SORAYA MAMELUQUE

**Tratamento preventivo do esmalte dental exposto à situação
de alto desafio cariogênico: estudo *in vitro***

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.

Catálogo da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Mameluque, Soraya

Tratamento preventivo do esmalte dental exposto à situação de alto desafio
Cariogênico: estudo *in vitro*. Ribeirão Preto, 2014

89 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

Mameluque S. Tratamento preventivo do esmalte dental exposto à situação de alto desafio cariogênico: 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: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICO ESTE TRABALHO

A **Deus**, pelo dom da vida e por iluminar meu caminho, sustentando-me nos momentos difíceis e me guiando no caminho do bem.

Aos meus pais, **Marcelo Mameluque Mota** (in memorian) e **Maria Miguel Mota**, pelo amor e apoio em todos os momentos, sempre me incentivando e guiando. Obrigada por me ensinarem a conquistar meus objetivos através da dedicação, da perseverança, do trabalho e do respeito ao próximo.

Aos meus irmãos, **Silvana, Athos e Aramis**, por estarem sempre presentes em minha vida. Agradeço pelo carinho, amizade, incentivo e apoio irrestrito. Meus eternos protetores, amo muito vocês.

Ao meu esposo, **Sérgio** e meus filhos, **Felipe** e **Marina**, pelo amor e pela doce presença em minha vida. Obrigada, amores da minha vida, pela paciência e compreensão ao longo desta jornada, quando não pude dar a atenção que vocês mereciam. Acredito, firmemente, que todos os sacrifícios enfrentados tornarão nossa história ainda mais bonita.

Enfim, agradeço e dedico este trabalho aos **familiares** e **amigos** que fazem parte da minha vida e torcem pelo meu sucesso, aqui representados por meu sobrinho/afilhado/filho do coração **Matheus** e pela amiga/colega **Luciana Palma**. O incentivo e a confiança de cada um de vocês sempre me impulsionaram e serviram de motivação para a busca de meus ideais. Divido com todos vocês essa conquista!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb**, pela oportunidade que me foi proporcionada, de aprendizado e crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela disponibilidade em todos os momentos e pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis. Sua orientação me guiou nesta missão de maneira firme e ao mesmo tempo doce.*

Tenho grande carinho e admiração por você. Muito obrigada!

*Aos Professores **Drs. Manoel Damião de Souza Neto, Antônio Miranda da Cruz Filho, Marcelo Oliveira Mazzetto**, por acreditarem em nosso potencial e pela generosidade na doação de seus ensinamentos e experiência neste Dinter FORP-USP/Unimontes.*

*Ao colega e amigo **Manoel Brito Júnior**, que com sua competência e determinação nos impulsionou à conquista deste objetivo, minha gratidão.*

*À **Dra. Juliana Jendiroba Faraoni Romano**, pela dedicação à pesquisa e pelo auxílio em todas as fases da realização deste trabalho. Sua disponibilidade, generosidade e amizade são encantadoras. Serei eternamente grata.*

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 Souza Neto**. Agradeço pela oportunidade concedida. Os ensinamentos aqui adquiridos certamente contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Ricardo Gariba Filho**, por sua acolhida e por ser um referencial em pesquisa científica.

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. Aline Evangelista Souza Gabriel** e **Prof. Dr. César Bataglione**.

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 levarem até nós seus conhecimentos e seu exemplo de dedicação à ciência: **Antônio Miranda da Cruz Filho, Jesus Djalma Pécora, Luiz Carlos Pardini, Manoel Damião de Souza Neto, Marcelo Oliveira Mazzetto, Regina Guenka Palma Dibb, Simone Cecilio Hallak Regalo e Silvio Rocha Correa da Silva.**

Ao **Prof. Dr. Luciano Bachmann** do Departamento de Física da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCL-USP, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

Às alunas da pós-graduação da FORP-USP, em especial **Júlia Olien Sanches**, com as quais dividimos agradáveis momentos.

Aos colegas de pós-graduação do DINTER FORP-USP/UNIMONTES: **Adrianne Calixto Freire de Paula, Agnaldo Rocha de Souza Jr., Altair Soares de Moura, Carla Cristina Camilo Araújo, Cássia Pérola dos Anjos Braga Pires, Deícola Coelho Filho, José Mendes da Silva, Manoel Brito Junior** e, em especial, **Tânia Coelho Rocha Caldeira**, com os quais convivi durante todo esse tempo, compartilhando angústias e dividindo conquistas. Obrigada pelo incentivo, apoio e amizade. Desejo sucesso a todos.

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, pela dedicação e atenção a mim dispensadas.

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.

Ao técnico Reginaldo Santana, do Laboratório de Pesquisa em Endodontia 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.

À Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. João dos Reis Canela**, pela oportunidade de qualificação profissional de alto nível a nós oferecida através do Doutorado Interinstitucional FORP-USP/UNIMONTES.

Aos colegas das disciplinas Clínica Integrada I e II do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes: **Desirée Sant’Ana Haikal, Eduardo Brandão Lima, Edwaldo de Souza Barbosa Junior, Maria Cleonice de Oliveira Nobre, Neilor Mateus Antunes Braga e Verônica Oliveira Dias**, pelo incentivo e apoio determinantes na minha busca por qualificação profissional.

À Coordenação de Saúde Bucal da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Montes Claros - MG, nas pessoas de **Daniel Antunes de Freitas e Marinilza Soares Mota Sales**, por entenderem a importância da pesquisa e da qualificação para um profissional da rede pública. Sou imensamente grata a vocês pelo apoio que recebi.

A 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.

***“Leve na sua memória para o resto de sua vida
as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades.***

***Elas serão uma prova de sua capacidade
em vencer as provas e lhe darão confiança
na presença divina, que nos auxilia
em qualquer situação, em qualquer tempo,
diante de qualquer obstáculo.”***

Chico Xavier

RESUMO

MAMELUQUE, S. **Tratamento preventivo do esmalte dental exposto à situação de alto desafio cariogênico: estudo in vitro**. 2014. 89p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes tratamentos na remineralização do esmalte desmineralizado em situação de alto desafio cariogênico. Foram utilizados 55 fragmentos de esmalte bovino (4mmX4mmX2mm) planificados e polidos. Os espécimes foram cobertos com resina composta ficando exposta apenas a metade da superfície externa (2mmX4mm) e então, foram imersos em solução tampão de acetato (pH 4,7) por 43 horas para formar a lesão de desmineralização. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=11), de acordo com os tratamentos preventivos: 1- Controle (sem tratamento); 2- Verniz fluoretado a 5% Duraphat®; 3- Flúor-gel 1,23%; 4- MI Paste™; e 5- MI Paste Plus™. Os tratamentos foram realizados uma vez por semana durante 3 semanas. Nos intervalos das aplicações os espécimes foram submetidos a ciclos de pH (DES/RE) num total de 21 dias. Após a finalização da ciclagem os fragmentos foram seccionados longitudinalmente, sendo que em uma metade foi analisada a microdureza longitudinal, pelo cálculo da variação percentual da dureza e na outra metade foi avaliada a profundidade de desmineralização do esmalte através de microscopia óptica. Para a análise em FTIR, pó do esmalte foi obtido dos espécimes em três diferentes momentos: inicial sem desmineralização da superfície, após a desmineralização por 43 horas e após o tratamento. Para análise da microdureza longitudinal empregou-se a variação da dureza. Os dados foram analisados quanto a sua distribuição, porém como não foram normais realizou-se uma análise não paramétrica comparando grupo contra grupo pelo Mann Whitney test com $\alpha=5\%$. Para análise da profundidade de desmineralização, como os dados se apresentaram normais e homogêneos, realizou-se a análise de variância a 1 critério e teste Holm-Sidak para comparação das médias com $\alpha=5\%$. Para análise em FTIR fez-se apenas uma análise descritiva dos dados. Na análise dos dados pode-se observar que houve diferença estatística significativa entre o grupo controle (G1) com o grupo flúor-gel (G3) ($p<0,05$), o qual apresentou menor perda de dureza e menor profundidade de desmineralização. Os grupos 2, 4 e 5 foram similares entre si e com o G1 para as duas propriedades analisadas. Na análise da absorbância nos diferentes comprimentos de onda pode-se observar um padrão similar em todas as amostras; a banda de fosfato inicial foi mais larga e posicionada em número de ondas menores. Após a desmineralização, esta banda ficou mais estreita e deslocada para número de ondas maiores. Esse comportamento se repetiu e foi similar para todos os grupo. Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que nenhum dos tratamentos preventivos realizados foi capaz de inibir o processo de desmineralização ou promover a remineralização em situações de alto risco a cárie, embora o flúor-gel tenha permitido uma evolução mais lenta da desmineralização.

