**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**

Tania Coelho Rocha Caldeira

Tratamento preventivo do esmalte dental desmineralizado: estudo "in vitro"

**Ribeirão Preto
2014**

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Tratamento preventivo do esmalte dental desmineralizado: estudo *in vitro*

Tania Coelho Rocha Caldeira

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

Versão corrigida

Programa: Odontologia Restauradora - Área de
concentração: Odontologia Restauradora Opção:
Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb

Ribeirão Preto

2014

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

Ficha Catalográfica Preparada pela Seção de Tratamento da Informação
do Serviço de Biblioteca e Documentação. Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Caldeira, Tania Coelho R

Tratamento preventivo do esmalte dental
desmineralizado: estudo *in vitro*. Tania Coelho Rocha
Caldeira; Ribeirão Preto, 2014

94 p: il., 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Odontologia Restauradora – Opção: Dentística.

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa

Orientadora: Palma-Dibb, Regina Guenka

1. CPP-ACP, 2. Flúor, 3. Prevenção, 4. Cárie dentária,
5. Microscopia Confocal a Laser.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tania Coelho Rocha Caldeira

Tratamento preventivo do esmalte dental desmineralizado: estudo *in vitro*.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. **Área de concentração:** Odontologia Restauradora.

Aprovado em: 03/ 10/ 2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Regina Guenka Palma Dibb

Presidente

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Mazzetto

Membro

Instituição: FORP – USP

Assinatura _____

Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri

Membro EXTERNO

Instituição: UNIUBE

Assinatura: _____

Prof. Dr. Neilor Mateus Antunes Braga.

Membro EXTERNO

Instituição: UNIMONTES

Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandra Mussolino de Queiroz

Membro

Instituição: FORP - USP

Assinatura: _____

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha família construída segundo o propósito de Deus sempre orientada por Sua Palavra. “Ensina a criança no caminho em que deve andar, e ainda quando for velho não se desviará dele”

Hino predileto da Família e cantado em todas as ocasiões especiais

O Deus Fiel

1. Tu és fiel, Senhor, ó Pai celeste,
Teus filhos sabem que não falharás!
Nunca mudaste, Tu nunca faltaste,
Tal como eras Tu sempre serás

*Tu és fiel, Senhor! Tu és fiel, Senhor!
Dia após dia, com bênçãos sem fim,
Tua mercê nos sustenta e nos guarda;
Tu és fiel, Senhor, fiel assim.*

2. Flores e frutos, montanhas e mares,
Sol, lua, estrelas brilhando no céu,
Tudo criaste na terra e nos ares,
Para louvar-te, Senhor, que és fiel.
3. Pleno perdão Tu dás! Que segurança!
Cada momento me guias, Senhor,
E no porvir, oh! Que doce esperança
Desfrutarei do teu rico favor. Amém.

(T. O. Chisholm, J. Sutton, L. Bueno e H. G. Silva)

Em especial,

Aos meus filhos

Luiz Alfredo Coelho Caldeira e Carlos Guilherme Coelho Caldeira,

alegria de minha vida! Presentes de Deus! Vocês são meu orgulho. Vejo em vocês a herança que recebi. Verdade, Fé, responsabilidade com a vida, seriedade e bom caráter, espero que vocês sejam muuuiiito melhores do que eu. Vão longe... Deus os abençoe!

Ao meu esposo

Luiz Carlos Rocha Caldeira, escolhido de Deus para mim. Há 30 anos (Bodas de Pérola) companheiro fiel, pai de meus filhos, porto seguro. Uma jornada de convivência e aprendizado de vida, que ainda vai longe... " ♪♪ velhinhos enamorados... enamorados velhinhos... ♪♪♪♪."

" Olhando seus lindos cabelos que a neve do tempo pintou eu guardo comigo a lembrança e nada parece mudou... ♪♪

... ♪♪♪♪. estava vestida de branco sorrindo e querendo chorar...O meu coração não pode compreender porque a vida é tão pequena para tal amor. ... ♪♪♪♪ "

Aos meus pais,

Dealtagnan Azevedo Coelho, grande homem, estudioso, sábio e simples . Exemplo de vida e de trabalho. Educou-nos de forma firme e serena. Soube amar e ensinar com seus exemplos. Sempre apostou que os filhos seriam melhores do que ele... como se isto fosse possível !!!

Sebastiana Ruella Coelho, mãe extremosa e cândida, forte, mas delicada e sensível, porto seguro sempre, colo fofo e graaannde para tantos filhos. Mulher de fé e temente a Deus, de visão, à frente do seu tempo. Afagou nossos sonhos e sempre confiou e nos assegurou que um dia iríamos realiza-los. E a cada conquista se alegrou e dizia não a surpreender: "*eu já sabia...*"

Aos meus irmãos

Telma Ruella Coelho, irmã amada, boa, meiga, dedicou sua vida como missionária. Minha referência de vida de trabalho e dedicação ao servir. Me incentivou a estudar e manteve meus estudos, no período da faculdade, antes de escolher a missão.

Elba Coelho Gonçalves amiga, exemplo de mãe que adicional à família seu esposo Valdir Gonçalves (cunhado querido) e seus filhos Alex, Felipe e Flávia, sobrinhos amados que me fizeram tia avó com Gabriela e Beatriz de Flavia e Gustavo, Izabel e Sara (a caminho) de Felipe e Cinthya e Emanuelle de Alex e Joelma.

Nei Coelho irmão do coração de referência, que cuida ainda de mim como irmão mais velho, sempre protegendo, agora curtindo netos João Guilherme e Ana Lívia, com a esposa Dircinha.

Rui Coelho "família", irmão querido, sempre se dedicou a visitar os parentes, mesmo os mais distante. Dedicou sua vida ao serviço de Deus como pastor presbiteriano. Agregou à família sua esposa amada Reinilde e seus filhos queridos, Ruy, Lukas e Ester.

Túlio Coelho irmão mais novo, firme decidido, vencedor e amoroso. Tenho orgulho de você querido e de Rosângela cunhada amada. Como todos nos orgulhamos dos filhos eles enchem os olhos com Túlio Jr. e Amós.

À **Maria Amélia Campos**, pequeno frasco do bom perfume de Cristo. Segunda esposa, alegrou o coração do meu pai. Felizes para sempre...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb**, exemplo de trabalho, dedicação, competência, inteligência e honestidade. Agradeço por ter aceitado essa orientação me recebendo de braços abertos e também pela oportunidade enorme de aprendizado.

À **Dra Juliana Jendiroba Faraoni Romano**, pela contribuição deste trabalho e pela disponibilidade em todos os momentos. Agradeço a dedicação e, em especial, a amizade e acolhida, as caronas, muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**, por ter acreditado no Dinter USP/UNIMONTES e por ter feito toda diferença no Norte de Minas.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Oliveira Mazzetto**, pela motivação, respeito e dedicação à nossa turma.

Ao **Prof. Dr. Neilor Mateus Antunes Braga**, por ter aproximado a Unimontes/FORP, nosso diálogo no DINTER.

Ao doutorando **Prof. Manoel Brito Júnior**, por ter sido nossa referência no DINTER.

À colega e amiga **Júlia Olien Sanches** por estar sempre perto, ajudando, dando dicas, aliviando as tensões com expressões, “vai dar tudo certo”, e deu!!!

À **Vanessa Fonseca Leite**, minha amiga de perto, quase minha filha, sempre presente.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Digníssimo Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** e pela Vice-diretora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À Coordenação Geral da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo na pessoa do **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**.

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Ricardo Gariba Filho**.

À Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**.

Aos Professores membros da banca do meu exame de qualificação de doutorado, **Profa. Dra. Juliana Jendiroba Faraoni Romano** e **Prof. Dr. Marcelo Oliveira Mazzetto**.

Aos professores que estarão presentes na minha defesa de tese de doutorado.

Aos professores do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial àqueles envolvidos no desenvolvimento do DINTER FORP-USP/UNIMONTES, por terem enfrentado a distância, diferenças regionais,

dificuldades, para partilhar conosco os conhecimentos, experiências e nos motivar para a pesquisa e extensão: **Antônio Miranda da Cruz Filho, Jesus Djalma Pécora, Luiz Carlos Pardini, Luiz Pascoal Vansan, Manoel Damião de Sousa Neto, Marcelo Oliveira Mazzetto, Regina Guenka Palma Dibb, Simone Cecilio Hallak Regalo e Silvio Rocha Correa da Silva.**

Aos colegas de pós-graduação do DINTER FORP-USP/UNIMONTES: **Adrianne Calixto Freire de Paula, Agnaldo Rocha de Souza Júnior, Altair Soares de Moura, Carla Cristina Camilo Araújo, Cássia Pérola dos Anjos Braga Pires, Deícola Coelho Filho, José Mendes da Silva, Manoel Brito Júnior,** e de forma especial **Soraya Mameluque Ferreira**, amiga, companheira de estrada com quem compartilhei todas as vindas a Ribeirão. Obrigada pela amizade, compreensão, ânimo nos momentos da “dureza”.

Ao **Carlos Feitosa dos Santos**, secretário do Curso de Pós-graduação em Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À **Isabel Sola e Regiane Sacilotto**, secretárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À técnica **Patrícia Marchi**, do Laboratório de Pesquisa em Dentística da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao reitor da Universidade Estadual de Montes Claros, UNIMONTES Prof. **João dos Reis Canela**, por incentivar a qualificação dos docentes da universidade.

Aos colegas das disciplinas Clínica Integrada I e da Clínica de Adequação do Meio do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes: **Ana Elizabeth Martins Antunes de Melo, Carlos Alberto Quintão Rodrigues, Desirée Sant’Ana Haikal, Gislaine Conceição Teixeira Pereira e Maia, Maria Cleonice de Oliveira Nobre, Maria Florisana Lopes de Sena e**

Almeida, Mânia de Quadros Coelho Pinto, Neilor Mateus Antunes Braga, Soraya Mameluque Ferreira, Vânia Julieta de Araújo Barros, pelo incentivo e apoio determinantes à minha busca por qualificação profissional.

Às minhas queridas companheiras de **SAF Sociedade Auxiliadora Feminina da IPB**, por estarem acompanhando esta jornada, me animando, protegendo e fortalecendo-me com suas orações.

Aos queridos amigos **Gilmara e Delvio, Fernando e Keila, Denoel e Miriam Andrade**, por estarem sempre perto.

À **CAPES e FAPEMIG** pelo apoio financeiro e pela oportunidade do DINTER FORP-USP/UNIMONTES.

Ao leitor que se dedica a ler esta obra, pelo interesse e possibilidade de disseminação do trabalho realizado.

