante sobre esmalte bovino desmineralizado por indução sob três modelos de cárie artificial. A seguir, será avaliada a resposta deste tratamento frente a um novo desafio ácido, para se avaliar a eficiência do tratamento realizado. Etapa B: será realizado um desafio cariogênico in situ, cujo os espécimes serão subsequentemente tratados com infiltrante. A seguir, um novo desafio ácido in situ será realizado para se avaliar a eficiência do infiltrante a esta condição. Para as etapas A e B, as variáveis de resposta serão análises de microdureza superficial e longitudinal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória apresentados adequadamente.

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As autoras encaminham EMENDA informando alterações no desenvolvimento da pesquisa, sendo elas: exclusão da etapa clínica; na etapa in situ aumentou o número de voluntários de 12 para 15; ainda na fase in situ, o número de blocos de esmalte bovino fixados nos dispositivos intrabuciais passou para 2 por dispositivo. Em função dessas alterações devidamente justificadas e documentos anexados à PB, o TCLE também foi modificado em virtude do novo título da pesquisa: Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca: análise in vitro e in situ.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA   **CEP:** 17.012-901
UF: SP   **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356   **Fax:** (14)3235-8356   **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 817.124

Estando a EMENDA dentro das normas éticas, sou de parecer favorável.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

As alterações solicitadas pelos pesquisadores, por meio de EMENDA, foram analisadas por um relator e consideradas APROVADAS ad referendum deste Colegiado. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

BAURU, 02 de Outubro de 2014

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA   **CEP:** 17.012-901
UF: SP   **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356   **Fax:** (14)3235-8356   **E-mail:** cep@fob.usp.br

ANEXO C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos

Área Departamental de Dentística

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto de estudo: “Efeito de um infiltrante resinoso no tratamento de lesões de mancha branca: análise *in vitro* e *in situ*”

Pesquisador Responsável: Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo

Objetivo: Este trabalho tem o objetivo de avaliar a eficiência de um novo produto no tratamento de lesões iniciais de cárie (manchas brancas ativas).

Métodos e duração do projeto: Você deverá utilizar, durante um período de 14 dias, um aparelho no “céu da boca” confeccionado em resina acrílica, onde serão fixados 2 blocos de esmalte bovino previamente esterilizados. Durante o experimento, você só deverá remover o aparelho para a realização de 4 refeições diárias (café da manhã, almoço, lanche e jantar, 1h no máximo cada refeição) e ingestão de água. O intervalo entre as refeições deve ser de pelo menos 2 a 3 horas. Após as refeições, a higiene bucal será realizada e o aparelho reposicionado na boca. Oito vezes ao dia, uma solução de sacarose a 20% será gotejada sobre os espécimes de esmalte por 5 minutos. Logo após, o aparelho será reposicionado na boca. Uma semana antes do início do experimento até o final dele, você só deverá utilizar a escova e pasta de dentes doadas pelo pesquisador. Esta mesma sequência será repetida alguns dias depois, pelo mesmo período de tempo, porém agora com menos blocos de esmalte bovino.

Riscos: Não há nenhum risco para sua saúde com o tratamento realizado nesta pesquisa.

Benefícios: Este experimento irá avaliar a eficácia de um novo tratamento de lesões iniciais de cárie.

Documentação: Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será guardada juntamente com sua ficha clínica no arquivo do estudo e você receberá outra cópia. Se você precisar entrar em contato, em caso de necessidade, dúvidas, remarcação de consulta, ou mudança de endereço e/ou telefone, por favor entre em contato com a Doutoranda Maria Cristina Carvalho de Almendra Freitas ou com a Profa. Dra. Linda Wang pelo telefone: 32358323, ou pessoalmente no Departamento de Dentística desta faculdade. Você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta faculdade, caso tenha alguma pergunta sobre seus direitos, ou qualquer dano que você acha que pode ter sido causado pelo estudo, por meio do telefone: (14) 3235-8356, ou pessoalmente na Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP, setor de convênios e comissões de segunda a sexta-feira, em horário comercial (8:00 -12:00 e das 14:00 -17:00 hs).

Confidencialidade: Seu nome não será publicado em nenhum momento do estudo. Seus registros serão confidenciais, segundo leis federais, estaduais e locais.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos

Área Departamental de Dentística

Participação: Participar do estudo é completamente de sua escolha (voluntária). Você poderá desistir a qualquer momento e por qualquer motivo, sem que você seja prejudicado no atendimento como paciente da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Consentimento: Eu li e entendi todas as informações citadas acima. O dentista que estava me tratando se ofereceu para responder qualquer pergunta em relação ao estudo.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru - SP, ____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do Sujeito da Pesquisa

_____
Assinatura do Autor

ANEXO C

Instruções aos Voluntários da etapa *in situ*

INSTRUÇÕES PARA REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Você recebeu um **dentifrício, fio dental e escova dentária** para utilizar desde então **até o final do experimento**.

Você irá **instalar o aparelho hoje** (___/___/___), à noite, após a última higiene bucal. Durante toda a fase *in situ* (**14 dias**), você só deverá remover o aparelho para a realização das **refeições e ingestão de água**. Nestes momentos, o aparelho ficará envolvido em gaze umedecida por água deionizada. Após as refeições, a **higiene bucal** será realizada e o aparelho reposicionado na boca.