Palavras-Chave: Esmalte dentário, Cárie dentária, Tratamentos preventivos, Microdureza, Microscopia óptica, Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

ABSTRACT

MAMELUQUE, S. **Preventive treatments of dental enamel exposed to high cariogenic challenge: *in vitro* study.** 2014. 89p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

The aim of this study was to evaluate different treatments on remineralization of demineralized enamel in a high cariogenic challenge. 55 enamel fragments (4mmX4mmX2mm) flat and polished were used. The specimens were covered with composite exposed only half of the outer surface (2mmX4mm) and then were immersed in acetate buffer solution (pH 4.7) for 43 hours to form the demineralization lesion. The specimens were randomly divided into 5 groups (n = 11) according with the preventive treatments: 1 - Control (no treatment); 2 - 5% fluoride varnish Duraphat ®; 3 - Fluoride-gel 1.23%; 4 - MI Paste TM; and 5 - MI Paste PlusTM. The treatments were carried out once a week for 3 weeks. During intervals and among applications the specimens were subjected to pH cycles (DES / RE) for a total of 21 days. After finished of the cycling, the samples were longitudinally sectioned, and one half in the longitudinal microhardness was analyzed and the other half the depth of enamel demineralization using optical microscopy was evaluated. For data analyzed was calculate the percentage change in the hardness. For FTIR analysis, the enamel powder was obtained from specimens at three different times: without demineralization of the surface, after demineralization for 43 hours and after treatment. Data were analyzed for their distribution, but they were not normal there was a non-parametric analysis comparing group versus group by t test (Mann-Whitney test) with $\alpha = 5\%$. To analyze the depth of demineralization, as the data were normal and homogeneous, we performed analysis of variance criterion 1 and Holm-Sidak test for comparison of means with $\alpha = 5\%$. For FTIR was realized of descriptive analysis of the data. Data analyzed showed statistically significant difference between the control group (G1) with the fluoride gel group (G3) ($p < 0.05$), which showed less loss of lower hardness and depth of demineralization. Groups 2, 4 and 5 were similar among them and with G1 for two properties analyzed. The analysis of the absorbance at different wavelengths can be observed a similar pattern in all samples; band initial phosphate was wider and placed on the number of smaller waves. After demineralization, this band became narrower and shifted to higher wave number. This behavior was similar for all groups and it is repeated for every group. Based on the results this study it can be concluded that none of the preventive treatment carried out was able to inhibit the demineralization or promote remineralization in high caries risk situations, although fluoride gel has allowed a slow evolution of demineralization.

Key-words: 1. Dental enamel 2. Dental caries 3. Preventive treatments 4. Microhardness 5. Optical microscopy 6. Spectroscopy, Fourier Transform Infrared

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da metodologia utilizada no preparo e seleção das amostras por microdureza superficial.....	41
Figura 2. Representação esquemática da metodologia utilizada na aplicação dos tratamentos propostos	44
Figura 3. Representação esquemática da metodologia utilizada na ciclagem de pH	45
Figura 4. Representação esquemática da metodologia utilizada para o preparo do espécime para as análises	46
Figura 5. Representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por microdureza	48
Figura 6. Representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por microscopia óptica	49
Figura 7. Representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	50
Figura 8. Representação gráfica da variabilidade da microdureza nas diferentes profundidades e tratamentos empregados.....	56
Figura 9. Lesão de desmineralização observada nos diferentes grupos.....	58
Figura 10. Gráfico representativo do grupo 1 – Controle.....	59
Figura 11. Gráfico representativo do grupo 2 – Verniz	60
Figura 12. Gráfico representativo do grupo 3 – Flúor gel	60
Figura 13. Gráfico representativo do grupo 4 – MI Paste	61
Figura 14. Gráfico representativo do grupo 5 – MI Paste Plus	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamento preventivo empregado nos diferentes grupos	42
Tabela 2. Média, desvio padrão e mediana em percentual (%) da variação de dureza dos diferentes grupos estudados	55
Tabela 3. Média, desvio padrão e mediana em percentual (%) da variação de dureza nas diferentes profundidades dos grupos estudados	56
Tabela 4. Média e desvio-padrão da desmineralização do esmalte dos diferentes grupos estudados (µm)	57

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	27
2. PROPOSIÇÃO	35
Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODO	39
Delineamento experimental.....	39
Obtenção dos espécimes	39
Microdureza superficial inicial.....	40
Desmineralização inicial	41
Tratamento dos espécimes	41
Ciclagem de pH.....	44
Preparo dos espécimes para as análises.....	46
Microdureza longitudinal	47
Microscopia óptica.....	48
Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	49
Análise dos Dados	51
4. RESULTADOS	55
Microdureza longitudinal	55
Profundidade de desmineralização	57
Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	59
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada uma das doenças crônicas mais prevalentes em adultos e crianças no mundo (Featherstone, 2000). De etiologia multifatorial, envolve microrganismos específicos, carboidratos fermentáveis, superfície dentária, características inerentes ao hospedeiro e tempo de exposição (Fejerskov, Kidd, 2011). Todos esses fatores desempenham um papel no processo dinâmico da desmineralização e remineralização que ocorre na superfície dentária (García-Godoy, Hicks, 2008).

Os dentes ao se irromperem na cavidade bucal são imediatamente cobertos por uma película adquirida, que consiste em uma camada protetora acelular de composição protéica. Essa película permanece continuamente presente na superfície dos dentes e, sendo formada imediatamente após a escovação ou limpeza profilática profissional, torna-se base sobre a qual se forma o biofilme dental (García-Godoy, Hicks, 2008).

Com o passar do tempo, e na contínua exposição aos fatores, o biofilme pode passar a ser colonizado por bactérias acidogênicas que poderão promover o início da desmineralização dos tecidos duros do dente por ácidos orgânicos produzidos pela fermentação de carboidratos e, conseqüentemente, lesões ativas em esmalte poderão ser produzidas. Esse tipo de lesão de mancha branca é comumente encontrado em áreas de maior estagnação de biofilme dentário, ou seja, nas superfícies cervicais, proximais e oclusais (Pinheiro et al., 2003). Caso não se intervenha no processo onde a desmineralização prevalece sobre a remineralização, a lesão de cárie pode evoluir até ter perdas consideráveis com a formação de cavidade (Chalmers, 2006; Reynolds, 2008; Thepyou et al., 2013).