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

EPÍGRAFE

***“ Mas a vereda dos justos é como a luz
da aurora que vai brilhando mais e mais
até ser dia perfeito”***

Salomão Prov 4.18

RESUMO

Caldeira, Tania C.R. Tratamento preventivo do esmalte dental desmineralizado: estudo *in vitro*. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2014.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar “*in vitro*” diferentes tratamentos na remineralização do esmalte desmineralizado em situação de alto desafio cariogênico. Foram obtidos 55 blocos de esmalte de dentes bovinos com dimensões de 4x4x2mm, que tiveram sua superfície planificada e polida. Metade da superfície foi protegida com resina, antes da formação de lesão de mancha branca, mantendo-a íntegra. Para a formação da lesão de desmineralização os blocos foram imersos em solução tampão de acetato por 43h. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: controle (sem tratamento), Verniz Duraphat; Flúor gel; Mi Paste e Mi Paste Plus. Todas as superfícies desmineralizadas receberam tratamento, com os seus respectivos produtos, 1x/semana durante 3 semanas. Nos intervalos das aplicações os espécimes foram submetidos a ciclos de pH num total de 21 dias. Antes da desmineralização, após, em seguida à 1ª aplicação e ao final dos 21 dias de ciclagem foram obtidas imagens da superfície e análise da rugosidade superficial, e morfologia por meio de Microscopia Confocal a Laser, ao final a resina que protegia a área controle foi removida e capturada uma nova imagem para análise do perfil de desgaste. Os dados foram analisados quanto a sua distribuição e verificada a normalidade e a homogeneidade da distribuição amostral, foi realizada Análise de Variância e teste de tukey ($p < 0,05$). Pode-se observar que tanto para a rugosidade superficial como para o perfil de desgaste os grupos estudados apresentaram resultados similares entre si ($p > 0,05$). Na rugosidade superficial observou-se que apenas no verniz ocorreu um aumento significativo de rugosidade com o tempo ($p < 0,05$). Na morfologia pode-se observar uma topografia irregular que foi mais evidenciada ao término da ciclagem, tendo o controle e os Mi Paste (convencional e plus) apresentado perda de estrutura mais evidente. Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que nenhum tratamento preventivo isolado foi efetivo para paralisação do desenvolvimento da lesão de cárie que foi agravado com o tempo de exposição ao processo DES-RE.

Palavras-Chaves: CPP-ACP, Flúor, Prevenção, Cárie dentária, Microscopia Confocal a Laser.

ABSTRACT

Caldeira, Tania C.R. Preventive treatment of demineralized enamel: an in vitro study. [Doctorate Thesis]. Ribeirao Preto: Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2014.

The aim of this study was to evaluate, in vitro, different treatments in previously demineralized enamel in a high cariogenic challenge. 55 enamel slabs of bovine teeth with dimensions of 4x4x2mm were planned and polished surface. Half the surface was protected with resin before the formation of white spot lesions, and half stay sound. For the formation of the demineralization challenge the blocks were immersed in acetate buffer solution for 43h. The specimens were randomly divided into 5 groups: control (no treatment), Duraphat; Fluoride gel; Mi Paste and Mi Paste Plus. All demineralized surfaces were treated with their respective products, 1x/week for 3 weeks. During intervals among applications specimens were subjected to pH cycles in a total of 21 days. Before demineralization, after the first application and after 21 days of cycling were obtained images of surface and it was analyzed for surface roughness and morphology by 3D Confocal Laser microscope, the end the resin protecting the control area was removed and a new image captured for analysis of the wear profile. Data were analyzed for distribution and checked for normality and homogeneity of the sampling distribution, it was performed analysis of variance and Tukey test ($p < 0.05$). It can be seen that both the surface roughness and profile for the wear groups had similar results ($p > 0.05$). Surface roughness was observed only in the duraphat showed a significant increase in roughness with time ($p < 0.05$) occurred. Morphology can be observed an irregular topography that was more evident at the end of cycling, it had been control and Mi Paste (conventional and plus) presented more evident loss of structure. Based on the results obtained in vitro can be concluded that no preventive treatment alone was effective in paralyzed the development of caries lesion. The integrity of enamel surface was deteriorated with time of exposure in DES-RE process.

Keywords: CPP-ACP, Fluoride, Prevention, dental caries, Confocal Laser.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da metodologia utilizada no preparo das amostras.....	48
Figura 2. Representação esquemática da metodologia utilizada na seleção do espécime por meio da microdureza	49
Figura 3. Representação esquemática da metodologia utilizada na seleção do espécime análise da rugosidade superficial	51
Figura 4. Representação esquemática da metodologia utilizada na aplicação dos tratamentos propostos.....	54
Figura 5. Representação esquemática da metodologia utilizada na ciclagem de pH.....	55
Figura 6. Imagem obtida no microscópio confocal a laser demonstrando as 10 mensurações do perfil de desgaste.....	56
Figura 7. Análise da rugosidade superficial do fator tratamento.....	61
Figura 8. Análise da rugosidade do fator tempo	62
Figura 9. Interação dos fatores tempo e tratamento por grupo	62
Figura 10. G1- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1ºT) e após ultimo tratamento (PT)	65
Figura 11. G2- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1ºT) e pós último tratamento (PT)	66
Figura 12. G3- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1ºT) e pós último tratamento (PT)	67
Figura 13. G4- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD) primeiro tratamento (1ºT) e pós último tratamento (PT)	68
Figura 14. G5- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1ºT) e pós último tratamento (PT)	69
Figura 15. Imagens confocal de um espécime em maior aumento dos diferentes grupos, tempos: inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1ºT) e pós último tratamento (PT).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamento preventivo empregado nos diferentes grupos.....52

Tabela 2. Médias (μm) e desvios padrões da rugosidade da superfície em cada grupo63

Tabela 3. Médias (μm) e desvios padrões do perfil de desgaste de cada grupo63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 PROPOSIÇÃO	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Delineamento experimental.....	47
3.2 Obtenção dos espécimes	47
3.3 Microdureza superficial Inicial	48
3.4 Análise Morfológica e Rugosidade Superficial	50
3.5 Desmineralização Inicial.....	51
3.6 Tratamento dos espécimes	52
3.7 Ciclagem de pH.....	54
3.8 Perfil de desgaste.....	56
3.9 Análise dos Dados	57
4 RESULTADOS.....	61
4.1 Rugosidade Superficial.....	61
4.2 Perfil de desgaste.....	63
4.3 Análise morfológica	64
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma das afecções de maior prevalência na cavidade bucal. Sua natureza multifatorial e crônica, está relacionada a um desequilíbrio entre a estrutura dentária e o meio bucal determinado pela interação entre microbiota (Guirado et al., 2006; Leites, Pinto, Souza, 2006), dieta e hospedeiro, acrescido do fator tempo (Soares, Valença, 2003; Souza-Gabriel, 2009). Todos esses fatores desempenham um papel no processo dinâmico da desmineralização e remineralização que ocorre na superfície dentária (García-Godoy, Hicks, 2008). Assim, a lesão de cárie é o resultado da dissolução química dos tecidos duros dos dentes provocada por produtos da degradação bacteriana (Leites, Pinto, Souza, 2006).

Nos últimos anos, avanços científicos no conhecimento da patogênese e prevenção de doenças bucais levaram a um melhor manejo da doença cárie, tornando a manutenção da saúde bucal mais eficiente. Além disso, percebe-se também uma tendência de polarização da doença (Seppä, 2001), situação em que menos pessoas tem a doença e com maior número de lesões.

Diversas terapias preventivas são enfatizadas na literatura no intuito de eliminar ou paralisar lesões de cárie incipientes em esmalte, tais como as que envolvem o uso de fluoretos que diminuem a desmineralização e promovem a remineralização da superfície dentária. Estudos de (Reynolds, 1991, 1997; Pulido et al., 2008; Robertson et al., 2011; Melo, 2012), vêm indicando um produto para prevenção de cárie sem a presença de flúor. Essa substância é derivada da caseína fosfopéptido (CPP), proteína derivada do leite que atua na estabilização dos íons cálcio e fosfato e que resulta na formação de um complexo semelhante ao fosfato de cálcio amorfo.

O Recaldent representado pelo grupo de fosfopeptídeos de caseína (CPP) estabiliza o cálcio e o fosfato, mantendo-os em uma forma amorfa, solúvel e biodisponível, conhecida como ACP. Quando este complexo de fosfato de cálcio peptídeo chega até os dentes através de uma goma de mascar ou leite (Freitas et al., (2001); Cai, et al., (2009); Antunes, Reis (2012); ou outros produtos à base de CPP-ACP

(Azarpazhoo, 2008; Reynolds, 2008) principalmente pastas,(Oshiro et al., 2007; Robertson, 2011; Sitthisettapong et al., 2012), os peptídeos aderem à superfície dos dentes e efetivamente fornecem a ela um reservatório solúvel de cálcio e fosfato, sendo estes, agora, capazes de se difundirem pelo dente e de permanecerem no biofilme bacteriano por até três horas (Freitas et al., 2001, Cai et al.,2009; Antunes, Reis 2012). Outro produto que surgiu no mercado com este princípio ativo, é o verniz MI Varnish (Cochrane et al., 2014) que apresenta o perfil de liberação de íons mais promissor, já que, mostrou ter mais alta liberação de íons cálcio e fluoreto, sendo que libera substancialmente mais cálcio do que o Duraphat.

Atualmente, para se realizar uma odontologia de mínima intervenção, é necessário enfatizar a promoção e prevenção em saúde bucal, com o esforço de reduzir o risco da evolução da cárie, para que não haja formação de cavidade; porém, se esta já estiver presente, devem ser utilizadas técnicas e procedimentos que preservem a estrutura dentária (Melo, 2012). Se a cárie evoluir para um estágio mais avançado, pode causar dor, perda de função, estética modificada , endodontia e dessa forma, interferir na participação e concentração da criança na escola, podendo influenciar negativamente nas suas condições psicológicas e emocionais.

Apesar do declínio na incidência e prevalência da cárie dentária, a doença é ainda o principal problema de saúde bucal dos brasileiros e alguns grupos populacionais, como crianças e adolescentes (Ministério da Saúde, 2010), ainda são considerados de alto risco. É considerada uma das doenças crônicas mais prevalentes em adultos e crianças no mundo (Featherstone, 2000).

Lesão de Mancha Branca

Os dentes ao se irromperem na cavidade bucal são imediatamente cobertos por uma película adquirida, que consiste em uma camada protetora acelular de composição proteica. Essa película permanece continuamente presente na superfície dos dentes e é formada imediatamente após a escovação ou limpeza profilática profissional; torna-se base sobre a qual se forma o biofilme dental (Amaechi et al.,1999; García-Godoy, Hicks, 2008). Com o passar do tempo, e na contínua exposição aos fatores, o biofilme passa a ser colonizado por bactérias

acidogênicas que poderão promover o início da desmineralização e consequentemente lesões ativas de mancha branca em esmalte. Caso não se intervenha no processo a desmineralização passa a prevalecer sobre a remineralização e a lesão de cárie pode evoluir até ter perdas consideráveis com a formação de cavidade (Chalmers, 2006).