Oito vezes ao dia, uma **solução** de sacarose será gotejada sobre os espécimes e você vai esperar por **5 minutos**. Logo após, o aparelho deverá ser reposicionado na boca. Para que não se perca em quantas vezes já gotejou a solução, você terá um **cartão** para anotar os horários e fazer este controle. Dê pelo menos 1 hora de intervalo entre cada vez. Mantenha a solução na **geladeira** pelo máximo de tempo possível e **agite** o recipiente com a solução antes do uso. A solução será trocada em um intervalo de 3 a 5 dias para evitar crescimento de bactérias e fungos.

Você **não pode** utilizar **produtos fluoretados** ou **antimicrobianos** durante a fase *in situ* e nem higienizar o aparelho na área das telas plásticas.

Após os 14 dias (___/___/___), você irá me **devolver o aparelho** para que eu faça o tratamento necessário nos espécimes e então lhe entregarei um novo aparelho alguns dias depois. Durante esse período de repouso, você **continuará usando** o dentifrício, a escova e o fio dental.

RESUMO:

- Uso do dentifrício, escova e fio dental doados durante todo o experimento;
- Uso constante do aparelho, exceto durante refeições e ingestão de água;
- Após as refeições, realizar a higiene bucal antes de reposicionar o aparelho;
- Gotejar a solução doada 8x/dia nos espécimes, esperar 5 minutos e reposicionar o aparelho na boca;
- Não utilizar produtos fluoretados ou antimicrobianos durante o experimento e nem higienizar o aparelho na área das telas.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Valores de microdureza de superfície de todos os espécimes da etapa *in vitro*

Grupos	HÍGIDO	1o DESAFIO	ICON	2o DESAFIO
DR	340,0545621	7,106917175	276,7687188	103,0404921
DR	318,667474	42,92928505	130,6548233	187,2182219
DR	309,798634	59,12419912	197,8353314	152,1041301
DR	303,6402649	14,70026427	164,5691771	136,6351699
DR	300,1475672	9,824510946	131,7213805	88,27038013
DR	332,0795432	6,995044545	133,3997461	146,4110072
DR	303,3472869	96,27544081	191,7695341	110,558752
DR	333,2635014	12,06933277	117,6225135	146,9143062
DR	311,9694563	11,26500316	244,9220894	126,6841038
DR	315,8606114	4,357661154	71,67321832	123,8650302
DR	320,1717801	4,955024628	245,4154501	LEIT N POSS
DR	304,0008431	31,20178901	259,302425	136,6351699
DR	300,3218283	10,25692603	230,5809185	106,9720163
MC	322,17736	79,53373251	71,02046973	13,36538972
MC	340,041376	76,72182593	98,68694352	7,739056488
MC	343,8287689	125,4619869	307,1463798	26,12893045
MC	329,1079731	72,20082138	214,9411982	7,752682431
MC	298,9485035	109,9671103	104,2656286	7,610083682
MC	297,8900788	41,66234665	69,96321741	8,265929116
MC	312,5987646	52,66647359	75,43505719	9,28178187
MC	307,9980405	73,40191468	73,73071823	8,625539764
MC	302,695773	131,9458046	162,1082176	175,4753645
MC	301,1185321	63,37966343	73,98304253	13,43242599
MC	310,8447311	41,83362533	64,7021012	14,24020613
MC	306,2652287	66,11530601	104,0342803	12,70933843
MC	307,3003931	78,45008092	118,580526	6,657230485
MHDP	313,6527012	25,30161573	160,0158146	81,62965998
MHDP	301,3334203	31,91153259	251,3186238	84,09663808
MHDP	301,8427018	4,33961673	279,9525698	97,6420683
MHDP	320,8740668	13,83981347	145,995461	79,12643435
MHDP	300,7131085	21,92255872	179,3847717	145,6017544
MHDP	328,3828751	46,85831241	90,2082286	79,49824903
MHDP	306,1691832	27,71438686	236,9836338	119,5372675
MHDP	311,1458151	11,65887641	161,0933892	78,90562249
MHDP	308,7618881	35,67321087	106,2847601	99,24672556
MHDP	319,5988771	9,967239188	132,3981471	108,3386199
MHDP	323,092144	27,34850849	81,88568678	145,7547737
MHDP	300,2790607	23,0929105	129,5087564	127,5038937
MHDP	311,652601	24,6115372	114,5684835	93,30910998

APÊNDICE B**Valores de microdureza longitudinal de todos os espécimes da etapa *in vitro***

Grupos	PROFUNDID	HÍGIDO	1o DESAFIO	ICON	2o DESAFIO
DR	10 µm	170,4	24,2	0	0
DR	10 µm	286,2	213	0	0
DR	10 µm	166,6	11,2	0	0
DR	10 µm	109,3	31,65	0	0
DR	10 µm	245,75	25,35	0	0
DR	10 µm	283,75	107,9	0	0
DR	10 µm	315,55	55,5	0	0
DR	10 µm	324,6	36,2	0	0
DR	10 µm	293,25	99,4	0	0
DR	10 µm	324	44,6	0	0
DR	10 µm	259,5	64,2	0	0
DR	10 µm	289,5	35,6	0	0
DR	10 µm	351,35	209	0	0
DR	30 µm	369,2	112,6	0	0
DR	30 µm	243,2	284,65	0	0
DR	30 µm	363,35	69,8	0	0
DR	30 µm	195,25	176,75	0	0
DR	30 µm	305,25	89,45	0	0
DR	30 µm	342,15	224,05	60,02275202	0
DR	30 µm	260,15	168,1	0	0
DR	30 µm	353,85	125,35	0	0
DR	30 µm	265,85	180,2	0	0
DR	30 µm	311,4	183,1	0	0
DR	30 µm	284,25	183	0	0
DR	30 µm	341,2	211,5	0	0
DR	30 µm	330,5	319,55	0	0
DR	50 µm	419,9	333,25	154,55	0
DR	50 µm	346,8	301,45	228,7	0
DR	50 µm	415,55	134,4	0	0
DR	50 µm	262,25	241,1	108,9922446	0
DR	50 µm	273,85	208,7	140,1971401	0
DR	50 µm	370,05	327,15	257,5985349	0
DR	50 µm	311,15	217,4	0	0
DR	50 µm	318,35	269,85	169,7967358	0
DR	50 µm	284,95	235,1	52,91278194	0
DR	50 µm	311,4	261,15	36,20663102	0
DR	50 µm	313,35	175,5	58,71399723	0
DR	50 µm	356,4	334,85	273,8905597	0
DR	50 µm	336,5	321,95	0	0