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 (Pinheiro et al., 2006). Ela pode se apresentar ativa ou inativa e necessita de atuações clínicas diferenciadas em cada caso. Se não houver um tratamento adequado e direcionado para essas lesões iniciais de cárie, a doença irá progredir e lesões em dentina surgirão como consequência da ação das bactérias acidogênicas (Bussadori et al., 2006).

A formação da lesão de mancha branca em esmalte está diretamente atribuída ao efeito da acumulação e retenção prolongada do biofilme bacteriano visível (Mattousch, 2007), assim como à presença de *Streptococcus mutans* e lactobacilos (Ogaard et al., 1988) na saliva. Essas lesões podem persistir durante anos, resultando em regiões descalcificadas na estrutura do dente com potencial capacidade de deterioração, ao ponto de exigir uma restauração permanente (Ogaard et al., 1988).

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). Se, porventura, um processo contínuo de desmineralização ocorrer, essa lesão poderá progredir de uma descalcificação inicial, sem cavitação, para uma lesão cariosa ativa com aparecimento de cavidade (Fejerskov, Kidd, 2011).

Quando detectadas precocemente, estas lesões podem ser revertidas, com procedimento não-invasivo, através do uso de agentes remineralizantes (El-Sayad et al., 2009; Peters, 2010), que possui grande vantagem no manejo clínico (Carounanidy, Sathyanarayanan, 2010) por simples e rápida aplicação, demandando menor tempo clínico. Os requisitos básicos para agentes de remineralização incluem (Zero, 2009; Pitts, 2010; Borges et al., 2011): (1) ser seguro e exibir eficácia bioatividade, (2) apresentar precipitação rápida em dentes parcialmente desmineralizados, (3) se transformar em uma fase estável e resistente para posterior ataque de bactérias e outros agentes de erosão; (4) apresentar sinergismo com o flúor; (5) ser mais eficiente do que a desmineralização; (6) ser ativo tanto na superfície quanto na subsuperfície da lesão, e (7) ter a capacidade de se difundir através do biofilme e na lesão.

Para alcançar estes requisitos diferentes terapias preventivas têm sido estudadas com o intuito de controlar a desmineralização, melhorar a remineralização e, portanto, paralisar as lesões ativas de cárie (Robertson et al., 2011). Essas incluem a utilização de dentifrícios, géis e vernizes fluoretados; enxaguatórios bucais; antimicrobianos; gomas de xilitol e, recentemente, os derivados da caseína (Reynolds, 1995, 1997, 1999; Cochrane et al., 2010; Guzman-Armstrong, 2010).

A aplicação tópica de flúor tem sido, tradicionalmente, o método mais comum para evitar a desmineralização do esmalte (Pulido et al., 2008; Clark, 2011). Estudos sugerem que o uso rotineiro do flúor promove uma superfície menos susceptível à desmineralização (Soares, Valença 2003; Pulido et al., 2008; Clark, 2011; Zhou et al., 2014). No entanto, os regimes de fluoreto mais atuais dependem da adesão e colaboração do paciente e, infelizmente, aqueles que mais se favorecem com a aplicação do flúor suplementar devido às falhas na higiene bucal, são também os menos propensos a cumprir o tratamento (Clark, 2011). A inconsistência na cooperação do paciente tem sido um dos aspectos mais desafiadores quando no tratamento de lesões de mancha branca em pacientes ortodônticos (Clark, 2011).

A presença constante de flúor no meio bucal mediante a utilização dos métodos tópicos ocorre pela formação de depósitos de fluoreto de cálcio (CaF) sobre as superfícies de esmalte (Hebling, Bausells, 1997; Soares, Valença, 2003), servindo como um reservatório de íons flúor controlado pelo pH (Thylstrup, Fejerskov, 1995; Fejerskov, Kidd, 2011).

Na presença de flúor, a hidroxiapatita se comporta como fluorapatita, a qual se dissolve em meio bucal apenas quando o pH desce abaixo de aproximadamente 5,0 – 4,5. Isto significa que o pH crítico da desmineralização muda para cerca de aproximadamente 0,5 - 1,0 para um valor mais ácido de pH crítico. Além disso, quando o pH retorna para valores menos ácidos, acima do novo pH crítico, o flúor será incorporado no interior do tecido mineral tornando-o menos solúvel. Contudo é necessária a presença dos íons constantemente neste processo para que ocorram os efeitos desejáveis (Amaechi, van Loveren, 2013).

Aplicações tópicas de fluoretos são as formas mais importantes de uso desse elemento na prevenção da cárie dentária (Thylstrup, Fejerskov, 1995; Almeida, 2007; Belfort Carvalho Filho, 2010; Robertson et al., 2011; Lima, 2013). Dentre os que são administrados de forma tópica estão incluídos os géis e vernizes fluoretados, amplamente utilizados no Brasil. A aplicação de gel contendo flúor 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 (Chedid, Guedes-Pinto, 1984, Delbem et al., 2004; Belfort de Carvalho Filho, 2010).

Outra forma amplamente empregada é o verniz fluoretado que foi desenvolvido para prolongar o contato do flúor com a superfície do esmalte, pois aderem à superfície dos dentes por longos períodos (até 12 horas) (Belfort de Carvalho Filho, 2010; Cury et al., 2010; Lima, 2013). Apresenta-se como um material viscoso amarelado que, ao tomar presa, torna-se uma cobertura de cor marrom-amarelada sobre o dente e promove o aumento da formação de fluorapatita na superfície (Belfort de Carvalho Filho, 2010). Segundo Nicoló et al. (1997), as vantagens deste produto são a facilidade de aplicação, diminuição do tempo de trabalho, alta margem de segurança, além de não exigir do paciente elevada cooperação. Como desvantagem tem-se a descoloração temporária dos dentes no dia da aplicação, necessidade de evitar o consumo de alimentos duros durante o resto do dia e não escovar a região nesse dia (Warren et al., 2000).

Apesar do reconhecimento e aprovação pela Associação Dentária Americana e Canadense, bem como pela FDA (*Food and Drug Administration*) (Corrêa, 1998), os vernizes fluoretados têm demonstrado eficácia na prevenção da cárie tanto na dentição decídua quanto na permanente (Marinho et al., 2003). No entanto, o seu desempenho clínico em relação ao gel fluoretado ainda é divergente na literatura. Vem sendo demonstrado que ambos os produtos apresentam resultados semelhantes no tratamento de lesões cariosas iniciais (Soares, Valença, 2003), enquanto outros apontam o desempenho do verniz fluoretado como superior ao gel (Medeiros, Brum 1998; Medeiros, Marques, 1999, Santos et al., 2009). Contudo, os produtos fluoretados apresentam toxicidade e o seu uso tem que ser regular e periódico para se ter o efeito desejável.