As estruturas mineralizadas do dente interagem constantemente com fluidos bucais e com o biofilme dental. Para que a condição de saúde seja mantida, é necessário haver um equilíbrio entre os processos de desmineralização-remineralização (DES/RE), (Maltz et al., 2005; Reynolds, 2008; Melo, 2012). Quando ocorre uma alteração do equilíbrio do processo, com predomínio da desmineralização, o esmalte inicia uma perda de Ca (Cálcio), P (Fosfato) e outros íons para o meio bucal em virtude da queda do pH (menor que 5,5). Assim inicia-se a formação da lesão de cárie que, clinicamente é diagnosticada como uma lesão de mancha branca na superfície do esmalte (ten Cate et al., 2007). A mancha branca está relacionada com a perda de mineral pelo esmalte que, quando diagnosticada em sua fase inicial, ainda apresenta-se parcialmente desmineralizada sendo passível de remineralização. Este aspecto clínico da mancha branca de cárie pode ser confundido com outras alterações do esmalte (Guirado et al., 2006). Esse tipo de lesão de mancha branca é comumente encontrado em áreas de maior estagnação de biofilme dentário, frequentemente onde ocorre o acúmulo de placa bacteriana, sendo os sítios mais comuns de aparecimento as margens cervicais de superfícies lisas e os sulcos, cicatrículas e fissuras oclusais (Maltz et al., 2005; ten Cate et al., 2007) e proximais (Pinheiro et al., 2003). A lesão inicial de cárie pode ser ativa, apresentando-se de cor branca, superfície rugosa e opaca; ou inativa, que apesar da coloração esbranquiçada, possui aspecto liso e brilhante. Ao se apresentar ativa ou inativa necessita de atuações clínicas diferenciadas. Caso não haja um tratamento adequado e direcionado para as lesões iniciais de cárie, a doença irá progredir e lesões em dentina surgirão como consequência da ação das bactérias acidogênicas (Bussadori et al., 2006). Se as lesões forem detectadas precocemente, esta pode ser revertida, com procedimento não-invasivo com uso de agentes remineralizantes.

A severidade das lesões de mancha branca podem ser medidas de acordo com o critério do International Caries Detection and Assessment System (ICDAS), que é um sistema padronizado de quantificação universal de cárie que facilita a

comparação entre os estudos. Esse sistema permite a classificação da cárie dentária desde um nível inicial e não cavitado até cavidades extensas, com base na avaliação visual da superfície do dente, sendo considerado também um instrumento de diagnóstico, uma vez que representa o que acontece no momento do exame e avalia o estágio de progressão da doença. O índice é classificado em: 0- nenhuma alteração visível; 1- primeira alteração visível em esmalte, observada apenas após secagem; 2- alteração visível em esmalte, sem secagem; 3- lesão de esmalte, com quebra de estrutura e sem atingir dentina; 4- sombreamento da dentina subjacente; 5- cavidade nítida com dentina exposta; 6- cavidade extensa com dentina exposta (Pitts, 2010).

Fatores modificadores do paciente podem impedir o desenvolvimento de lesões de mancha branca em esmalte. Para tanto é necessário conhecer o histórico médico e odontológico, medicamentos ingeridos; tipo, frequência e consistência da dieta; níveis de cálcio, fosfato e bicarbonato na saliva, exposição ao flúor e susceptibilidade genética dos pacientes (Chalmers, 2006). Torna-se importante lembrar que a Odontologia atual deve estar voltada para prevenção e educação em saúde bucal. Neste contexto, o cirurgião- dentista assume papel fundamental, mas não exclusivo, devendo esta responsabilidade ser compartilhada entre pais, professores, instituições governamentais e empresas privadas, com o objetivo de promover a saúde (Soares, Valença, 2003).

Assim, diferentes terapias preventivas têm sido estudadas para controlar a desmineralização, melhorar a remineralização e, portanto, paralisar as lesões ativas de cárie (Robertson et al., 2011). Para ser considerado como um agente remineralizante eficiente, o produto tem de promover a remineralização, diminuir a desmineralização e ser mantido na superfície do esmalte, a fim de inibir a atividade (Borges et al., 2011).

Fluoretos

A formação da lesão inicial de cárie em esmalte, está diretamente atribuída ao efeito da acumulação e retenção prolongada do biofilme bacteriano visível (Mattousch et al., 2007), assim como à presença de *Streptococcus mutans* e

lactobacilos na saliva (Ogaard, Rølla, Arends, 1988; Vashisht et al., 2013). Para que ocorra a paralisação do processo, flúor vem sendo amplamente administrado (Clark, 2011; Lima, 2013).

Aplicações tópicas de fluoretos são as formas mais importantes de uso desse elemento na prevenção da cárie dentária (Soares, Valença, 2003; Almeida, 2007). Dentre os que são administrados de forma tópica estão incluídos os géis e vernizes fluoretados, (Thylstrup, Fejerskov, 1995; Almeida, 2007; Lima, 2013).

O fluorostato acidulado (FFA) a 1,23%, adicionado a 0,1M de ácido fosfórico tamponado em um pH entre 3 e 4 foi desenvolvido por Brudevold et al., (1963), que verificaram que o esmalte tem maior aquisição de CaF pelo uso de soluções acidificadas do que por soluções neutras. Além disso, o seu emprego na forma de gel permite manter o fluoreto em contato muito mais íntimo e prolongado com as superfícies reativas do dente (Ostrom, 1984), podendo ser utilizado em moldeiras ou pincelado, devendo ficar em contato com as superfícies dentárias por no mínimo 1 minuto, recomendando-se posteriormente, que o paciente permaneça 30 minutos sem alimentar-se, ingerir líquido ou lavar a boca (Hebling e Bausells 1997).

O uso rotineiro do flúor promove uma superfície menos susceptível a desmineralização (Strateman, Shannon, 1974; Geiger et al., 1992; Medeiros, Brum, 1998, Medeiros, Marques, 1999; Almeida, 2007; Borges et al., 2011). No entanto, os regimes de fluoreto mais atuais dependem da adesão e colaboração do paciente e, infelizmente, aqueles que mais se favoreceriam com a aplicação do flúor suplementar devido às falhas na higiene bucal, são também os menos propensos a cumprir o tratamento (Clark (a) e (b), 2011). A inconsistência na cooperação do paciente tem sido um dos aspectos mais desafiadores no tratamento de lesões de mancha branca em pacientes ortodônticos (Geiger et al., 1992; Clark (b) 2011), visto que o NaF não é capaz de reparar a estrutura do esmalte por si só.

A presença de flúor na cavidade bucal permite a formação de uma pequena parte de fluorapatita, a qual dissolve em meio bucal somente em pH de aproximadamente 4,5-5,0. Isto significa que o pH crítico da desmineralização é em torno de 0,5-1,0 mais ácido do que no meio sem a presença de flúor. Além disso, quando pH retorna para valores menos ácido (acima do novo crítico) e o flúor adentra no interior do mineral torna-o menos solúvel. Contudo, é necessária a

presença dos íons constantemente neste processo para que ocorram os efeitos desejáveis, (Amaechi, van Loveren, 2013).

O seu emprego na forma de gel é um método de fácil utilização, prático, de boa aceitação e custo reduzido, com clara evidência de efeitos inibidores da cárie dentária. Para esse veículo, os produtos mais utilizados são o fluoreto de sódio neutro e o flúor fosfato acidulado, sendo que, sua parcela de contribuição na redução da incidência de cárie dentária, em termos de valores de CPO-D, estaria em torno de 21% (Medeiros, Marques, 1999; Almeida, 2007).

Outra forma disponível de aplicação de flúor é o verniz fluoretado, composto contendo flúor que, por suas propriedades mecânicas – rigidez após o tempo de presa – permite um tempo de contato prolongado, com maior deposição de íons flúor na estrutura dentária. Além de prolongar o tempo de deposição de flúor no esmalte dental, o verniz se apresenta como uma eficaz barreira mecânica entre o esmalte e os compostos ácidos frequentemente observados no meio bucal, seja por ação de microrganismos, seja pelas características da alimentação consumida. As vantagens deste produto seriam a frequência de aplicação, diminuição do tempo de trabalho, não exigir do paciente elevada cooperação (Shobha , 1987; Nicoló, 1997, Reynolds, 2008) e ser o meio mais seguro de aplicação tópica de altas concentrações de flúor (George, 2013). Sendo assim, é um método eficaz na prevenção da cárie tanto na dentição decídua quanto na permanente (Medeiros, Brum, 1998, Medeiros Marques, 1999; Marinho, 2002; Santos et al., 2009).

Além do flúor, produtos derivados da caseína fosfopetídeo (CPP), que é uma proteína derivada do leite que atua na estabilização dos íons cálcio e fosfato e que resulta na formação de um complexo semelhante ao fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP), (Freitas et al.,(2001); Cai, et al.,(2009); Antunes, Reis (2012), vem sendo usado como terapia preventiva para lesão de cárie incipiente em esmalte dental.

Caseína Fosfopeptídeo – Fosfato de Cálcio Amorfo- CPP-ACP

O declínio na incidência de cárie dentária em países desenvolvidos, e atualmente no Brasil (Ferreira, 1998), tem levantado evidências de que, por outro lado, estaria havendo também aumento de fluorose dental (Szpunar, Burt, 1987; Cury, 1991; Rock, Sabiela, 1997; Chedid, 1999; MS-2010). Assim, novos métodos preventivos, sem a presença de flúor, vem sendo estudados como meio alternativo às aplicações de fluoretos.

Esforços têm sido realizados no sentido de se obter materiais que possam paralisar as lesões cariosas o mais precocemente possível. A caseína fosfopeptídeo-fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP), composto derivado da caseína, apresenta potencial remineralizador, impedindo que a lesão cariosa avance (Melo, 2012). O leite e seus derivados têm mostrado efeito benéfico, prevenindo e inibindo a iniciação da lesão de cárie. A caseína fosfopeptídeo (CPP), uma proteína do leite, liga-se aos íons fosfato e cálcio da estrutura dentária, criando um complexo semelhante ao fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Pulido et al., 2008; Robertson et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Zhou et al., 2014).

Recentes estudos na literatura consideram o fosfato de cálcio amorfo (ACP) um composto capaz de intervir na dinâmica do processo de desmineralização/remineralização (DES/RE), diminuindo a DES e aumentando o processo oposto durante um ataque ácido à superfície dos dentes (Reynolds, 1997. Azarpazhooh, Limeback, 2008; Pulido et al., 2008; Somasundaram, Vimala, Mandke, 2013). Porém, dois têm sido os desafios na sua utilização clínica: primeiro, a tentativa de evitar a precipitação destes íons em cristais, que poderiam favorecer à formação de cálculos; segundo, devido à sua incapacidade para se ligar à estrutura dental (Pulido et al., 2008) ficaria difícil o seu aproveitamento no processo. A CPP, por sua vez, mostrou-se capaz de neutralizar os aglomerados de cálcio e fosfato, prevenindo-os de alcançar a dimensão crítica para a precipitação. A formação do complexo CPP-ACP, nas soluções alcalinas e neutras, cria um estado supersaturado capaz de estabilizar soluções de cálcio e fosfato. Essas soluções são liberadas pela caseína fosfopeptídeo, em torno do dente, quando na presença de um ambiente ácido (Pulido et al., 2008; Clark (b) 2011).