DR	70 µm	367,65	351,4	319,55	0
DR	70 µm	335	309,7	282,35	0
DR	70 µm	354,3	131,55	131,85	0
DR	70 µm	271,55	273,1	325,3651679	0
DR	70 µm	282,6	244,05	393,194449	0
DR	70 µm	356,95	307,85	311,8309917	78,95169293
DR	70 µm	214,4	255,95	199,362215	0
DR	70 µm	310,7	288,65	191,1796086	0
DR	70 µm	293,5	281,25	242,2741222	0
DR	70 µm	313,2	311	391,0556242	0
DR	70 µm	264,5	275,75	333,2271267	48,3204315
DR	70 µm	370,6	371,6	340,5139208	0
DR	70 µm	339,15	335	145,2151564	0
DR	90 µm	385,55	348,95	326,3	184,45
DR	90 µm	317,75	245,75	343,4	0
DR	90 µm	382,1	367,4	217,9	0
DR	90 µm	242,4	342,5	360,1767631	0
DR	90 µm	289,6	274,3	369,2498155	0
DR	90 µm	286,2	316,95	369,3583512	209,068185
DR	90 µm	267,45	249,4	323,1759166	0
DR	90 µm	304,7	302,75	335,3810086	0
DR	90 µm	335,55	305,4	365,285233	0
DR	90 µm	342,05	319,45	406,3585344	389,6043108
DR	90 µm	294,1	309,25	374,193492	229,4421102
DR	90 µm	346,55	366,65	403,7184701	146,3596206
DR	90 µm	337,1	337,1	399,7095414	0
DR	110 µm	367,4	339,6	346,6	266,2
DR	110 µm	327	313,9	345,5	44,85
DR	110 µm	350,2	337,1	356,4	0
DR	110 µm	246,6	276	302,688164	101,5391838
DR	110 µm	279,2	263,05	371,6659547	19,35333826
DR	110 µm	325,9	314,6	319,5993892	371,099753
DR	110 µm	243,2	285,25	365,0773899	112,9794329
DR	110 µm	300,8	341,2	307,7441994	0
DR	110 µm	262,7	289,2	381,500687	101,8454036
DR	110 µm	361,5	353,05	406,7555952	412,9946338
DR	110 µm	232,9	323,75	358,3321987	276,4569919
DR	110 µm	344,55	359,65	390,2658521	215,0370918
DR	110 µm	324	332,85	406,2006778	0
DR	220 µm	314,6	319,45	257,05	320,3
DR	220 µm	356,95	321,75	319,45	312,8
DR	220 µm	337,1	368,9	371,9	337,2
DR	220 µm	331,75	318,35	290,405192	320,4009841

DR	220 µm	336	281,8	337,7345929	263,336968
DR	220 µm	317,55	276,1	293,8832083	302,8420219
DR	220 µm	316,05	285,1	244,4971883	227,713175
DR	220 µm	304,15	266,5	344,7548702	248,6456483
DR	220 µm	229,5	278,9	396,4262792	357,606591
DR	220 µm	380,2	344,1	390,5240547	341,9862545
DR	220 µm	330,7	285,45	406,1924977	372,4871396
DR	220 µm	348,9	328,1	401,5304209	424,9890679
DR	220 µm	334,85	338,55	292,4623908	315,2813159
MC	10 µm	278,95	239,6	0	0
MC	10 µm	309,25	261,15	0	0
MC	10 µm	288,35	280,95	0	0
MC	10 µm	359,05	288	0	0
MC	10 µm	267,4	159,7	0	0
MC	10 µm	209,15	275,6	0	0
MC	10 µm	295,4	279,2	0	0
MC	10 µm	178,0096353	33,93645961	0	0
MC	10 µm	102,9793191	51,96521447	0	0
MC	10 µm	80,39029019	29,20871936	0	0
MC	10 µm	141,7653855	22,71836679	0	0
MC	10 µm	260,2634761	35,85631756	0	0
MC	10 µm	35,73331183	33,3353297	0	0
MC	30 µm	349,75	251,75	46,08596643	4,855296286
MC	30 µm	315,25	330,35	0	0
MC	30 µm	354,3	268,15	0	0
MC	30 µm	368,9	317,25	12,70394318	0
MC	30 µm	309,15	197,8	16,66447806	0
MC	30 µm	253,4	297,45	34,7395583	0
MC	30 µm	276,45	294,05	3,149165487	0
MC	30 µm	334,6406059	38,07635855	11,68940259	0
MC	30 µm	324,95409	205,8017908	44,74304481	0
MC	30 µm	314,7952722	45,59147903	40,59994493	0
MC	30 µm	206,04993	30,6486433	0	0
MC	30 µm	314,2706807	42,77302868	31,26964259	38,30252391
MC	30 µm	108,7827155	69,94882175	0	0
MC	50 µm	369,2	330,35	125,7805969	41,53590167
MC	50 µm	333,25	326,85	63,3552586	0
MC	50 µm	354	287,45	20,2048063	17,66931702
MC	50 µm	363	310,7	178,3403865	0
MC	50 µm	297,45	269,75	170,1545926	0
MC	50 µm	288,65	276	94,21748969	0
MC	50 µm	269,15	291,75	44,10510073	0
MC	50 µm	356,788124	109,7996171	55,90248751	0