Mais recentemente, estudos têm focado na concentração de cálcio e fosfato presente nos dentes, uma vez que eles são os principais componentes do dente e têm sido relacionados à desmineralização, e direcionados para sua deposição e intensificação na estrutura dentária (Pulido et al., 2008). O fosfato de cálcio amorfo (ACP) apresenta o benefício de ter ambos, cálcio e fosfato, juntos em uma fase amorfa sendo capaz de diminuir a desmineralização, aumentar a remineralização, ou ambos, durante um desafio ácido à superfície dos dentes (Reynolds, 1991, 1995, 1997; Pulido et al., 2008; Cochrane et al., 2010; Lima, 2013; Somasundaram et al., 2013). O ACP tem sido usado há muitos anos, mas vinha sendo um desafio evitar a formação de aglomerados, a precipitação destes íons em cristais e a formação de cálculos, além de sua incapacidade de se ligar à superfície dentária. Por outro lado,

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 cálcio e fosfato da estrutura dentária, criando um complexo semelhante ao fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Pulido et al., 2008).

Isso ajuda a solucionar um dos principais desafios na aplicação do ACP uma vez que a CPP não permite a combinação de cálcio e fosfato em cristais, prevenindo-os de alcançar a dimensão crítica para a precipitação. A CPP estabiliza as soluções de cálcio e fosfato formando o complexo CPP-ACP, sob condições alcalinas e neutras, criando um potencial estado supersaturado (Reynolds et al., 1995, 1997; Azarpazhooh, Limeback, 2008; Pulido et al., 2008). Essas soluções são liberadas pelo fosfopeptídeo de caseína, em torno do dente, quando na presença de um ambiente ácido (Hegde et al., 2007; Pulido et al., 2008).

O complexo CPP-ACP atua como reservatório de fosfato de cálcio, ampliando a quantidade desses íons no conteúdo fluido do biofilme, mantendo, assim, um estado de supersaturação em relação à matriz mineral do esmalte (Clark, 2011). A biodisponibilidade desses componentes remineralizantes combate os desafios ácidos na superfície do dente, potencializando o processo dinâmico da remineralização (Reynolds, 1991; Clark, 2011). O CPP-ACP liga-se prontamente à superfície do dente, bem como às bactérias presentes no biofilme. Desta forma, uma alta concentração de fosfato de cálcio amorfo (ACP) é depositada próximo à superfície do dente (Reynolds et al, 1995 e 1999; Azarpazhooh, Limeback, 2008; Clark, 2011).

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 a MI Paste™ e a MI Paste Plus™, uma evolução da MI Paste contendo incorporação de 900 ppm de flúor (GC América, Alsip, IL, EUA) (Reynolds, 1991; Clark, 2011). A MI Paste™ ganhou popularidade no tratamento de pacientes ortodônticos com lesões de mancha branca, tendo sido primariamente utilizada como agente dessensibilizante. O ingrediente ativo da MI Paste™ é o complexo fosfopeptídeo de caseína associado ao fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) (Reynolds, 1991; Azarpazhooh, Limeback, 2008).

Estudos utilizando esta pasta demonstraram sua eficácia evitando a progressão de lesões de mancha branca e reduzindo a desmineralização do esmalte (Pulido et al.,

2008; Robertson et al. 2011); assim como na remineralização do esmalte erodido (Tantbirojn et al., 2008; Vashisht et al., 2013). Apesar disso, não há estudos clínicos suficientes, em quantidade e em qualidade, em relação à efetividade a longo prazo destes produtos na prevenção da doença cárie e no tratamento de hipersensibilidade dentinária e boca seca (Azarpazhooh, Limeback 2008).

O estudo de terapias para a prevenção de cárie exige que as lesões desenvolvidas e pequenas alterações no conteúdo mineral da estrutura possam ser identificadas. Entre os métodos desenvolvidos para mensuração das alterações minerais em estudos *in vitro*, a utilização das técnicas de microdureza em corte transversal (Castellan et al., 2007; Delbem et al., 2009), microscopia óptica (Kamburoğlu et al., 2011) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR (Correa-Afonso et al., 2012) têm sido consideradas eficientes.

A microdureza é uma propriedade física que permite avaliar a ação de agentes químicos e/ou físicos sobre a superfície dentária. A dureza de um material está diretamente relacionada com a resistência apresentada em relação à penetração. Quanto maior a penetração, menor a dureza (Soares, 2004). Assim, emprega-se essa metodologia para verificar indiretamente as perdas minerais das estruturas dentais.

A microscopia óptica é um excelente método para determinar a extensão do processo de desmineralização, pois pequenas variações minerais levam a alteração da difração e refração da luz e permite visualizá-la, sendo adequado para complementar os achados da microdureza (Raucci-Neto 2013).

Atualmente a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido utilizada para avaliar alterações na estrutura química do esmalte dental humano (Antunes et al., 2006), pois permite identificar compostos químicos pela interação do comprimento de onda emitido entre 4000 e 400 cm^{-1} e assim identifica os espectros de absorção, constituídos pela somatória das bandas de absorção originárias dos compostos químicos presentes no substrato (Raucci-Neto, 2013).

Apesar dos diferentes tipos de tratamentos existentes para prevenção de cárie, poucos estudos têm verificado a sua atuação quando usados em situações de alto risco em que não se consegue reverter o quadro. Outro importante ponto que ainda requer investigações se refere à longevidade destes tratamentos, uma vez que os tecidos dentais duros de pacientes de alto risco à cárie sofrem constantemente desafios cariogênicos, sendo necessário mais estudos sobre o assunto.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar diferentes tratamentos preventivos na remineralização do esmalte desmineralizado em situação de alto desafio cariogênico com constantes desafios.

Objetivos específicos

- 1- Avaliar o efeito preventivo *in vitro* de diferentes tratamentos remineralizantes sobre a microdureza longitudinal do esmalte dental.
- 2- Avaliar a profundidade da desmineralização do esmalte dental após os tratamentos/desafios, através da microscopia óptica.
- 3- Avaliar o fosfato presente através da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) antes e após a aplicação dos tratamentos preventivos.

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

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; gel de flúor fosfato a 1,23%, MI Paste e MI Paste Plus. 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: análise da perda mineral por meio da variação da porcentagem de microdureza da subsuperfície em diferentes profundidades Knoop (KNH), profundidade de desmineralização do esmalte dental por meio da microscopia óptica e quantificação do fosfato presente em diferentes tempos por meio de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

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 os fragmentos de esmalte nas dimensões de 4x4mm, excluindo-se o terço cervical.

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.

Microdureza superficial inicial

Com o objetivo de selecionar os 55 espécimes utilizados de um total de 90 espécimes, a análise da microdureza inicial dos mesmos foi realizada 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 (AC). A outra metade, que ficou exposta, foi submetida aos desafios erosivos ($\approx 8\text{mm}^2$), representando a área experimental (AE). A representação esquemática da metodologia utilizada para obtenção do espécime está exemplificada na figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da metodologia utilizada no preparo e seleção das amostras por microdureza superficial.

Desmineralização inicial

Após a seleção, os espécimes foram submetidos à formação da lesão de desmineralização, até obter-se uma lesão de mancha branca grau 2 segundo Pitts (2010). 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.

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 (Colgate)	álcool, resinas naturais, cera, sacarina, sabor, 22600 ppm de NaF
G3	Flúor fosfato acidulado (FFA) a 1,23% pH 3,5, Flugel DFL	Fluoreto de sódio (NaF) a 1,23% adicionado a 0,1M de ácido fosfórico tamponado em um pH entre 3 e 4
G4	MI Paste (Recaldent™, GC Corporation, Tokyo, Japão)	água, glicerol, CPP-ACP 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 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 seguindo as recomendações dos fabricantes da seguinte forma:

- 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: a 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.
- G4. MI Paste (Recaldent™, 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 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 jatos de água deionizada .