A biodisponibilidade desses componentes remineralizantes, combate os ataques ácidos na superfície do dente, potencializando o processo dinâmico da remineralização (Reynolds, 1997; Azarpazhooh, Limeback, 2008). O mecanismo de ação do CPP-ACP está intimamente relacionado à facilidade em se ligar à superfície do dente, bem como na capacidade de neutralizar bactérias cariogênicas presentes na placa, depositando uma alta concentração de fosfato de cálcio amorfo (ACP), quando em estreita proximidade com a superfície do dente (Azarpazhooh, Limeback, 2008).

Atualmente, CPP-ACP (Recaldent™) é comercialmente disponível nos Estados Unidos sob forma de gomas sem açúcar, da Trident White™ (Cadbury América do Norte, Parsippany, NJ); e em pastas, como o Colar MI™ e MI Paste Plus™ (contendo 900 ppm de flúor) (GC América, Alsip, IL, EUA) (Reynolds, 1997). A MI Paste™ ganhou popularidade no tratamento de pacientes ortodônticos com lesões de mancha branca, tendo sido inicialmente utilizada como agente dessensibilizante. Uma vantagem dessa terapia é que os produtos (MI Paste, Tooth Mousse, Trident Branco Gum) são ingeríveis. Em contraste, a terapia tópica de flúor constitui um risco de o paciente ingerir uma quantidade significativa de fluoreto. Embora vários estudos (Harper et al., 1986; Silva et al., 1987) tenham investigado a utilização da caseína como um aditivo anticariogênico em alimentos, água e dentifrícios, a sua utilização foi inicialmente relutada em razão de suas características organolépticas adversas, como também pela dúvida quanto à quantidade necessária para sua eficácia (Azarpazhooh, Limeback, 2008). Por isso, para qualquer aplicação clínica, os profissionais devem considerar os potenciais efeitos colaterais da ingestão de proteína derivado de caseína em pessoas com alergias à imunoglobulina e às proteínas do leite, no entanto, conhecer que a CPP-ACP é digerível por pessoas com intolerância à lactose (Azarpazhooh, Limeback, 2008).

O CPP-ACP já se destaca como importante e promissor produto utilizado no âmbito da terapêutica preventiva aliada aos produtos fluoretados ou utilizados de forma isolada, visto que há relatos de que são capazes de inibir o desenvolvimento das lesões de mancha branca e induzir a remineralização, porém poucos estudos determinam a longevidade da sua ação nem a sua eficácia em ambiente altamente cariogênico com dificuldade de controle da doença.

Diferentes metodologias vêm sendo empregadas para avaliar *in vitro* os tratamentos preventivos de cárie dentária, como, microdureza, microscopia eletrônica de varredura e análise por microscopia óptica. Contudo, em sua grande maioria eles são métodos invasivos que requerem preparo para sua utilização com isso impedem de analisar a progressão ou paralisação das lesões de mancha branca. O surgimento da microscopia confocal a laser para análise topográfica, permite que se façam análises longitudinais sem necessidade de preparação do espécime e assim permite visualizar o desenvolvimento de lesões de mancha branca e avaliar a topografia da superfície de esmalte. O microscópio confocal a laser capta imagens 3D e tem no sistema um software específico que gera os dados em μm e os armazena para análises morfológicas qualitativas das superfícies e quantitativas como rugosidade superficial, perfil de desgaste e degrau.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem por objetivo avaliar *in vitro* diferentes tratamentos na paralisação e remineralização do esmalte dental desmineralizado em situação de alto desafio cariogênico, por meio:

- Análise da rugosidade superficial e do perfil de desgaste ao longo do tempo por meio da microscopia confocal a laser 3D.
- Análise morfológica da superfície dos espécimes ao longo do tempo com microscopia confocal a laser 3D.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O experimento consistiu em um estudo *in vitro*, fatorial, tendo como fator Tratamento Preventivo em 5 níveis: ausência de tratamento - Controle, verniz fluoretado Duraphat; flúor fosfato acidulado – Flúor gel, Mi Paste - Mousse e Mi Paste Plus, e o fator tempo em 3 níveis: após desmineralização, após o 1º tratamento e ao final da ciclagem de pH. As unidades experimentais foram 55 fragmentos de esmalte bovino, divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=11). As variáveis de resposta quantitativa para o estudo foram: perfil de desgaste (apenas para o tempo final), rugosidade superficial e a resposta qualitativa foi análise morfológica da superfície.

3.2 Obtenção dos espécimes

Foram empregados incisivos bovinos limpos e armazenados em solução de formol a 2% com pH 7,0. Os dentes com presença de trincas, rachaduras extensas, manchas hipoplásicas ou acentuado desgaste foram descartados.

As raízes dentais foram seccionadas 1 mm abaixo da junção amelo-cementária, com disco diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri, 06454-920, Brasil) sob refrigeração a água em máquina de corte (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Dinamarca). Em seguida, as coroas foram fixadas em placa de acrílico para serem cortadas e assim obtidos fragmentos de esmalte nas dimensões de 4x4x2mm da face vestibular do dente bovino.

Os fragmentos foram fixados em cilindros de resina acrílica para a realização da planificação e polimento em politriz giratória (APL-4, Arotec S/A Ind. e Comércio, São Paulo/SP, Brasil) com lixa de óxido de alumínio de granulação #600 e #1200 e suspensão de alumina 0,3 e 0,05 µm em disco de feltro (Arotec Sj685 /A Ind. e

Comércio, São Paulo/SP, Brasil) (Figura 1). Ao final do polimento os espécimes ficaram imersos em água deionizada sob ação do ultra-som (Ultrasonic Cleaner T – 1449 – D, Odontobrás Indústria e Comércio, Ribeirão Preto – SP, Brasil) por 10 minutos, para lavagem e remoção de resíduos. A representação esquemática da metodologia utilizada para obtenção do espécime está exemplificada na figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da metodologia utilizada no preparo das amostras.

3.3 Microdureza superficial Inicial

Adicionalmente, nos espécimes selecionados, foi realizada a análise da microdureza inicial dos mesmos por meio de um microdurômetro HMV-2. (Shimadzu Micro Hardness Tester, Kyoto, Japão) com penetrador diamantado piramidal tipo Knoop, com carga estática de 25 gramas força, aplicada por 5 segundos. Os espécimes foram fixados com cera pegajosa (Cera Rosa 7, Polidental Industria e

Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a uma base de acrílico com o auxílio de um paralelômetro (ElQuip, São Carlos-SP, Brasil), de forma a deixar a superfície a ser analisada paralela à placa. Foram realizadas em cada amostra três indentações, sendo a primeira a 1mm de distância de uma das bordas do fragmento. Entre cada indentação foi deixado 500 μm e em seguida foi calculada a média para cada dente, sendo desprezados aqueles que apresentaram valor 20% acima ou abaixo da média de todos os espécimes, e também aqueles com desvio-padrão interno (entre as marcações) acima de 20% do valor de sua própria média (valor médio 318 KNH).

Na sequência, o espécime foi impermeabilizado com resina composta inclusive metade da área de esmalte, sendo esta a área controle. A outra metade, que ficou exposta, foi submetida aos desafios erosivos ($\approx 8\text{mm}^2$). A representação esquemática da metodologia utilizada para seleção do espécime está exemplificada na figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da metodologia utilizada na seleção do espécime por meio de microscopia confocal a laser e microdureza.

3.4 Análise Morfológica e Rugosidade Superficial

O Microscópio Confocal a Laser 3D (Olympus LEXT OLS4000®, Japão) permite a análise morfológica da superfície dos espécimes através de imagens 3D obtidas das áreas mais representativas de cada região e seus respectivos grupos. Este mesmo equipamento foi usado para avaliar antes do tratamento e durante o decorrer do estudo.

A captação das imagens e análise de rugosidade foram realizadas inicialmente (antes da desmineralização inicial (I)), após a desmineralização (PD), após 1ª aplicação dos agentes (1oT) e após a finalização dos 21 dias de ciclagem (PT). As imagens iniciais também serviram como um dos métodos de seleção dos espécimes, todas as amostras que apresentaram trincas e fissuras na superfície após a medida da microdureza foram excluídas.

Foi realizada a aquisição das imagens das superfícies de esmalte, dos espécimes os quais foram posicionados paralelamente à mesa do microscópio confocal a laser LEXT OLS4000® com auxílio de paralelômetro. Após selecionar a área mais representativa do espécime, foi realizada a aquisição da imagem com objetiva de 5x obtendo o zoom óptico de 107 vezes de aumento. Tomou-se o cuidado de sempre realizar as imagens posteriores na mesma região da primeira. Após a aquisição das imagens, estas foram analisadas quanto a rugosidade superficial na região central da área experimental do espécime, tendo uma área padronizada em torno de 0,60mm². Os dados, em µm, foram obtidos por meio de um software específico. As mesmas imagens utilizadas na análise da rugosidade superficial foram utilizadas para avaliação morfológica. Foi capturada também ao final da ciclagem de pH imagem com objetiva de 100x obtendo o zoom óptico de 2137x. A representação esquemática da metodologia utilizada para seleção do espécime e análise da rugosidade superficial está exemplificada na figura 3.

Figura 3. Representação esquemática da metodologia utilizada na seleção do espécime e análise da rugosidade superficial.

3.5 Desmineralização Inicial/ Formação da Lesão

Após a seleção os espécimes foram submetidos à formação da lesão de desmineralização (lesão de mancha branca). Para tanto eles foram imersos em 32ml de 50mM de solução tampão de acetato ($1,28\text{mmolL}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,74\text{mmolL}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,03\text{ppmF}$, pH 5,0) (Queiroz, 2004) durante 43h.

Após o desafio foram obtidas novas imagens e então realizadas análises da rugosidade superficial após a desmineralização.

3.6 Tratamento dos espécimes

Finalizado o preparo dos espécimes, estes foram armazenados em saliva artificial (Amaechi et al., 1999) por 24 horas. E então os blocos foram divididos aleatoriamente nos 5 grupos experimentais de acordo com os tratamentos (n=11), descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tratamento preventivo empregado nos diferentes grupos

Grupo	Tratamento	Composição
G1	Nenhum tratamento - Controle	-----
G2	Verniz fluoretado a 5% - Duraphat	álcool, resinas naturais, cera, sacarina, sabor, 22600 ppm de NaF
G3	Flúor fosfato acidulado a 1,23% pH 3,5 – Flúor gel (Flugel DFL)	Fluoreto de sódio (NaF) a 1,23% adicionado a 0,1M de ácido fosfórico tamponado (pH 3 a 4)
G4	MI Paste – Mousse (Recaldent™, GC Corporation, Tokyo, Japão)	água, glicerol, CPP-ACP a 10%, D-sorbitol, CMC propileno glicol, silicone e dióxido de titânio, xilitol, ácido fosfórico, sabor, sacarina sódica, p-hidroxibenzoato etil-propil-butil pH 6,94
G5	MI Paste - Plus (Recaldent™, GC Corporation, Tokyo, Japão)	água, glicerol, CPP-ACP a 10%, D-sorbitol, CMC propileno glicol, silicone e dióxido de titânio, xilitol, ácido fosfórico, sabor, sacarina sódica, p-hidroxibenzoato etil-propil-butil 900 ppm de NaF, pH 7,19

A aplicação dos tratamentos preventivos foi realizada conforme o seguinte protocolo:

- G1. Controle: não foi aplicado nenhum tratamento, (ficou armazenado em saliva artificial).