MC	50 µm	325,2896015	239,6768675	217,7277455	0
MC	50 µm	391,8118425	92,46834267	101,6957639	0
MC	50 µm	276,2797639	51,06699102	35,75156949	0
MC	50 µm	337,6005187	111,5600052	268,5451908	145,7764276
MC	50 µm	211,5786646	149,4144842	38,62618317	0
MC	70 µm	369,35	293,55	388,5192046	307,980442
MC	70 µm	314,15	354	200,3864946	0
MC	70 µm	359,65	266,1	293,4206616	124,3296282
MC	70 µm	412,55	320,7	420,8916146	0
MC	70 µm	323,25	325,15	348,4288722	0
MC	70 µm	311,15	290,5	368,4141245	40,84237174
MC	70 µm	318,8	267,75	341,0344688	0
MC	70 µm	327,3133737	253,9736093	327,879528	0
MC	70 µm	317,1341163	297,8880132	298,1240372	0
MC	70 µm	361,1278763	300,1685815	288,825333	0
MC	70 µm	233,6769282	151,5159365	176,1743537	29,15923403
MC	70 µm	314,7116987	257,8034991	300,8957607	382,2185448
MC	70 µm	272,2914651	355,7382499	311,2643258	0
MC	90 µm	321,25	313,2	356,0953945	370,4966001
MC	90 µm	344,15	319,65	352,0655763	0
MC	90 µm	441,7	294,8	331,0134863	319,9589036
MC	90 µm	391,2	339,85	349,339603	94,54824141
MC	90 µm	291,65	266,25	244,9960453	84,48200467
MC	90 µm	302,1	324	398,9891872	325,8827532
MC	90 µm	275,9	254,1	334,491787	4,689598787
MC	90 µm	337,334106	362,3652985	384,0647854	94,83375046
MC	90 µm	279,1214455	265,4342485	350,1012667	0
MC	90 µm	335,8086867	368,4342511	273,944735	0
MC	90 µm	318,5497125	306,2042413	208,1548385	51,48532515
MC	90 µm	290,9677882	306,6891815	334,1561221	363,7759208
MC	90 µm	314,0275118	341,800415	389,8342706	12,56120338
MC	110 µm	358,25	323,4	371,4733498	374,689681
MC	110 µm	337,4	294,45	307,1765307	0
MC	110 µm	302,85	260,3	294,8812788	358,4879633
MC	110 µm	364	307,3	361,4609872	354,4658078
MC	110 µm	296,45	317,4	341,4290725	236,5092648
MC	110 µm	362	262,1	378,1615047	371,0169582
MC	110 µm	242,9	281,55	276,9046715	45,32867952
MC	110 µm	339,3933433	343,5788149	367,308975	169,6421237
MC	110 µm	280,3566485	313,9556259	311,768647	51,95906071
MC	110 µm	323,7026803	250,1400783	296,8102742	0
MC	110 µm	355,9934128	319,7097246	252,7436264	153,882916
MC	110 µm	282,2882419	333,075725	356,3477616	343,9832575

MC	110 µm	365,285233	248,1430368	342,0096784	265,2660553
MC	220 µm	352	344,15	347,4259037	335,7220143
MC	220 µm	312,1	328,05	283,4610916	303,188453
MC	220 µm	352,1	247,7	263,8926478	296,1354343
MC	220 µm	354,05	336	376,7427201	348,0982141
MC	220 µm	216,45	266,55	345,336427	347,146375
MC	220 µm	225,65	289,95	339,0030577	296,996516
MC	220 µm	295,5	269,15	359,0775409	333,2770914
MC	220 µm	314,1023633	343,8960342	341,2263132	352,6472575
MC	220 µm	293,0442039	335,8257832	433,3119529	341,5881643
MC	220 µm	350,6761645	275,0490623	275,2112574	273,6370928
MC	220 µm	366,3850202	229,1999757	359,8865218	308,2141825
MC	220 µm	288,1332351	309,3187719	273,7706493	323,883636
MC	220 µm	345,362561	365,2486187	354,8365317	371,4605289
MHDP	10 µm	378,95	76,5	0	0
MHDP	10 µm	317,4	281,55	0	0
MHDP	10 µm	325,95	336,7	0	0
MHDP	10 µm	207,75	126,95	0	0
MHDP	10 µm	173,4	38,25	0	0
MHDP	10 µm	274,25	305,25	0	0
MHDP	10 µm	283,2	286,3	0	0
MHDP	10 µm	333,5	272,1	0	0
MHDP	10 µm	346,5	364	0	0
MHDP	10 µm	310,05	266,75	0	0
MHDP	10 µm	358,55	143,2	0	0
MHDP	10 µm	327,7	279,65	0	0
MHDP	10 µm	399,95	308,2	0	0
MHDP	30 µm	380,2	177,9	0	0
MHDP	30 µm	344,15	349,4	0	0
MHDP	30 µm	307,1	353,85	0	0
MHDP	30 µm	245,1	285,55	0	0
MHDP	30 µm	238,3	47,65	0	0
MHDP	30 µm	327	311,2	71,04538999	0
MHDP	30 µm	328,55	291,75	0	0
MHDP	30 µm	382,85	328,05	55,25058754	0
MHDP	30 µm	425,05	347,1	0	0
MHDP	30 µm	403,7	316,45	0	0
MHDP	30 µm	352,4	330,5	0	0
MHDP	30 µm	300,3	301,75	102,0479517	0
MHDP	30 µm	287,6	314,15	157,9838989	51,92774636
MHDP	50 µm	337,4	263,05	0	0
MHDP	50 µm	259,1	308,25	45,75747648	0
MHDP	50 µm	321,6	293,55	0	0