Após cada tratamento, os espécimes foram imersos em saliva artificial por seis horas e depois iniciado os ciclos de pH com a 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 na aplicação dos tratamentos está exemplificada na figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da metodologia utilizada na aplicação dos tratamentos propostos.

Ciclagem de pH

Após 6 horas da finalização do tratamento, os espécimes foram submetidos à ciclagem de pH por 21 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. A cada 7 dias os espécimes foram lavados com água deionizada e submetidos novamente ao tratamento. Após os tratamentos os espécimes foram lavados e deixados em saliva artificial por 6h. No G2 o verniz foi removido cuidadosamente, para então reiniciar a ciclagem pela solução desmineralizante. O volume utilizado para as soluções desmineralizante $[2,0\text{mmolL}^{-1}]$

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,075 \text{ mmolL}^{-1}$ tampão de acetato, $0,02 \text{ ppmF}$, $\text{pH} 4,7$] e remineralizante [$1,5 \text{ mmolL}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,9 \text{ mmolL}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,150 \text{ mmolL}^{-1}$ KCl , $0,1 \text{ molL}^{-1}$ Tris, $0,03 \text{ ppmF}$, $\text{pH} 7,0$] foi baseada no estudo de Queiroz et al. (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. O experimento foi realizado a 37°C . Após o 20º dia os espécimes foram mantidos na saliva por 24h, totalizando um período experimental de 21 dias, sendo então realizadas as análises. A representação esquemática da metodologia utilizada na ciclagem de pH está exemplificada na figura 3.

Figura 3. Representação esquemática da metodologia utilizada na ciclagem de pH.

Preparo dos espécimes para as análises

Após a realização dos tratamentos/ciclagem os espécimes foram seccionados longitudinalmente em duas metades. O corte foi realizado de modo que em cada secção (ou metade) houvesse tanto a área controle como a área experimental. Foram obtidas 2 fatias finas (cerca de 0,8mm) de uma secção, para análise da profundidade de desmineralização por microscopia óptica, enquanto que a outra metade foi utilizada para o teste de microdureza longitudinal. A representação esquemática da metodologia utilizada para o preparo do espécime para as análises está exemplificada na figura 4.

Figura 4. Representação esquemática da metodologia utilizada para o preparo do espécime para as análises.

Microdureza longitudinal

Após a secção dos espécimes (n=11), a metade destinada à análise de microdureza foi levada em politriz (Arotec APL-4, Brasil), sob refrigeração, utilizando-se lixas d'água de granulação 600 e 1200 e disco de feltro com pasta de alumina, para polimento, até a obtenção de uma superfície lisa e brilhante.

As indentações foram realizadas em uma das hemi-secções utilizando-se um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMT-2000, Japan), com auxílio de um penetrador de diamante para dureza Knoop (KNH) aplicando uma carga estática de 25gf com duração de 5s, de maneira que a ponta do penetrador se mantivesse paralela à superfície do esmalte. As áreas analisadas foram a área Controle (AC), e a área Experimental (AE), onde foram realizados a desmineralização inicial, os tratamentos e a ciclagem de pH. As indentações foram realizadas na região de subsuperfície da lesão formada, tanto da área experimental como da área controle. A primeira marcação foi localizada 30 µm abaixo da região superficial e as marcações seguintes foram realizadas a 70 e 110µm na mesma direção. Para cada amostra foram feitas 3 indentações para cada profundidade com 100µm de distância entre elas, totalizando 18 indentações em cada espécime. A medida foi feita em ambas as regiões (área controle e experimental) para avaliar a variação da dureza (VD) para cada espécime. Foi obtida uma média para cada profundidade e região. Com esses valores médios empregou-se a formula:

$$\%VD = \text{Microdureza da área experimental} \times 100 / \text{microdureza da área controle}$$

Foram obtidas as variações de dureza para cada profundidade e também geral para realizar a análise dos dados.

A representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por microdureza está exemplificada na figura 5.

Figura 5. Representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por microdureza.

Microscopia óptica

Foram utilizadas para esta análise secções de 0,8 mm de espessura (2 secções por espécime) obtidas da outra metade do espécime, utilizando disco diamantado (#7015, KG Sorensen, Barueri, 06454-920, Brasil) adaptado em máquina de corte (Minitom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Dinamarca). Posteriormente estas secções foram planificadas e polidas manualmente utilizando lixas d'água (Norton Abrasivos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) de granulação 600 e 1200 e polidas até chegar a uma espessura de 150µm, conferida por paquímetro. As secções foram então observadas em um microscópio óptico (Zeiss) utilizando água deionizada como meio de embebição. As imagens foram capturadas com objetiva de 10x e digitalizadas para análise da subsuperfície de esmalte e com auxílio de um software (AxioVision Rel. 4.8.2) foi possível quantificar a área desmineralizada. Foram

realizadas 15 leituras da profundidade da desmineralização e empregada a média dessas medidas. A representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por microscopia ótica está exemplificada na figura 6.

Figura 6. Representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por microscopia ótica.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para a análise em FTIR, pó do esmalte superficial foi obtido dos espécimes em três momentos diferentes, inicial sem desmineralização da superfície, após a desmineralização por 43 horas e após o tratamento. Para este procedimento foram utilizadas brocas de aço 1/8 em baixa-rotação e foram limpas com álcool isopropílico a cada análise, para a produção de pequena quantidade de pó do substrato. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de uma lupa estereoscópica em um aumento de 10X, com o objetivo de remover somente o esmalte superficial. A quantidade de pó de cada espécime não foi mensurada porque a medida

experimental a ser utilizada no espectrômetro de FTIR independe da massa da amostra.

Após a obtenção das raspas de esmalte, estas foram posicionadas sobre o detector de ATR (Atenuated Total Reflectance) de diamante, com diâmetro de 2 mm (Durascope, Smiths Detection, EUA). Este acessório está acoplado ao espectrômetro de transformada de Fourier (Nicolet 380, Nicolet, EUA). Foram analisados três espécimes de cada grupo. A medida experimental consistiu na aquisição do espectro de absorbância na região entre $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ com resolução de $0,5\text{cm}^{-1}$ e 32 varreduras para cada espectro adquirido. Foram identificadas 2 bandas, PO(4) (fosfato) e CO(3) (carbonato), sendo estas utilizadas para descrever as diferenças na composição química das superfícies de esmalte analisadas. Foram registradas para análise as razões entre a concentração de carbonato e fosfato de cada amostra de esmalte obtida. Como em todo espécime foram obtidas raspas removidas em triplicata, foram gerados 3 espectros de absorção (3 razões de CO(3)/PO(4)). A representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier está exemplificada na figura 7.