- G2. Verniz Duraphat: foi aplicado verniz na superfície do esmalte com auxílio de pincel descartável (microbrush), após 5 minutos foi colocado em saliva artificial, permanecendo em contato por um período de 6 horas e então foi cuidadosamente removido com gaze.
- G3. Flúor fosfato acidulado: aplicação tópica de flúor fosfato acidulado a 1,23% (Gel de flúor fosfato acidulado pH 3,5, Flugel DFL) foi realizada na superfície do esmalte com auxílio de microbrush e deixado por 4 minutos. Após esse tempo, o excesso do gel foi removido com gaze, sem enxague.
- G4. Mi Paste (RecaldentTM, GC Corporation, Tokyo, Japão): o agente foi aplicado com auxílio de microbrush, mantido com ligeiro excesso em contato com a superfície durante 3 minutos e em seguida o excesso foi removido com gaze; o produto permaneceu na superfície por mais 2 minutos e depois foi removido com 10 segundos de jatos de água deionizada.
- G5. Mi Paste Plus (RecaldentTM, GC Corporation, Tokyo, Japão): o agente foi aplicado com auxílio de um microbrush, mantido com ligeiro excesso em contato com a superfície durante 3 minutos e em seguida o excesso foi removido com gaze; o produto permaneceu na superfície por mais 2 minutos e depois foi removido com 10 segundos de jatos de água deionizada.

Após cada tratamento, os espécimes foram imersos em saliva artificial por seis horas, então foram obtidas novas imagens para a realização da análise da rugosidade superficial após o 1º tratamento e depois iniciado os ciclos de pH pela solução desmineralizante. Os tratamentos foram repetidos mais 2 vezes com intervalo de 7 dias entre eles. As ciclagens de pH foram realizadas entre os períodos de tratamento. A representação esquemática da metodologia utilizada aplicação dos tratamentos está exemplificada na figura 4.

Figura 4. Representação esquemática da metodologia utilizada na aplicação dos tratamentos propostos

3.7 Ciclagem de pH

Após 6 horas da finalização do tratamento, os espécimes foram submetidos a ciclagem de pH por 20 dias, sendo que os blocos foram mantidos por 4h na desmineralização e 20 h na solução remineralizante, simulando uma situação de altíssimo risco a cárie. Os espécimes foram lavados com água deionizada entre as fases da ciclagem. A cada 7 dias os espécimes foram submetidos novamente ao tratamento. Após os tratamentos os espécimes foram mantidos em saliva artificial por 6h. No G2 o verniz foi removido cuidadosamente após o tempo em saliva, para então reiniciar a ciclagem pela solução desmineralizante. O volume utilizado para as

soluções desmineralizante [$2,0 \text{ mmolL}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $2,0 \text{ mmolL}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,075 \text{ mmolL}^{-1}$ tampão de acetato, $0,02 \text{ ppmF}$, $\text{pH} 4,7$] e remineralizante [$1,5 \text{ mmolL}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,9 \text{ mmolL}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,150 \text{ mmolL}^{-1} \text{ KCl}$, $0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ Tris}$, $0,03 \text{ ppmF}$, $\text{pH} 7,0$] foi baseada no estudo de Queiroz (2004), proporção de volume por área de $6,25 \text{ ml/mm}^2$ (50 ml) e $3,12 \text{ mm}^2$ (24 ml) respectivamente. As soluções DES e RE foram substituídas a cada 4 dias, evitando assim a saturação. O experimento foi realizado a 37°C . Após o 20º dia os espécimes foram mantidos na saliva artificial por 24h, totalizando um período experimental de 21 dias, sendo então realizadas as análises pós tratamento. A representação esquemática da metodologia utilizada na ciclagem de pH está exemplificada na figura 5.

Figura 5. Representação esquemática da metodologia utilizada na ciclagem de pH.

3.8 Perfil de desgaste

A captação das imagens e análise do perfil foram realizadas após a remoção da resina na superfície do esmalte, expondo a área controle. Foi realizada a aquisição das imagens nas superfícies de esmalte, para isso os espécimes foram posicionados paralelamente à mesa do microscópio confocal a laser LEXT OLS4000® com auxílio de paralelômetro. Após selecionar a área mais representativa do espécime, foi realizada a aquisição da imagem com zoom ótico de 107 vezes de aumento. Tomou-se o cuidado de sempre selecionar parte da área controle para ter como referência na realização do perfil.

Para a análise do perfil de desgaste foram realizadas 10 leituras englobando a área hígida (referência) e a área desmineralizada e a determinação do perfil de desgaste foi obtido pela distância em micrometros entre a linha média do gráfico (referente à área hígida) e a linha de desgaste (área desmineralizada). Os dados, em μm , foram obtidos por meio de um software específico (Figura 6).

Figura 6. Imagem obtida no microscópio confocal a laser demonstrando as 10 mensurações do perfil de desgaste.

3.9 Análise dos Dados

Os dados foram analisados quanto à sua distribuição e homogeneidade para a escolha do teste estatístico mais adequado. Foram realizados diferentes testes estatísticos para cada propriedade analisada, descritos a seguir:

- Análise da **rugosidade superficial** – Os dados dos diferentes tempos foram subtraídos a rugosidade inicial (baseline) antes da desmineralização inicial, obtendo assim 3 tempos (pós-desmineralização, após o 1º tratamento e após a finalização da ciclagem). Esses dados foram analisados quanto a sua distribuição, como os dados se apresentaram normais e homogêneos realizou-se a análise de variância a 2 critérios e teste Holm-Sidak para comparação das médias com $\alpha=5\%$.
- Análise do **perfil de desgaste** – foi utilizada a media das 10 leituras e como os dados se apresentaram normais e homogêneos realizou-se a análise de variância a 1 critério.
- Para **análise morfológica** realizou-se uma análise qualitativa das imagens.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Rugosidade Superficial

Na análise dos dados pode-se observar que o fator tratamento não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$), todos apresentaram um aumento semelhante da rugosidade superficial, ou seja, $G1 \approx G2 \approx G3 \approx G4 \approx G5$ (Figura 7). Na análise do fator tempo pode-se observar uma alteração gradativa e significativa da rugosidade ($p < 0,05$), sendo que após os 21 dias de ciclagem ocorreu uma rugosidade superior a todos os outros tempos ($p < 0,05$), tendo $1^{\circ}T < PD < PT$ (Figura 8)

Figura 7. Análise da rugosidade superficial do fator tratamento

Figura 8. Análise da rugosidade do fator tempo

Na interação dos fatores pode-se observar que no grupo 2 e 5 ocorreu alteração estatística significativa ($p < 0,05$) após os 21 dias de ciclagem e os grupos 1, 3 e 4 houve um aumento não significativo ao final da ciclagem (Figura 9 e Tabela 2).

Figura 9. Interação dos fatores tempo e tratamento por grupo

A tabela 2 exibe as médias e desvios padrões da rugosidade da superfície em cada grupo.

Tabela 2. Médias (μm) e desvios padrões da rugosidade da superfície em cada grupo.

	PD	1ºT	PT
G1	$0,97 \pm 1,37^{Aa}$	$0,52 \pm 0,78^{Aa}$	$0,89 \pm 0,66^{Aa}$
G2	$0,97 \pm 0,60^{Ab}$	$0,51 \pm 0,73^{Aa}$	$1,39 \pm 0,98^{Ac}$
G3	$1,00 \pm 0,77^{Aa}$	$0,77 \pm 0,34^{Aa}$	$1,12 \pm 0,43^{Aa}$
G4	$0,88 \pm 0,72^{Aa}$	$0,82 \pm 0,47^{Aa}$	$1,28 \pm 0,50^{Aa}$
G5	$0,09 \pm 0,69^{Aa}$	$0,18 \pm 0,76^{Ab}$	$0,63 \pm 0,93^{Ac}$

Letras maiúsculas comparação entre substratos de uma mesma coluna
 Letras minúsculas comparação de tempo dentro de uma mesma linha

4.2 Perfil de desgaste

Na análise do perfil de desgaste pode-se observar que todos os grupos apresentaram desgaste e tiveram comportamento similar entre eles ($p > 0,05$), tendo $G1 \approx G2 \approx G3 \approx G4 \approx G5$. (Tabela 3)

Tabela 3. Média (μm) e desvio padrão do perfil de desgaste de cada grupo

GRUPOS	Media	$\pm DP$
G1	2,711	0,56
G2	2,752	0,96
G3	2,330	0,23
G4	3,067	0,87
G5	2,604	0,51

$p=0,328$

4.3 Análise morfológica

Após a análise dos espécimes observou-se que em todos os grupos foi ocorrendo um aumento gradativo e perceptível de irregularidades, com perda mineral superficial. No G1 observa-se perda estrutural e alguns espécimes apresentaram início de formação de cavidade.

Nos grupos 2 e 3 observou-se que a superfície apresentou uma topografia menos irregular e quase sem desgaste perceptível. Nos grupos 4 e 5 observou-se em muitos espécimes a formação de cavidades em algumas regiões. As figuras 10 a 14 representam os diferentes grupos nos tempos estudados. Na figura 15 observa-se a superfície do esmalte no aumento de 2134x após o término das ciclagens mostrando uma superfície mais regular para os grupos 1 e 2 e uma topografia irregular para os grupos 3, 4 e 5.

Figura 10. G1- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1^oT) e pós último tratamento (PT)

Figura 11. G2- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1ºT) e pós último tratamento (PT)

Figura 12. G3- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1^oT) e pós último tratamento (PT)

Figura 13. G4- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1ºT) e pós último tratamento (PT)

Figura 14. G5- imagens confocal de um espécime, nos tempos inicial (I); pós desafio (PD); primeiro tratamento (1^oT) e pós último tratamento (PT)

Figura 15. Imagens confocal da superfície do esmalte de um espécime em maior aumento, 2134x, dos diferentes grupos após o término das ciclagens.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, avanços científicos no conhecimento da patogênese e prevenção de doenças bucais levaram a um melhor manejo da doença cárie, tornando a manutenção da saúde bucal mais eficiente, onde enfatiza a promoção e prevenção na saúde bucal (Soares, Valença, 2003; Chalmers, 2006; Melo, 2012). Assim, esforços vêm sendo realizados para reduzir o risco da evolução da cárie, para que não haja formação de cavidade; porém, se esta já estiver presente, devem ser utilizadas técnicas e procedimentos que preservem a estrutura dentária (Zhang et al., 2011). Apesar do declínio na incidência e prevalência da cárie dentária, a doença é ainda o principal problema de saúde bucal dos brasileiros e alguns grupos populacionais como crianças e adolescentes, ainda são considerados de alto risco (MS, 2010; Melo, 2012), sendo uma das doenças crônicas mais prevalentes em adultos e crianças no mundo (Featherstone, 2000) e no Brasil, (MS, 2010). Em consequência do declínio, a doença cárie tornou-se fortemente polarizada (Poulsen, Scheutz, 1999), cerca de 80% das superfícies dentais cariadas estão concentradas em 25% dos indivíduos (Seppä, 2001). Nesse grupo em que a manifestação da doença ainda permanece alta, a aplicação tópica profissional de flúor tem sido recomendada, visando aumentar a disponibilidade do fluoreto na cavidade bucal (Marinho, 2002; Souza- Gabriel, 2009) para impedir ou retardar a evolução das lesões de cárie.