MHDP	50 µm	346,6	264,2	0	0
MHDP	50 µm	197,3	134,45	193,0490898	0
MHDP	50 µm	351,4	299,15	282,1682297	0
MHDP	50 µm	337,2	230,6	213,6244496	0
MHDP	50 µm	327,8	269,5	136,0291991	0
MHDP	50 µm	391,2	365,9	70,08900398	0
MHDP	50 µm	386,1	315,75	96,31898629	0
MHDP	50 µm	351,35	325,9	164,5688812	0
MHDP	50 µm	297,25	266,5	170,2940555	0
MHDP	50 µm	356,05	366,55	326,6483592	275,8611694
MHDP	70 µm	352,2	338,6	0	0
MHDP	70 µm	306,45	282,6	314,9313216	0
MHDP	70 µm	269,05	247,95	36,24060018	0
MHDP	70 µm	309,1	305,1	27,94692565	0
MHDP	70 µm	304,1	209,75	301,2563435	23,96744321
MHDP	70 µm	297,35	341,75	321,8158385	0
MHDP	70 µm	313,35	254	294,4011231	20,04819666
MHDP	70 µm	370,05	372,95	344,751001	0
MHDP	70 µm	394,1	336,5	254,428102	0
MHDP	70 µm	378,95	388,5	178,8170812	0
MHDP	70 µm	361,7	364,4	361,0559605	0
MHDP	70 µm	300,35	195,9	269,7165705	71,88199992
MHDP	70 µm	371,9	317,4	350,5170978	317,286024
MHDP	90 µm	322,25	316,95	69,79720147	0
MHDP	90 µm	321,95	310,5	395,4291603	0
MHDP	90 µm	272,05	185	212,7853253	0
MHDP	90 µm	353,55	270,35	173,9052581	0
MHDP	90 µm	213,9	245,5	267,9926013	161,2673396
MHDP	90 µm	378,4	359,3	347,0654941	90,28937047
MHDP	90 µm	337,1	251,05	347,2833091	253,5174308
MHDP	90 µm	336,7	333,25	405,2016683	50,37278371
MHDP	90 µm	379,9	369,35	413,7211826	0
MHDP	90 µm	344,25	339,6	300,8170448	0
MHDP	90 µm	366,3	349,1	401,3865581	0
MHDP	90 µm	307,3	232,6	333,4777482	222,8925073
MHDP	90 µm	388,35	304,2	389,3457861	317,1725835
MHDP	110 µm	341,8	311,6	235,747532	0
MHDP	110 µm	321,75	317,7	350,7982325	227,5707475
MHDP	110 µm	318,8	192,55	321,0973315	0
MHDP	110 µm	299,65	264,75	318,6269895	0
MHDP	110 µm	293,95	254,75	277,9254608	310,1038284
MHDP	110 µm	308,15	282,75	404,0866497	358,3599577
MHDP	110 µm	355,1	255,5	337,2946705	330,4585963

MHDP	110 µm	346,8	329	379,4293316	268,9057166
MHDP	110 µm	364,15	372,95	380,9213444	0
MHDP	110 µm	297,9	354,3	406,5953349	0
MHDP	110 µm	364,15	361,5	347,2377402	0
MHDP	110 µm	349,1	292,9	354,9268021	260,6407486
MHDP	110 µm	363	305,25	323,100695	379,9294865
MHDP	220 µm	374,55	354,3	305,0478257	338,5074373
MHDP	220 µm	255,1	323,1	318,9069819	373,0765753
MHDP	220 µm	243,9	188,7	338,8273912	178,95906
MHDP	220 µm	310,6	268,3	371,3024706	87,59341741
MHDP	220 µm	366,75	243,7	259,6499071	332,8743718
MHDP	220 µm	303,15	273,85	327,7802966	365,6648247
MHDP	220 µm	272,3	227,15	344,256502	220,7354223
MHDP	220 µm	308,2	307,55	351,5498938	306,9756716
MHDP	220 µm	334,5	340,2	367,2170457	391,7536707
MHDP	220 µm	361,35	301	359,8619803	408,9406498
MHDP	220 µm	327,25	342,35	418,3184172	409,1498324
MHDP	220 µm	391,9	317,5	207,3269443	198,7016745
MHDP	220 µm	339,6	317,25	333,7269795	418,3648186