Figura 7. Representação esquemática da metodologia utilizada na avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

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:

- Para análise da **microdureza longitudinal** empregou-se a variação da dureza. Esses dados foram analisados quanto a sua distribuição, porém como não foram normais optou-se em realizar uma análise não paramétrica comparando grupo contra grupo pelo teste t (Mann Whitney test) com $\alpha=5\%$.
- Para análise da **profundidade de desmineralização** como os dados se apresentaram normais e homogêneos realizou-se a análise de variância a 1 critério e teste Holm-Sidak para comparação das médias com $\alpha=5\%$.
- Para análise em **FTIR** foi realizada apenas uma análise descritiva dos dados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Microdureza longitudinal

Na análise dos dados pode-se observar que houve diferença estatística significativa entre o grupo controle (G1) com o grupo flúor-gel (G3) ($p < 0,05$), sendo que uma menor dureza foi observada para o grupo controle, no qual não se realizou tratamento. Contudo, os demais grupos não diferiram significativamente com o grupo controle, bem como entre eles (Tabela 2), ou seja, $G3 \neq G1$; $G3 \approx G2 \approx G4 \approx G5$ e $G1 \approx G2 \approx G4 \approx G5$. A tabela 2 descreve a média, o desvio padrão e a mediana observados em cada grupo, bem como a probabilidade estatística.

Tabela 2. Média, desvio padrão e mediana em percentual (%) da variação de dureza dos diferentes grupos estudados.

Grupo Controle	Grupos experimentais	Probabilidade
G1 - 63,04±9,65 (59,71)	G2 - 73,40±21,90 (75,29)	ns
	G3 - 83,17±21,90 (78,55)	p=0,036
	G4 - 71,66±24,66 (66,33)	ns
	G5 - 68,35±22,36 (57,19)	ns

Na análise das diferentes profundidades observou-se que a 30 μm apenas o G3 apresentou diferença estatística significativa com o G1 ($p < 0,05$) e semelhança aos outros grupos experimentais ($p > 0,05$). Nas outras profundidades não se observou diferença estatística entre os grupos. Individualmente observou-se que todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a profundidade de 30 μm com 70 μm e 110 μm , sendo estas semelhantes entre si (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3. Média, desvio padrão e mediana em percentual (%) da variação de dureza nas diferentes profundidades dos grupos estudados.

	30μm	70μm	110μm
G1	4,02±0,82 (6,36) aA	89,58±22,04 (85,97) aB	96,17±12,20 (96,47) aB
G2	30,99±37,71(23,23) abA	84,82±20,08(93,85) aB	104,38±24,97 (98,31) aB
G3	48,86±36,04 (51,10) bA	99,15±25,61(90,40) aB	101,51±22,01 (96,34) aB
G4	34,21±46,23 (22,54) abA	87,41±22,16 (85,98) aB	93,35±23,01 (86,31) aB
G5	29,15±36,42 (12,26) abA	64,43±38,95(83,35) aB	90,46±19,37 (88,83) aB

Letras minúsculas - comparação na coluna (vertical) ao nível de 5%; Letras maiúsculas - comparação na linha (horizontal).

Figura 8. Representação gráfica da variabilidade da microdureza nas diferentes profundidades e tratamentos empregados.

Profundidade de desmineralização

Na análise dos dados da microscopia óptica observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo 3, tendo este apresentado menor profundidade de desmineralização. Os outros grupos experimentais foram semelhantes ao grupo controle ($p > 0,05$), e entre si, conforme a tabela 4 a qual descreve a média e desvio padrão observados em cada grupo.

Tabela 4. Média e desvio-padrão da desmineralização do esmalte dos diferentes grupos estudados (μm).

Grupos	Média $\pm$ DP
G1	94,8 $\pm$ 38,2 a
G2	87,9 $\pm$ 37,7 ab
G3	52,9 $\pm$ 17,3 b
G4	66,1 $\pm$ 27,8 ab
G5	73,3 $\pm$ 17,4 ab

Letras diferentes significam diferença

Observa-se na figura 9 a lesão de desmineralização para todos os grupos, tendo o grupo 3 apresentado uma lesão muito menor que o controle, o qual apresentou perda estrutural superficial.

Figura 9. Lesão de desmineralização observada nos diferentes grupos (indicado pela seta). Observa-se menor lesão no G3.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na análise da absorção nos diferentes comprimentos de onda pode-se observar um padrão similar em todas as amostras, a banda de fosfato inicial foi mais larga e posicionada em número de ondas menores. Após a desmineralização, esta banda ficou mais estreita e deslocada para número de ondas maiores. Após os tratamentos, pode-se observar deslocamentos para valores intermediários entre o valor inicial e o desmineralizado, mas mantendo a banda similar ao grupo sem tratamento (controle).

Figura 10. Gráfico representativo do grupo 1 - controle.

Figura 11. Gráfico representativo do grupo 2 – verniz.

Figura 12. Gráfico representativo do grupo 3 – flúor gel.

Figura 13. Gráfico representativo do grupo 4 – MI Paste.

Figura 14. Gráfico representativo do grupo 5 – MI Paste Plus.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

De etiologia multifatorial, a cárie envolve a interação entre microrganismos específicos, carboidratos fermentáveis, superfície dentária, características inerentes ao hospedeiro e tempo de exposição (García-Godoy, Hicks, 2008). Essa interação resulta em ciclos consecutivos de desmineralização (DES) e remineralização (RE), em que a DES se sobrepõe aos efeitos da RE, isto é, a perda mineral predomina em relação ao ganho mineral (García-Godoy, Hicks, 2008; Buzalaf et al., 2011; Fejerskov, Kidd, 2011).

A dinâmica do biofilme em termos de pH e concentração de cálcio, fosfato e fluoreto pode levar ao desenvolvimento do primeiro sinal clínico da lesão cariosa que se manifesta como mancha branca. A mancha branca é detectável clinicamente em função da presença de poros no esmalte que são ocupados por ar ou água, cujos índices de refração são diferentes da apatita dentária (Christoffersen, 1986; Fejerskov, Kidd, 2011). Uma vez que a mancha branca representa um estágio inicial da lesão cariosa, na qual o processo pode ser revertido ou controlado, evitando a formação de cavidades, o presente estudo objetivou avaliar o método mais efetivo para a paralisação e/ou regressão da lesão de mancha branca em situações de alto desafio cariogênico.

O modelo de estudo foi *in vitro*, pois este é capaz de simular a dinâmica da perda e do ganho mineral dos tecidos dentários, de uma forma barata, rápida e sensível o suficiente para avaliar a eficácia de diferentes agentes preventivos (Moron, 2011). Apesar destas vantagens, o modelo *in vitro* apresenta limitações significantes pela sua inabilidade em simular o processo biológico complexo que envolve a formação de lesão cariosa como ocorre *in vivo* (White, 1995).

Neste estudo, optou-se por realizar a desmineralização inicial por 43 horas com o objetivo de se obterem lesões microscópicas/macrocópicas de cárie ativa e justificar o uso dos tratamentos propostos (as lesões apresentavam-se brancas sem necessidade de secagem, classificando-se como grau 2 segundo Pitts 2010). Soluções desmineralizantes com ácido acético, como a usada neste estudo, produzem uma lesão aproximadamente 1,5 vezes mais profunda e com menor intervalo de tempo quando comparada à solução com ácido láctico na mesma concentração e pH (Moron, 2011). Embora o ácido láctico seja um ácido mais forte

em qualquer pH e concentração, uma maior proporção do ácido acético está na forma não ionizada, o que sugere uma difusão mais prolongada para dentro do substrato (Amaechi et al., 1999; Moron, 2011).