As estruturas mineralizadas do dente interagem constantemente com fluidos bucais e com o biofilme dental e quando ocorre o desequilíbrio entre os processos de desmineralização-remineralização (Maltz, et al., 2005; Reynolds, 2008; Melo, 2012) com predomínio da desmineralização, o esmalte inicia uma perda de Ca (Cálcio), P (Fosfato) e outros íons para o meio bucal em virtude da queda do pH (menor que 5,5). Assim inicia-se a formação da lesão de cárie que, clinicamente é diagnosticada como uma lesão de mancha branca na superfície do esmalte (ten Cate et al., 2007). A mancha branca está relacionada com a perda de mineral pelo esmalte que, quando diagnosticada em sua fase inicial, ainda apresenta-se parcialmente desmineralizada sendo passível de remineralização. Os tratamentos preventivos são indicados principalmente em situações em que já se apresenta sinais clínicos da doença. (Reynolds, 2008; Melo, 2012), sendo necessário que se

avaliar esses tratamentos no que tange a paralisar ou reduzir a velocidade de desenvolvimento da lesão de cárie. Assim, o presente estudo avaliou a evolução de lesões de mancha branca e a influência de diferentes tratamentos preventivos.

Com a valorização da Odontologia Preventiva ocorreu o avanço nas pesquisas de materiais e métodos com finalidade de inibir a formação e/ou progressão das lesões de cárie. As lesões de cárie artificiais incipientes e padronizadas do presente estudo foram obtidas pelo armazenamento na solução desmineralizadora, composta de tampões ácidos com cálcio e fosfato em baixo pH (pH 4,7), com o objetivo de simular os episódios de queda de pH que ocorrem na superfície do esmalte, (Queiroz, 2004). A mesma solução desmineralizadora foi utilizada em todo período de ciclagem Des/Re, que ocorreu durante 20 dias, simulando alto desafio cariogênico. O estágio de remineralização é simulado com imersão do espécime dental em solução contendo cálcio e fosfato em um grau de saturação semelhante ao da saliva com pH 7,0 (Amaechi et al., 1999; Queiroz, 2004).

Além disso, optou-se em trabalhar com dentes bovinos, visto a validade de sua utilização em estudos *in vitro*. Essa possibilidade deve-se à semelhança do substrato desses dentes aos dos dentes humanos. A microdureza do esmalte e da dentina de dentes humanos é semelhante a dos bovinos (Donassollo et al., 2007). Muita informação tem sido gerada usando-se dentes bovinos como substrato, favorecendo maior número de repetições por grupo experimental, dada a maior facilidade de aquisição e por serem considerados aceitáveis em testes *in vitro*.

O modelo de estudo utilizado na presente pesquisa foi *in vitro* pois este é capaz de simular a dinâmica da perda e do ganho mineral dos tecidos dentários, de uma forma rápida, padronizada e sensível o suficiente para avaliar a eficácia de diferentes agentes preventivos (Moron, 2011). Assim, simular *in vitro* a dinâmica da lesão vem sendo o método adotado nos experimentos que avaliam os produtos indicados para reduzir a perda mineral e consequentemente atuam no avanço da lesão cariosa (Scott et al., 2010; Jayarajan et al., 2011; Lima, 2013). Sobre estudos *in vitro*, ainda que os testes laboratoriais não reproduzam exatamente as condições que ocorrem *in vivo*, constituem importante parâmetro de análise, uma vez que, se o material apresentar comportamento eficiente *in vitro*, maior probabilidade de um desempenho clínico satisfatório (Larry, Hogan, 1998; Pinheiro, 2010; Lima, 2013).

Diferentes métodos são utilizados para avaliar a capacidade de inibição da progressão das lesões de cárie no esmalte, destacando-se a análise morfológica da superfície com Microscópio Confocal a Laser 3D avaliando o perfil de desgaste superficial, degrau e a rugosidade e também a análise topográfica através das imagens obtidas (Schlueter et al., 2011). A microscopia Confocal de varredura a laser usa uma luz monocromática para coletar imagens de planos focais específicos. Estas imagens são analisadas por um programa, obtendo-se informações qualitativas. Deve-se ressaltar que este método também permite quantificar a perda do tecido por erosão e a profundidade da lesão (Heurich et al., 2010; Schlueter et al., 2011; Scott et al., 2010). Este tipo de microscopia de luz pode ser considerado como sendo a meio caminho entre microscopia óptica e eletrônica. Imagens que podem ser produzidas da superfície das amostras são semelhantes em caráter aos do microscópio eletrônico de varredura (MEV), (Watson, 1991; Somasundaram, Vimala, Mandke, 2013). Somado a isso, é uma metodologia que permite obtenção de imagens sem necessidade de preparo prévio e dessa forma permite que se façam avaliações longitudinais dos tratamentos, além de não superestimar a profundidade da lesão (Heurich et al., 2010; White et al., 2010; Schlueter et al., 2011; Pedrosa, 2013). Assim, no presente estudo optou-se pela escolha de empregar a Microscopia Confocal a Laser para obtenção das imagens e das análises de rugosidade superficial e perfil de desgaste.

Diversas terapias preventivas são enfatizadas na literatura no intuito de eliminar ou paralisar lesões de cárie incipientes em esmalte, tais como as que envolvem o uso de dentifrícios, géis e vernizes fluoretados; enxaguantes bucais; antimicrobianos e gomas de xilitol (Santos et al., 2009; Belfort Carvalho Filho, 2010; Robertson et al., 2011; Lima, 2013). Reynolds (1991, 1997), introduziu os produtos derivados da caseína, proteína derivada do leite que atua na estabilização dos íons cálcio e fosfato e que resulta na formação de um complexo semelhante ao fosfato de cálcio amorfo (ACP), que diminuem a desmineralização e promovem a remineralização da superfície dentária, (Pulido et al., 2008; Robertson et al., 2011; Melo, 2012). Segundo Azarpazhooh e Limeback (2008), não há restrições para o uso do CPP. Assim, o complexo CPP-ACP pode ser incorporado nos gêneros alimentícios, em agentes terapêuticos e por não demonstrar nenhum dos efeitos adversos do flúor - "fluorose", é possível, que este produto venha a se tornar um importante agente no futuro (Rose, 2000; Clark, 2011). Como o flúor é amplamente

estudado nas formas de gel e verniz, o presente estudo empregou estes dois materiais como referência e estudou dois produtos contendo o complexo CPP-ACP, sendo um com flúor (Mi Paste Plus) e outro não (Mi Paste).

Analisando os tratamentos realizados no estudo, observou-se que nenhum tratamento foi capaz de paralisar a lesão e/ou reverter a situação de alto risco. Este fato provavelmente ocorreu devido o tratamento remineralizador só demonstrar ser efetivo quando combinado ao controle de outras variáveis para diminuição do desequilíbrio do ciclo de Des/Re (Geiger et al., 1992; Nicoló, 1997; Jacobs et al., 1998; Soares, Valença, 2003). Como o presente estudo manteve a ciclagem de pH durante 21 dias e o tecido já se apresentava desmineralizado, os métodos empregados não foram capazes de paralisar o processo.

Na análise do tempo pode-se observar que após o primeiro tratamento (1oT) ocorreu uma diminuição da rugosidade superficial, provavelmente devido a ação dos agentes preventivos, bem como, a deposição de minerais da solução remineralizadora. Contudo, com o contínuo processo de Des/Re dos 21 dias de ciclagem promoveu uma superfície extremamente irregular e rugosa, que numa situação clínica favoreceria o acúmulo de biofilme e proporcionaria a continuação do desequilíbrio do pH.

O grupo Controle (sem tratamento) apresentou um alto grau de desmineralização e após o tempo do primeiro tratamento observou-se que a rugosidade não aumentou, porém não resistiu a continuidade da ciclagem, mostrando um aumento da desmineralização no final. Morfologicamente os espécimes apresentaram um aumento gradativo e perceptível de irregularidades, com perda mineral superficial. Esses resultados confirmam os achados de outros estudos prévios (Pulido et al., 2008; Clarck; Diniz, 2011), que mostram diferença entre realizar tratamento com flúor e o grupo controle sem tratamento. Nesse grupo ocorreu uma perda estrutural nítida sendo que alguns espécimes apresentaram início de formação de cavidade, inferindo que o efeito tampão da saliva não foi suficiente em situação de alto desafio cariogênico.

O verniz Duraphat não foi efetivo e os espécimes apresentaram grande perda mineral, apesar de ter sido aplicado uma vez por semana. Isso pode ter ocorrido devido ter sido deixado na superfície apenas 6 horas em contato com

esmalte. Estudos recentes (Carvalho et al., 2013, Lima, 2013) verificaram ação favorável quando deixaram o verniz em contato com a superfície de esmalte por pelo menos 24h o que impediria o contato da solução Des e ainda favoreceria a remineralização da superfície. Clinicamente, Marinho, (2002) demonstraram que o verniz fluoretado aplicado duas a quatro vezes ao ano, tanto em dentes decíduos como permanentes, promove uma substancial redução do incremento de cárie, independentemente do risco ou exposição à outras fontes de fluoreto. A controvérsia com o resultado do presente estudo é que em estudo in vitro o processo de Des/Re é contínuo e em estudos in vivo o processo é reduzido em função que para se aplicar o verniz faz-se profilaxia para que a superfície esteja limpa e seca, ou seja, é removido o biofilme bacteriano permitindo uma diminuição da profundidade de desmineralização (Farhadian et al. 2008).

Na análise do fator tempo pode-se observar uma alteração gradativa da rugosidade, sendo que após os 21 dias de ciclagem ocorreu uma rugosidade superior a todos os outros tempos. Este fato pode ter sido favorecido pela remoção do verniz que mesmo com cuidado pode ter ocorrido deslocamento mineral da superfície fragilizada pelo processo Des/Re.

No presente estudo, pode-se observar que o grupo flúor gel (G2) apresentou morfologicamente uma superfície mais regular o que provavelmente se deu devido o flúor ter conseguido diminuir a velocidade de desmineralização. Pois doses elevadas de flúor (como presente no flúor gel) utilizadas na superfície porosa das lesões de mancha branca afetam principalmente a superfície externa e promove uma rápida precipitação de minerais no esmalte poroso obliterando a lesão e mantendo uma subsuperfície desmineralizada (García-Godoy, Hicks, 2008; Clark, 2011b), mesmo assim a aplicação tópica profissional de flúor tem sido recomendada, visando aumentar a disponibilidade do fluoreto na cavidade bucal (Marinho, 2002; Souza-Gabriel, 2009). Em relação a rugosidade superficial na análise do fator tempo pode-se observar uma alteração gradativa da rugosidade, mas com menor intensidade que os outros grupos. Este fato provavelmente ocorreu devido a deposição mineral sobre a superfície diminuindo as irregularidades.