APÊNDICE C

Valores de microdureza de superfície de todos os espécimes da etapa *in situ*

Espécimes	HÍGIDO	1o DESAFIO	ICON	2o DESAFIO
6	347,7321045	306,519648	118,5307962	45,50824086
7	315,8936216	49,74261993	141,2630105	54,34836781
10	326,5784259	101,0880266	47,21558701	71,49688019
11	302,4702199	263,9360147	103,2039917	207,9616365
12	338,4371812	56,76995137	100,0550788	54,0585347
13	313,8042009	186,3890441	144,6562393	125,1354091
14	305,7238354	187,3414345	115,9446153	71,61360135
15	315,9590764	82,8286617	127,7419371	68,30540744
16	324,3050112	68,15665613	146,0206561	39,82429305
18	351,3945897	347,7935456	165,6396694	68,35753495
22	312,8855997	169,5621827	135,638326	154,8844457
23	315,5985094	243,2509729	116,1332215	102,9476091
24	321,778216	226,182434	161,0322776	127,4917834
25	327,9077362	74,6733367	124,7178395	60,46791966
26	312,5524949	55,43139003	152,5477982	41,77591062
27	314,7691222	25,10025577	109,3785484	49,73749897
28	306,9202058	286,6048043	179,6400518	99,56365722
31	300,2017297	238,4555762	128,7280359	116,6039338
33	320,5900851	217,3139073	159,9504914	136,2937089
34	332,769571	247,3668332	181,5820291	144,7973849
35	327,30975	291,2901183	267,7646386	164,7273036
37	357,1482948	93,87508162	182,3130888	101,8676299
38	301,7168046	193,5327087	244,2668969	215,60005
40	307,0506209	229,1961302	151,9149003	142,0527871
41	318,4612967	299,0044811	128,0882525	130,6117004
46	321,5899105	78,13304489	142,4197957	60,11413576
47	314,9352683	102,4247202	206,5535568	62,47580051

APÊNDICE D**Valores de microdureza longitudinal de todos os espécimes da etapa *in situ***

Espécime	PROFUNDID	HÍGIDO	1o DESAFIO	ICON	2o DESAFIO
18	10 µm	281,0440756	317,1688136	0	0
46	10 µm	291,7531312	79,28942753	0	0
37	10 µm	359,2828583	129,6235854	0	0
40	10 µm	192,9387292	196,5454703	0	0
24	10 µm	244,4291148	226,4438651	0	0
33	10 µm	296,7630203	250,7548497	0	0
41	10 µm	244,9664409	254,4525523	0	0
31	10 µm	319,8193146	256,2889354	0	0
10	10 µm	281,7332631	107,8264059	0	0
12	10 µm	265,5991648	38,00816622	0	0
6	10 µm	254,4404538	241,5194723	0	0
35	10 µm	260,597767	239,7703668	0	0
16	10 µm	260,3517765	52,93522421	0	0
22	10 µm	243,1468778	127,036949	0	0
7	10 µm	302,2574366	17,23425853	0	0
14	10 µm	310,5143863	180,7595841	0	0
38	10 µm	279,4709309	175,4425351	0	0
27	10 µm	299,1009533	20,99778181	0	0
26	10 µm	289,1120265	47,24955199	0	0
28	10 µm	282,1846059	273,5050997	0	0
34	10 µm	280,1157169	201,5483192	0	0
13	10 µm	308,1758792	200,6327649	0	0
10	10 µm	309,2220826	37,47872478	0	0
17	10 µm	267,1515313	18,28260449	0	0
47	10 µm	294,0037585	88,37700529	0	0
15	10 µm	298,4198322	47,47654479	0	0
11	10 µm	308,6765899	241,7124016	0	0
21	10 µm	281,7149893	20,61792797	0	0
23	10 µm	292,7004084	230,417223	0	0
45	10 µm	290,312559	17,43507939	0	0
18	30 µm	375,1751319	344,5800849	308,9286187	344,310409
46	30 µm	362,3652985	141,952958	304,1008843	212,1028725
37	30 µm	364,571002	169,744323	0	0
40	30 µm	364,6717505	296,7073433	0	0
24	30 µm	352,4083993	327,8251755	320,4013823	285,0439236
33	30 µm	330,8257832	280,2078165	0	0
41	30 µm	321,1637206	321,1637206	337,1877456	286,9051487
31	30 µm	319,2922683	312,6264079	313,6200601	283,1725219
10	30 µm	319,1686939	162,9519078	0	0

12	30 µm	337,1963643	53,7920112	0	0
6	30 µm	311,6032755	265,4945252	161,3226866	93,01772076
35	30 µm	333,7379001	289,9638318	0	0
16	30 µm	329,6967271	72,56030462	0	0
22	30 µm	333,1345944	136,7808371	182,817686	152,9016216
7	30 µm	367,7792357	25,97056846	0	0
14	30 µm	330,6324274	227,000368	0	0
38	30 µm	303,5428051	234,6430295	0	0
27	30 µm	310,9905085	43,64586348	0	0
26	30 µm	301,9692826	90,06003132	0	0
28	30 µm	307,3173852	301,9416375	270,438102	211,7445537
34	30 µm	326,4919212	214,123778	0	0
13	30 µm	352,2814745	230,6245609	182,9152542	0
10	30 µm	311,0931647	56,59805309	0	0
17	30 µm	303,4033239	32,59019336	0	0
47	30 µm	316,7419375	117,0157724	0	0
15	30 µm	317,8906808	77,47966553	0	0
11	30 µm	301,3708348	289,3950674	0	0
21	30 µm	301,4534606	37,7281179	0	0
23	30 µm	299,6066482	247,1862921	0	0
45	30 µm	325,695955	31,99393119	0	0
18	50 µm	397,3586367	363,3442136	295,521422	353,0930579
46	50 µm	336,9860356	161,586606	293,5394002	282,95295
37	50 µm	372,5712813	331,1131722	260,8824088	170,1899957
40	50 µm	359,2241829	302,5296373	337,9529364	318,7297186
24	50 µm	355,517131	314,9299523	350,4074023	296,1295497
33	50 µm	330,4585963	306,1169521	326,9889937	279,2626589
41	50 µm	320,4388618	328,3549842	334,4210799	306,743926
31	50 µm	320,5011378	314,8275963	315,9965212	302,46777
10	50 µm	310,7320997	223,211923	261,1440167	253,4551954
12	50 µm	343,6101327	84,84547037	165,3676395	115,7473272
6	50 µm	335,8856288	306,3656786	306,2590541	221,9549376
35	50 µm	331,7383688	304,5176711	327,6515765	300,7656111
16	50 µm	335,8257832	133,9855446	167,9444482	140,8108597
22	50 µm	331,0467112	232,1960804	242,5185297	177,4389429
7	50 µm	381,5815211	37,27594527	179,6459035	66,52672838
14	50 µm	345,2012307	270,1437629	289,4215018	143,061731
38	50 µm	303,1350231	260,2671758	269,9699755	267,6805304
27	50 µm	312,9325426	136,7977738	0	0
26	50 µm	323,9105426	182,8002135	282,9840507	60,9604293
28	50 µm	299,0525388	314,7374783	310,3813638	275,5301912
34	50 µm	302,1075499	243,0867114	295,7405776	297,2885126
13	50 µm	350,2121687	296,2093305	301,3708348	322,4301512