Os estudos *in vitro* podem ser realizados com dentes humanos ou bovinos (Buskes et al., 1985; ten Cate, 1994; Amaechi et al., 1999; Clasen, Ogaard, 1999), contudo os dentes bovinos são comumente utilizados em estudos laboratoriais por serem facilmente obtidos, possuírem tamanho amplo e não possuírem restrições éticas (Tanaka et al., 2008; Belfort de Carvalho Filho, 2010). Além disso, o dente bovino possui composição química mais uniforme (Mellberg, 1992; Oshiro et al., 2007), podendo produzir resposta aos desafios cariogênicos com menor variação (Oshiro et al., 2007; Souza-Gabriel, 2009) mesmo sendo mais poroso que o humano (Mellberg, 1992). Uma grande vantagem deste substrato é que o processo de desmineralização é mais rápido no esmalte bovino permitindo avaliar os efeitos num menor espaço de tempo. Apesar disso, as lesões cariosas produzidas têm estrutura microscópica similar às humanas (Mellberg, 1992; Ogaard, Rolla, 1992; Clasen, Ogaard, 1999; Moron, 2011, Lima, 2013). Assim o presente estudo optou pelo emprego do esmalte bovino para sua realização.

Após a primeira aplicação dos tratamentos, empregou-se a ciclagem de pH, que é um método *in vitro* no qual o substrato dental é mantido em solução desmineralizante, composta de tampões ácidos com cálcio e fosfato em baixo pH, com o objetivo de simular os episódios de queda de pH que ocorrem no biofilme dental e na superfície do esmalte. O estágio de remineralização é simulado com a imersão do fragmento dental em soluções contendo cálcio e fosfato em um grau de saturação semelhante ao da saliva (Tagliaferro et al., 2007). Através da ciclagem, tem-se a simulação dos processos de DES (Arends et al., 1992; Featherstone et al., 1993) e RE (Damato et al., 1990; White, 1987). Para simular uma situação de alto desafio cariogênico optou-se no presente estudo em realizar a ciclagem durante 21 dias após o primeiro tratamento, com 4 horas diárias de imersão em solução DES e 20 horas de RE. Este modelo de ciclagem foi baseado no trabalho de Queiroz (2004) que desenvolveu e validou modelos *in vitro*.

Por mais padronizado que seja, o processo de desmineralização mostra algumas variabilidades. As diferenças nas propriedades físicas e mecânicas das lesões produzidas por diferentes protocolos podem influenciar os resultados de subseqüentes desmineralizações e remineralizações (Moron, 2011). A exposição à

solução desmineralizante à base de acetato por períodos de 4 horas durante vários dias pode ter levado alguns espécimes a sofrerem uma degradação superficial muito intensa no presente estudo. Além disso, os dentes bovinos são menos mineralizados que os humanos (Mellberg, 1992) e as lesões de cárie artificial formadas em esmalte de dentes bovinos têm demonstrado ser duas vezes mais profundas que as formadas em dentes humanos (Edmunds et al., 1988; Pulido et al., 2008). Apesar disso, a perda mineral intensa não afetou os resultados observados, podendo contudo, ter ocultado algum possível efeito de inibição da desmineralização nos tratamentos realizados. Este fato também foi observado por Pulido et al. (2008), que verificaram uma porcentagem elevada de secções com algum tipo de erosão presente sobre a superfície externa da lesão no final do tratamento, sugerindo que o modelo de lesão de progressão usada em seu estudo pode ter sido demasiadamente rápido. Segundo os autores, esta erosão poderia ter ocultado um leve efeito na inibição da desmineralização conseguida com qualquer um dos produtos remineralizadores testados.

Outro fato que deve ser levado em conta é o polimento da superfície dos espécimes feito antes do teste de microdureza inicial, para seleção da amostra. Este polimento é importante para obtenção de resultados precisos, com pouca variação (Corrêa, 2008; Srinivasan et al., 2010). Porém, o esmalte polido pode ser mais susceptível à desmineralização, pois, inevitavelmente remove-se a camada externa da superfície do esmalte, que por sua vez é mais resistente do que as camadas internas (Attin, 2006; Meurman, Frank, 1991; Corrêa, 2008). Diferentes métodos são utilizados para avaliar a capacidade de inibição da progressão de cárie no esmalte, entre eles, tem-se a análise da microdureza da subsuperfície que foi submetida ao desafio cariogênico (Featherstone et al., 1998; Kantorowitz et al., 1998; Tagliaferro et al., 2007; Steiner-Oliveira et al., 2008; Esteves-Oliveira et al., 2009; Souza-Gabriel, 2009). A microdureza é uma técnica rápida e reconhecida como um dos métodos mais sensíveis para investigar desmineralização do esmalte (White et al., 2010), sendo por isso utilizada neste estudo. Tem sido demonstrado que a dureza do esmalte diminui em função do tempo de exposição ao ácido e, portanto, pode ser utilizada como uma indicação do grau de desmineralização (White et al., 2010; Barbour et al., 2005). É um método mecânico, sítio-dependente e específico para avaliação da perda ou ganho de mineral pelo tamanho da indentação, porém não permite a avaliação da localização e distribuição de minerais, bem como o desgaste

do tecido dental (Zero, 1995). A dureza longitudinal (CSH) dá uma importante evidência sobre as propriedades mecânicas do tecido desmineralizado em profundidade (Moron, 2011). Embora a análise da dureza seja facilmente realizada utilizando-se um equipamento mais barato em comparação a outras técnicas, apresenta certas limitações para avaliação da desmineralização por cárie, tais como: (1) sofre influência da quantidade de material orgânico e grau de umidade do tecido durante a realização da indentação; (2) não é tão sensível para medir alterações nos primeiros 10µm da subsuperfície do tecido dentário, pelo tamanho da indentação (Clasen; Ogaard, 1999; Attin, 2006) e (3) não é possível definir precisamente a partir de qual profundidade o esmalte/dentina já apresentam-se sadios (Moron, 2011). Sendo assim, associou-se a análise por microscopia óptica da lesão e a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier - FTIR para obtenção de dados mais precisos do processo de desmineralização.

Muitos produtos vêm sendo empregados para o tratamento preventivo da lesão de desmineralização, sendo os mais comumente empregados os fluoretos em diferentes formas (Santos et al., 2009; Belfort Carvalho Filho, 2010; Jayarajan et al., 2011; Robertson et al., 2011; Lima, 2013). Um dos métodos mais amplamente empregados e com comprovada eficiência é o gel fluoretado. Sua aplicação é fácil, prática, de boa aceitação e custo reduzido, com clara evidência de efeitos inibidores da cárie dentária. (Chedid, Guedes-Pinto, 1984, Delbem et al., 2004; Belfort de Carvalho Filho, 2010). Assim, devido a essas características, o presente estudo optou pela sua utilização.

Porém, em consultório, outro método que vem sendo muito empregado é o verniz fluoretado, pois prolonga o contato entre o esmalte e íons flúor, com o aumento da formação de fluorapatita na superfície (Belfort de Carvalho Filho, 2010, Lima, 2013), além de ser de fácil aplicação, menor tempo de trabalho, alta margem de segurança e não exigir do paciente elevada cooperação (Nicoló et al., 1997), o que levou à sua utilização neste trabalho.