Entretanto, quando foi analisado o comportamento de duas pasta a base de CPP-ACP (Mi Paste e Mi Paste Plus) observou que este não foi eficiente para conter a

desmineralização e ou promover remineralização. Resultados similares foram observados por Robertson et al. (2011), Pulido et al., (2008), Behanan et al., (2010), Heravi et al., (2014) que não demonstraram efeito de remineralização para MI Paste em lesões iniciais de esmalte. Em estudo recente, Mehta, Nandlal, Prashanth (2013), realizaram estudo semelhante ao presente trabalho em que analisaram o efeito do CPP-ACP e foi comparável ao efeito da saliva artificial em lesões de mancha branca e contínuo processo Des/Re e após 14 dias de ciclagem, além disso observaram ação semelhante do MI Paste e MI Paste Plus. Entretanto, esses resultados contradizem a vários autores (Oshiro et al., 2007; Reynolds, Cai, Cochrane, 2008; Thepyou et al., 2013, Carvalho et al., 2013, Somasundaram, Vimala, Mandke, 2013) que verificaram resultado positivo para os grupos contendo CPP-ACP concluindo que este material tende a remineralizar toda a lesão, mesmo na presença de fluoretos (Reynolds, Cai, Cochrane, 2008), sendo mais efetivo o CPP-ACPF por causa da vantagem de fluoreto de sódio (NaF 0,2%) (Jayarajan et al., (2011), sendo que esta última afirmação é contraditória na literatura (Mehta, Nandlal, Prashanth, 2013; Patil et al., 2013). Li et al (2014), observaram em uma revisão sistemática que não há diferença no efeito benéfico do CPP-ACP em relação ao flúor, porém a sua ação ainda não está clara.

Pukallus et al., (2013), observaram clinicamente que o CPP-ACP produziu uma redução do *Streptococcus* do grupo mutans, sem no entanto diminuir a prevalência das lesões de cárie, talvez seja este fato que proporciona a discrepância dos resultados in vivo com o in vitro, uma vez que o CPP-ACP pode afetar a adesão do *S. mutans*. Além disso, a divergência de resultados provavelmente ocorreu devido a metodologia empregada no presente estudo em que a partir de uma superfície desmineralizada realizou-se o tratamento e continuou o processo de Des/Re, tendo apenas um trabalho nesta linha de investigação (Mehta, Nandlal, Prashanth, 2013).

Analisando a rugosidade superficial pode-se observar que no MI Paste Plus ocorreu alteração após os 21 dias de ciclagem. Morfologicamente os espécimes apresentaram aumento perceptível de irregularidades, inclusive com a formação de cavidades em algumas regiões.

Assim, pode-se observar que o flúor gel diminuiu a velocidade da perda mineral. Em grupos em que a manifestação da doença ainda permanece alta, a aplicação tópica profissional de flúor tem sido recomendada, visando aumentar a disponibilidade do fluoreto na cavidade bucal (Marinho, 2002; Souza-Gabriel, 2009; Santos et al., 2009; Belfort Carvalho Filho, 2010; Robertson et al., 2011; Lima, 2013). Quanto aos produtos contendo CPP-ACP, (Pulido et al., 2008; Behanan et al., 2010; Robertson et al., 2011), infere-se que mais estudos devem ser realizados afim de apurar seus efeitos benéficos em situação de alto desafio cariogênico. Resta lembrar que, embora o uso de produtos remineralizadores tem seu papel importante no tratamento de lesões cariosas a cárie é uma doença multifatorial e o controle e tratamento da doença passa pela atenção, educação e mudanças de atitudes afim de se obter o controle desses vários fatores.

A cárie é uma doença dinâmica, que tende a evoluir se não houver intervenção no processo, principalmente se não modificar a interação que há entre os fatores que juntos desencadeiam a instalação da doença, (Geiger et al., 1992; Nicoló, 1997; Jacobs et al., 1998 ; Soares, Valença, 2003; Maltz, 2005; ten Cate et al., 2007; Reynolds, 2008; Melo, 2012). Esse quadro exige terapêutica para limitar a evolução da lesão, enfrentando a desmineralização, implementando a remineralização e assim revertendo a lesão de mancha branca.

Considerando as limitações do experimento, a metodologia, é totalmente reproduzível, devido a confiabilidade do método e rigor no cumprimento de todas as etapas delineadas. Pode-se considerar que a ciclagem Des/Re simulou situação de alta e continua atividade de cárie, atenuada somente pelos tratamentos. Isto equivale à situação de um ambiente em contínuo desafio, e sem controle de outros fatores que normalmente interferem nas oscilações Des/Re no ambiente bucal. Quanto aos resultados, deixa a pensar se realmente há tratamento preventivo, que por si só seja eficaz para estabilizar e paralisar a atividade da doença cárie.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Baseado na metodologia empregada, nos resultados obtidos e nas restrições de um estudo in vitro, pode-se concluir que:

- nenhum dos tratamentos testados foi capaz de paralisar ou remineralizar as lesões desmineralizadas.

- a contínua ciclagem promoveu um aumento gradativo das irregularidades superficiais para todos os grupos

- morfologicamente o flúor gel e o verniz promoveram uma superfície mais homogênea, com menos irregularidades e perda estrutural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, GJF. Indicações de odontopediatras quanto ao uso de flúor tópico por crianças entre zero e seis anos de idade: dados para a elaboração de um protocolo de ações. *Salusvita*; 2007.27(3): 373-392.

Amaechi BT; van Loveren C. Fluorides and non-fluoride remineralization systems. Toothpastes. Monogr in Oral Sci. Basel, Karger; 2013; 23: 15-26,.

Amaechi, BT; Higham, SM.; Edgar, WM; Milosevic, A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *Journal of Dental Research*. 1999. 78(12): 1821-1828.

Antunes, MEM; Reis, YB dos; Goma de Mascar em Odontologia, Artigo de Atualização. Núcleo de Estudos da Saúde do Adolescente; 2012 Out/Dez;9(4).

Azarpazhooh A.; Limeback H. Clinical efficacy of casein derivatives: a systematic review of the literature. *The Journal of the American Dental Association*. 2008; 139(7): 915-24.

Belffort de Carvalho Filho,AC; Avaliação dos efeitos de compostos fluoretados na erosão ácida dental por fluorescência de raios- X. [dissertação].Paraíba Universidade do Vale do Paraíba, Programa de Pós-graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2010.

Borges, BCD; Vasconcelos, AAM de; Cunha, AGG; Pinheiro, FHDL; Machado, AJS dos. Preliminary Clinical Reports of a Novel Night-Guard Tooth Bleaching Technique Modifiedby Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP); *The European Journal Of Esthetic Dentistry*. Winter 2011; 6 (4):446-453.

Brudevold, F; Savory A; Gardner DE; Spinelli M; Speirs R. A study of acidulated fluoride solutions. I. In vitro effects of enamel. *Arch, oral Biol.*;1963; Mar./Apr; 8:167-77.

Bussadori, SK; Carolina, CG; Fernandes, KPS; Masuda, MS. Utilização do gel à base de papaína para a remoção química e mecânica do tecido cariado. *Revista APCD*. 2006; 60(6): 450-453.

Cai F, Shen P, Walker GD, Reynolds C, Yuan Y, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. *J dent.* 2009;37(10):763-8.

Carvalho FG, Brasil VLM, Silva Filho TJ, Carlo HL, Santos RL, Lima BASG. Protective effect of calcium nanophosphate and CPP-ACP agents on enamel erosion. *Braz Oral Res.*, (São Paulo) 2013 Nov-Dec;27(6):463-70

Chalmers JM. Minimal intervention dentistry: strategies for the new caries challenge in our older patients. *Journal of the Canadian Association.* 2006; 72:325-31.

Chedid, SJ. Avaliação da quantidade de dentifrício fluorado ou NaF a 0,02% no desenvolvimento de cárie em dentes decíduos – estudo in vitro utilizando modelos de ciclagens de pH, [tese] s/n, Universidade de São Paulo, Faculdade de odontologia/Doutor; 1999, p. 102.

Clark,(a) Sarah Elizabeth. "Remineralization effectiveness of MI Paste Plus - a clinical pilot study." [master's thesis], University of Iowa, 2011.

Clark,(b) Kristin Dumboski. "The efficacy of 37% phosphoric acid + Mi Paste Plus on remineralization of enamel white spot lesions." [master's thesis], University of Iowa, 2011.

Cochrane NJ, Shen P, Yuan,Y, Reynolds, EC. Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. *Oral Health CRC, Melbourne Dental School, Bio21 Institute, The University of Melbourne, Victoria.* Ref *Australian Dental Journal* 2014; 59: 1–6; doi: 10.1111/adj.12144.

Cury, JA. Fluorterapia. São Paulo: Associação Brasileira de Odontologia Preventiva. maio, 1991, 6p. (Biblioteca Científica,4).

Donassollo TA, Romano AR, Demarco FF, Della-Bona A. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humano (permanentes e decíduos). *Rev Odonto Ciênc.* 2007 out.-dez.;22(58);311-6.

Featherstone, JDB. The Science and Practice of Caries Prevention. *The Journal of the American Dental Association.* 2000; 131: 887-99.

Ferreira, R A. Em queda livre? *Rev Assoc Paul Cir Dent*, 1998, mar./abr.,52(2):104-110.

Freitas RR, Oliveira JA, Taga EM, Buzalaf MAR. Efeito da goma de mascar contendo sacarose e do dentifrício fluoretado na remineralização *in situ* de lesões de cárie artificiais. *Pesqui Odontol Bras*. [Internet]. 2001 [citado 2012 out 03];15(2):98-103. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pob/v15n2/a04v15n2.pdf>.

García-Godoy F.; Hicks M J. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventative agents in enamel demineralization and remineralization. *The Journal of the American Dental Association*. 2008;139 Suppl: 25S-34S.

Geiger A M; Gorelick L; Gwinnett AJ; Benson BJ. Reducing white spot lesions in orthodontic populations with fluoride rinsing. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*.1992; 101: 403- 7.

George, FHM. Aplicação de verniz de flúor (soluto de 50mg/ml) em saúde comunitária. *Direção geral da saúde*, 2013; 13: 1-7.

Guirado, T; Mendes, F; Bengtson, A; Pinheiro, S. Contagem de *Streptococcus mutans* do tecido cariado de dentes decíduos e permanentes. *Revista APCD*, 2006; 60(3): 212.

Harper DS; Osborn JC; Hefferren JJ; Clayton R. Cariostatic evaluation of cheeses with diverse physical and compositional characteristics. *Caries Research*.1986; 20: 123-30.

Hebling, J; Bausells, J. Medidas Preventivas. Parte I: Flúor. In: Bausells, J. *Odontopediatria: Procedimentos Clínicos*. São Paulo: Premier, 1997.