10	50 µm	329,7255653	124,0749326	115,907102	114,8019244
17	50 µm	323,7119015	25,48266337	0	0
47	50 µm	324,3585989	170,2426953	297,9538027	151,0424078
15	50 µm	317,879191	188,3053323	293,8614316	208,2865437
11	50 µm	304,9164634	297,8932612	325,8045199	213,2540186
21	50 µm	316,6659259	68,20699341	0	0
23	50 µm	309,8631119	282,9923885	308,2141825	196,9388077
45	50 µm	363,6508111	71,69263065	0	0
18	70 µm	375,8851969	354,6752388	322,6037779	339,2886106
46	70 µm	329,7967932	246,0714911	356,3069031	317,4539387
37	70 µm	334,2449107	358,6243191	357,3772046	194,8888171
40	70 µm	342,8250789	307,9373115	323,6880737	323,1323924
24	70 µm	365,4268668	320,99983	353,824652	315,3462689
33	70 µm	319,215028	321,0933743	343,5788149	321,2028092
41	70 µm	325,2896015	333,7716742	349,4522274	319,1686939
31	70 µm	321,0855591	329,6761301	323,1323924	317,8906808
10	70 µm	318,5373782	276,5815625	280,1899626	272,4910124
12	70 µm	336,5304227	121,9556201	218,0551196	176,4796668
6	70 µm	334,5991648	320,5361739	314,2706807	253,8905658
35	70 µm	326,9889937	321,9245625	335,8514299	313,5082933
16	70 µm	352,4083993	181,9518051	215,5342325	184,2177814
22	70 µm	320,5011378	301,5430003	303,1768188	256,5238034
7	70 µm	368,4959963	165,2657138	227,1753308	99,71526137
14	70 µm	346,5831565	305,5220144	311,0271671	192,705669
38	70 µm	310,3704104	297,7397463	300,9302333	280,7290778
27	70 µm	335,9796957	252,8347746	320,0752795	226,0811739
26	70 µm	342,1293488	295,2512634	346,6423236	164,8808768
28	70 µm	303,7230229	311,0564974	317,2478753	305,5220144
34	70 µm	324,3785368	233,8361416	323,8072323	313,4859453
13	70 µm	343,556447	326,9889937	311,632718	333,0504988
10	70 µm	308,5392969	144,5695996	212,2256381	191,9980058
17	70 µm	313,6200601	52,33061919	103,6765913	38,53145794
47	70 µm	313,5380935	246,3192095	310,3704104	248,5192633
15	70 µm	323,6880737	256,1994058	320,6296244	262,6530412
11	70 µm	312,8991487	308,5537295	342,4711359	318,9375913
21	70 µm	310,0159509	145,285181	288,9138764	29,0206772
23	70 µm	326,685827	326,4434647	309,1557148	222,6592731
45	70 µm	333,7505649	133,7194442	199,8599966	22,47660236
18	90 µm	397,0239129	347,1890118	390,1104216	372,4608497
46	90 µm	353,0930579	328,4203688	348,7984905	335,8001388
37	90 µm	340,0017607	356,1217995	360,7106551	203,6132279
40	90 µm	366,1410838	347,9467791	349,3550728	358,5512642
24	90 µm	374,9086783	328,3345545	340,0765231	339,5636107