Heravi F, Ahrari F, Mahdavi M, Basafa S. Comparative evaluation of the effect of Er:YAG laser and low level laser irradiation combined with CPP-ACPF cream on treatment of enamel caries. *J Clin Exp Dent*. 2014 Apr 1;6(2):e121-6.

Heurich, E; Beyer, M; Jandt KD; Reichert J; Herold V; Schnabelrauch M; Sigusch BW. Quantification of dental erosion-a comparison of stylus profilometry and confocal laser scanning microscopy(CLSM). *Dent Mater*.2010 Apr.; 26(4):326-36

Jacobs, MMRP; Masuda, MS; Tennis CA; Gonçalves, AF. Fluoterapia tópica na remineralização de lesões de mancha branca no esmalte dental. *Rev. Odontol. Santo Amaro, São Paulo*, 1998 jan./ jun.; 3 (1):35-38

Jayarajan J, Janardhanam P, Jayakumar P, Deepika. Efficacy of CPP-ACP and CPP-ACPF on enamel remineralization - An *in vitro* study using scanning electron microscope and DIAGNOdent®. *Indian J Dent Res* 2011; 22:77-82

Larry Smith, K.; Hogan, J.S. Milk quality - A worldwide perspective. In: National Mastitis Council; Madison. Proceedings... Madison: NMC, 1998; 37:3-9.

Leites, ACBR; Pinto, MB; Sousa, ERS. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*, 2006; 25(2): 239- 252.

Li J, Xie X, Wang Y, Yin W, Antoun JS, Farella M, Mei L. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: a systematic review. *J Dent*. 2014 Jul;42(7):769-77.

Lima, CMP de. Comparação entre o verniz fluoretado e o fosfopeptídeo de caseína - fosfato de cálcio amorfo fluoretado e não fluoretado na remineralização do esmalte ao redor de braquetes ortodônticos - Estudo *In Vitro*. [Dissertação]- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre. Campo Grande - 2013.

Maltz, M. Cariologia clínica. In: Toledo, O A. Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica. Ed Premier, São Paulo 2005:105-150.

Marinho, VCC. Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. The Cochane Database of Systematic Reviews, issue 1, CD002280.DOI: 10.1002/14651858.CD002280, 2002.

Mattousch, TJH; Van Der Veen MH; Zentner A. Caries lesions after orthodontic treatment followed by quantitative light-induced fluorescence: a 2-year follow-up. *European Journal of Orthodontics*. 2007; 29 (3): 294-8.

Medeiros, UV; Brum, SC. A proteção do esmalte por substâncias fluoretadas e os desafios cariogênicos. *Rev. APCD, São Paulo*. 1998; 52(6): 454-459.

Medeiros, UV; Marques, MS. Estudo comparativo sobre a incorporação de fluoreto de cálcio no esmalte dentário humano a partir de diferentes métodos tópicos e suas periodicidades: um estudo in vitro. *Rev. CRO-RJ, Rio de Janeiro*. 1999;1(1): 35-46.

Mehta R, Nandlal B, Prashanth S. Comparative evaluation of remineralization potential of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate fluoride on artificial enamel white spot lesion: An *in vitro* light fluorescence study. *Indian J Dent Res* 2013;24:681-9

Melo, LFB; Avaliação do efeito remineralizador da caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo - cpp-acp nas lesões iniciais de cárie em dentes decíduos e permanentes; estudo “*in vivo*” [dissertação]; Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2012.

Ministério da saúde. Levantamento epidemiológico de saúde bucal no Brasil. SB Brasil, 2010.

Moron BM. Comparação entre diferentes métodos para a produção e análise de cárie artificial em esmalte e dentina [Dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2011.

Nicoló, R. Prevenção em odontopediatria: fluoretos. Conceitos atuais e tendências futuras. Rev. Bras. Odont., Rio de Janeiro. 1997;54(3): 163-166, 1997.

Ogaard B; Rølla G; Arends J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1: lesion development. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.1988; 94(1): 68-73.

Oshiro M, Yamaguchi K, Takamizawa T, Inage H, Watanabe T, Irokawa A. Effects of CCP-ACP paste on tooth mineralization: An FE-SEM study. J Oral Sci 2007;49:115-20.

Ostrom, CA. Cariologia Clínica. In: Menaker, L. Cáries Dentárias: bases biológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984.

Patil N, Choudhari S, Kulkarni S, Joshi SR. Comparative evaluation of remineralizing potential of three agents on artificially demineralized human enamel: An *in vitro* study. J Conserv Dent 2013;16:116-20

Pedrosa, SS. Efeito de materiais contendo compostos bioativos na remineralização de lesões de erosão no esmalte bovino:estudo "*in vitro*" [Tese], faculdade de odontologia, Universidade de São Paulo-USP -2013.

Pinheiro, IA; Medeiros, MCS; Andrade, AKM; Ruiz ,PA. Lesões Brancas no esmalte dentário: Como diferenciá-las e tratá-las. Revista Brasileira de Patologia Oral. 2003:1-2.

Pinheiro,HB; Lopesa B; Klautaub EB; Cardosoc J; Silva BR; Cardoso PEC. Influence of Bioactive Materials Used on the Dentin Surface Whitened with Carbamide Peroxide 16%. Materials Research. 2010; 13(2): 273-278.

Pitts, N. International Caries Assessment and Detection System. University of Dundee, UK; 2010 [atualizada em 2010 e último acesso 10 de janeiro 2014]. Disponível em: <http://www.icdas.org>

Poulsen S, Scheutz F. Dental Caries in Danish Children and adolescents 1988-1997. *Community Dental Health*, v.16,n.3, p.166-170,1999.

Pukallus ML, Plonka KA, Holcombe TF, Barnett AG, Walsh LJ, Seow WK. A randomized controlled trial of a 10 percent CPP-ACP cream to reduce mutans streptococci colonization. *Pediatr Dent*. 2013;35(7):550-5.

Pulido MT; Wefel JS; Hernandez MM; Denehy GE; Guzman-Armstrong S.; Chalmers JM; Qian F. The inhibitory effect of MI Paste, fluoride and a combination of both on the progression of artificial caries-like lesions in enamel. *Oper Dent*. 2008; 33(5): 550-5.

Queiroz, CS. Modelos de estudos in vitro para avaliar o efeito do fluoreto na desmineralização e remineralização do esmalte e dentina. [Tese] – Universidade Estadual de Campinas. FOP. 2004

Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ. Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res* 2008; 87:344–348.

Reynolds, E C. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? Centre for Oral Health Science, School of Dental Science, The University of Melbourne, Victoria. *Australian Dental Journal* 2008; 53: 268–273.

Reynolds, E.C., inventor. The University of Melbourne and the Victorian Dairy Industry Authority, assignees Anticariogenicphosphopeptides. US patent 5015628. May 14, 1991.

Reynolds, EC. Anticariogenic Phosphopeptides. U.S. Patent 5015628, 1991.

Reynolds, EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *Journal of Dental Research*.1997; 76(9): 1587-95.

Robertson MA; Kau CH; English JD; Lee RP; Powers J; Nguyen J T. MI Paste Plus prevent demineralization in orthodontic patients: a prospective randomized controlled trial. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2011;140:660-8.

Rock, W P; Sabiela, AM. The relationship between reported toothpaste usage in infancy and fluorosis of permanent incisors. *Br Dent J*,1997 sept.; 183(5): 165-170.
Rose RK. Effects of anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaque. *Arch Oral Biol* 2000; 45:569-75.

Santos, LM; dos Reis, JIL; Perolona, M M; Ramos, SM; Araújo, JM; Avaliação *In vitro* de produtos fluoretados no desenvolvimento de lesões de cárie em dentes decíduos. Braz. Res Orais. São Paulo. 2009 july/ sept.; 23(3).

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Cárie RES.* 2011; 45 Suppl 1:13-23. doi: 10.1159/000326819. Epub 2011 31 de maio.

Scott MB; Arruda A O; González-Cabezas C; Woosung S P; Mathilde C; Mich, AA. In-vitro evaluation of various treatments to prevent demineralization next to orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 2010, December; 138:712.e1-712.e7. Only doi:10.1016/j.ajodo.2010.05.014.

Seppä L. The Future of preventive programs in countries with different systems for dental care. *Caries Research*, v.359 (suppl 1), p 26-29, 2001.

Shobha, T. Fluoride varnish versus acidulated phosphate fluoride for school children in Manipal. *J. Ind. Dent. Assoc., New Delhi.* 1987; 59(6,7,8,9): 157-160.

Silva, MFA.; Burgess RC; Sandham HJ; Jenkins GN. Effects of water-soluble components of cheese on experimental caries in humans. *Journal of Dental Research.* 1987;66: 38-41.

Sitthisettapong ,T; Phantumvanit ,P; Huebner , C ; DeRouen, T . Effect of CPP-ACP paste on dental caries in primary teeth: a randomized trial. *J Dent Res.* 2012 Setembro; 91 (9) : 847-852.

Soares, JMP; Valença, AMG. Avaliação Clínica do Potencial Terapêutico do Gel e Verniz Fluoretados na Remineralização de Lesões Cariosas Incipientes. *Rev.Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.,*2003; João Pessoa.3(2):35-41.

Somasundaram, P; Vimala N; Mandke, LG; Protective potential of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate containing paste on enamel surfaces. *J. Conserv Dent.* 2013 Mar-Apr; 16(2): 152–156.

Souza-Gabriel, AE. Progressão da lesão de cárie no esmalte dental após aplicação de compostos fluoretados e irradiação com laser de CO₂. [Tese] Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo, 2009.

Strateman, NW; Shannon, IL. Control of decalcification in orthodontic patients by daily self-administered application of a water-free 0.4 percent stannous fluoride gel. *The Journal of the American Dental Association.* 1974; 66(3): 273-9.

Szpunar, SM; Burt, DA. Trends in the prevalence of dental fluorosis in the United States: a review . J Public Health Dent, spring 1987; 47(2): 71-79.

Ten Cate, JM; Larsen MJ; Pearce EIF; Fejerskov O. Interações químicas entre o dente e os fluidos orais. In: Fejerskov, O; Kidd, E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.Ed Santos, São Paulo: 49- 69, 2007.

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

Vashisht, R; Rajamani Indira; Ramachandran, S; Kumar, A; Srinivasan, M R. Role of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate in remineralization of white spot lesio...Journal of Conservative Dentistry, 2013;16 (4): 342-346.

Watson TF. Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. Br Dent J. 1991;171:287–91.

White AJ, Yorath C, ten Hengel V, Leary SD, Huysmans MC, Barbour ME; Human and bovine enamel erosion under ‘single-drink’ conditions. Eur J Oral Sci. 2010 Dec; 118(6):604-9.

Zhang, Q; Zou J; Yanq R; Zhou X. Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. International Journal of Pediatric Dentistry 21(5): 374-381, 06/2011.

Zhou C, Zhang D , Bai Y , Li S .Casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate remineralization of primary teeth early enamel lesions journal of Dentistry 42. 2014; 21–29.2014(journalhomepage:www.intl.elsevierhealth.com/journals/jden)