33	90 µm	340,6731156	318,5219965	349,410586	330,508252
41	90 µm	329,6967271	337,9529364	362,1564445	334,2449107
31	90 µm	329,6596535	327,0011515	329,038164	329,6637726
10	90 µm	321,2028092	314,3588318	311,632718	282,9923885
12	90 µm	331,7383688	268,9148333	216,9004878	230,7246239
6	90 µm	337,888022	333,0504988	333,7379001	327,7329675
35	90 µm	325,0812921	321,0933743	333,8856898	321,0933743
16	90 µm	344,9789608	267,2137573	273,0714997	274,9622178
22	90 µm	353,95278	324,4064522	321,1637206	312,2640337
7	90 µm	371,0169582	214,099815	258,8665067	162,5335518
14	90 µm	342,8250789	331,1588727	326,7666589	255,2140554
38	90 µm	310,3996205	313,4859453	316,7001286	304,9305591
27	90 µm	332,371506	329,4405269	314,180899	286,186756
26	90 µm	344,2654859	339,9976494	321,9245625	296,2512931
28	90 µm	313,4710476	319,215028	325,2254905	309,7758129
34	90 µm	325,0092195	293,9007092	335,1255069	319,8038088
13	90 µm	319,3424856	336,5991037	327,6759914	336,1850342
10	90 µm	312,2196934	228,702656	271,8899923	283,3982268
17	90 µm	298,4442042	138,1399497	150,3829483	105,1775103
47	90 µm	326,6130973	301,9416375	310,3996205	289,9319698
15	90 µm	326,9889937	311,632718	315,436741	298,4442042
11	90 µm	298,4610836	321,0933743	306,1524708	325,6637954
21	90 µm	325,1213401	183,1622515	308,5753798	35,42474527
23	90 µm	314,7900436	327,0011515	321,7479502	242,2919222
45	90 µm	366,3087707	209,2059796	264,1341458	52,22056793
18	110 µm	384,873163	376,7427201	385,8008144	376,5244845
46	110 µm	323,1323924	363,3357468	319,8064445	337,6621379
37	110 µm	354,9613362	337,3170518	375,7139527	286,3789049
40	110 µm	355,588955	374,8873711	332,3840673	342,4711359
24	110 µm	363,7709397	347,9146659	344,3912872	354,5894595
33	110 µm	333,2860259	335,1765899	346,4193677	323,7675074
41	110 µm	329,0709895	342,1293488	354,5418143	336,8276167
31	110 µm	329,0135473	320,4738904	324,3785368	340,1203507
10	110 µm	334,4210799	330,3427654	317,286024	319,1879989
12	110 µm	347,7498794	326,3465757	322,2640337	328,3549842
6	110 µm	329,3583676	338,5926614	337,4981731	332,434318
35	110 µm	327,6597146	327,0497877	338,5839712	321,7361798
16	110 µm	342,9141835	322,050219	335,8514299	320,5361739
22	110 µm	352,3331166	338,6100426	335,1467904	335,1255069
7	110 µm	369,2343133	246,3147533	291,9191115	285,5740783
14	110 µm	366,8597857	345,6969089	347,1737818	296,2093305
38	110 µm	322,5010767	312,2418627	317,879191	319,8735911
27	110 µm	341,4025652	335,8001388	326,6130973	313,2889906

26	110 µm	331,0259452	384,873163	335,8001388	330,4585963
28	110 µm	317,9711224	312,2418627	328,3345545	326,3304306
34	110 µm	347,1555103	303,7230229	320,9101577	314,7900436
13	110 µm	325,7602849	331,7383688	333,0504988	323,0967865
10	110 µm	311,7799772	308,0772956	297,1414598	291,3919436
17	110 µm	312,2935978	250,5736352	236,5750825	177,670217
47	110 µm	319,8193146	316,7419375	309,7539924	309,1557148
15	110 µm	309,7758129	331,7717352	308,5392969	324,0456959
11	110 µm	331,0467112	308,5392969	311,632718	337,1877456
21	110 µm	326,3707949	243,6736118	301,3501823	100,8440467
23	110 µm	354,6275808	319,8193146	335,2617475	298,4610836
45	110 µm	338,0395106	264,2106564	312,879191	105,8294612
18	220 µm	363,7408523	357,3472456	375,0365498	324,2127365
46	220 µm	371,6450145	310,3996205	344,2654859	350,7982325
37	220 µm	392,707034	346,4921521	353,1308581	349,112052
40	220 µm	337,9918918	359,8472563	343,0746366	340,7111243
24	220 µm	362,6041527	349,7123802	341,5351246	361,4609872
33	220 µm	336,5604687	332,4720116	339,9976494	332,706656
41	220 µm	333,0757548	351,5498938	362,1663869	337,110408
31	220 µm	329,6761301	325,0092195	328,9971373	335,8086867
10	220 µm	325,1694049	337,1877456	326,9889937	319,7960563
12	220 µm	346,5831565	343,6504031	336,5304227	329,0931338
6	220 µm	333,176651	344,256502	347,2377402	345,7240873
35	220 µm	335,8001388	330,3344935	334,4295577	331,0467112
16	220 µm	344,2654859	337,1963643	335,1255069	340,7331233
22	220 µm	348,660254	338,5839712	337,9226413	326,9889937
7	220 µm	372,4608497	341,4909317	344,3463523	326,3707949
14	220 µm	367,6444789	359,106864	356,8121513	346,4239162
38	220 µm	318,6296855	319,1571115	321,0855591	325,0812921
27	220 µm	330,3841284	327,7004084	323,0967865	325,3617432
26	220 µm	318,5219965	363,0109984	332,706656	353,0647107
28	220 µm	338,6100426	333,075725	335,1255069	331,0467112
34	220 µm	324,7702301	321,7361798	321,1090053	331,7133465
13	220 µm	337,888022	324,4862251	342,1515313	337,3170518
10	220 µm	333,2271267	317,286024	321,0933743	327,7004084
17	220 µm	326,3304306	291,1027746	278,0658688	300,7656111
47	220 µm	315,210918	321,0855591	318,5219965	332,4050041
15	220 µm	326,3223584	333,7716742	324,4064522	319,2922683
11	220 µm	309,1557148	335,8257832	343,1459758	343,556447
21	220 µm	323,1323924	307,3388638	315,3575764	314,2220454
23	220 µm	341,7208038	328,5184728	330,417223	331,1131722
45	220 µm	333,1345944	308,8538471	331,6883262	302,3618508