Mais recentemente, produtos derivados da caseína têm mostrado efeito benéfico na prevenção e inibição da lesão de cárie. O fosfopeptídeo de caseína com fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) parece ser um composto capaz de intervir na dinâmica do processo de desmineralização/remineralização, diminuindo a desmineralização e aumentando o processo oposto durante um desafio ácido à superfície dos dentes (Reynolds, 1991; Oshiro, et al., 2007; Somasundaram et al.,

2013). Apresenta ainda a vantagem de não causar fluorose dental, problema cuja prevalência e gravidade tem aumentado em todos os países, (Buzalaf et al., 2011; Zhou et al., 2014) levando à busca por agentes alternativos que complementem ou substituam o flúor (Thepyou et al., 2013). Em virtude destas características decidiu-se pelo seu uso no presente estudo, em suas versões sem flúor (MI Paste®) e com adição de 900 ppm de flúor (MI Paste Plus®).

Ao analisar os resultados obtidos neste estudo, pode-se observar menor profundidade de desmineralização e maiores valores de microdureza do esmalte com a aplicação de flúor gel (Grupo 3) em comparação com o grupo controle (que não fez nenhum tratamento na superfície). Estes resultados são semelhantes ao observados na literatura que também trazem resultados positivos na paralização/remineralização de lesões de mancha branca com o uso de produtos com alta concentração de flúor, especialmente o flúor-gel (Yamazaki et al., 2007; Belfort de Carvalho Filho, 2010; Lima, 2013).

Este fato pode ser explicado pela ação efetiva do flúor-gel que se dá devido à formação de uma barreira mecânica por meio da deposição de fluoreto de cálcio na superfície dentária (Magalhães et al., 2008), o qual é formado a partir de uma aplicação tópica de fluoreto ionizável e, posteriormente, é recoberto por fósforo e proteínas (Christoffersen et al., 1988). Além da barreira mecânica, o fluoreto liberado do fluoreto de cálcio, juntamente com o fluoreto presente na saliva apresenta um importante papel na remineralização de uma lesão desmineralizada. Quando há fluoreto suficiente no meio bucal, haverá a formação da hidroxiapatita fluoretada, o que torna o esmalte menos solúvel para o próximo ataque (Corrêa, 2008; Magalhães et al., 2008). Somado a isso, a presença de fluoretos propicia a melhora das propriedades da superfície do esmalte, incluindo o aumento da dureza e do módulo de elasticidade e diminuindo a rugosidade da superfície do esmalte (Zhou et al., 2014). Esses produtos funcionam ainda como reservatórios de flúor do esmalte dental, liberando-o gradativamente e mantendo flúor disponível no fluido do biofilme para interferir com os processos de des-remineralização, diminuindo a perda mineral durante as quedas de pH ocorridas no biofilme dental quando da exposição ao açúcar. Nessas ocasiões, o flúor presente no fluido do biofilme garante sua supersaturação promovendo a precipitação desse mineral ao mesmo tempo em que ocorre a dissolução da hidroxiapatita (Cury et al., 2010). Outro ponto favorável observado, é que o flúor incorporado ao cristal do esmalte aumenta a resistência à

desmineralização e interfere na velocidade de progressão da lesão, uma vez que as lesões formadas na presença deste íon apresentam menor profundidade e extensão (Silverstone, 1977; Portella, Gonçalves, 1989; Cruz et al., 1991; Cury, 1991; Medeiros, Souza, 1994; Zero, 1999; Takagi et al., 2000), como observado no presente estudo.

É de suma importância a contínua presença de flúor na cavidade bucal para reduzir o grau de desmineralização do esmalte em situações de alto risco (Shobha et al., 1987; Medeiros, Marques, 1999; Soares, Valença, 2003; Delbem et al., 2004; Santos et al., 2009; Murakami et al., 2009). Entretanto, no presente trabalho, embora o flúor-gel tenha se mostrado capaz de tornar a perda mineral mais lenta em relação ao grupo controle não se pode considerar que tenha havido paralisação e muito menos reversão das lesões. Isso pode ter acontecido em decorrência da intensidade do desafio cariogênico e da ausência de fatores protetores próprios do ambiente bucal.

Por sua vez, o verniz fluoretado não apresentou bom desempenho no presente trabalho, tanto em relação aos valores de microdureza quanto na análise da profundidade de desmineralização. Comportamento similar ao grupo controle foi verificado, apesar de ser um material que apresenta mecanismo duplo de proteção do esmalte dental sendo o primeiro, a substituição de grupos hidroxila do complexo cristalino da hidroxiapatita (Soares, Valença, 2003) e o segundo a proteção mecânica imposta pelo mesmo (Belfort de Carvalho Filho, 2010).

Este fato provavelmente ocorreu devido o verniz fluoretado ter sido removido após 6 horas de sua aplicação, antes de iniciar um novo ciclo de pH. Esse tempo pode não ter sido suficiente para prevenir o processo de desmineralização, uma vez que a vantagem do verniz se dá por sua permanência na superfície dental por um período maior (Attin et al., 2005). Alguns estudos verificaram que o verniz fluoretado em contato com a superfície do esmalte por um tempo maior antes da remoção (24 horas) (Carvalho et al., 2013) ou a não remoção (Lima, 2013) proporcionou melhores resultados e que a remoção precoce da película do produto elimina o fator proteção mecânica (Belfort de Carvalho Filho, 2010). Além disso, após a aplicação, deve-se instruir o paciente a não escovar os dentes e manter uma dieta pastosa por 12 horas (Soares, Valença, 2003; Séllós et al., 2008).

Outro fator a ser considerado é que ao aplicar o verniz fluoretado clinicamente, os profissionais removem o biofilme bacteriano que é o responsável

pelo processo, o que também deixa a substância em íntimo contato com o dente condizentes com os resultados obtidos por Marinho et al. (2002) em verificaram 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.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os achados da literatura, que não observaram efeito clínico adicional na inativação de lesões iniciais de dentes decíduos com a aplicação de verniz fluoretado (Séllos et al., 2008). Nem o verniz Duraphat mostrou proteção suficiente contra o desenvolvimento da desmineralização apesar de conter a mais alta concentração de flúor (Carvalho et al. (2013). Lesões incipientes de cárie têm uma superfície de esmalte relativamente intacta e uma lesão de subsuperfície muito mais profunda (Srinivasan et al., 2010). O aumento dos níveis de flúor tópico na superfície conduz a uma rápida precipitação de minerais no esmalte poroso e produz a obliteração da lesão, mantendo uma subsuperfície desmineralizada (García-Godoy, Hicks, 2008; Clark, 2011). Doses elevadas de flúor utilizadas na superfície porosa das lesões de mancha branca afetam principalmente a superfície externa, inibindo assim, a total remineralização da lesão na subsuperfície (Ogaard, 1988). Embora, a presença de baixos níveis de flúor apresente muitas propriedades benéficas, quantidades excessivas podem demonstrar efeitos adversos (Soares,Valença, 2003). Por este motivo, há uma preocupação para os riscos de terapias com altas concentrações de flúor. Isso é especialmente importante quando se realiza teste de microdureza longitudinal onde se avalia a subsuperfície da lesão, podendo justificar os resultados encontrados para o verniz no presente trabalho.

Ao se comparar os resultados do flúor gel com o verniz fluoretado, uma similaridade de comportamento foi observada no presente estudo. Resultados semelhantes foram observados por Soares e Valença (2003). Entretanto, alguns autores (Medeiros, Brum,1998; Santos et al., 2009; Souza-Gabriel, 2009) revelaram que o verniz fluoretado oferece maior proteção ao esmalte dental humano do que o gel de flúor fosfato acidulado, mas nenhum é capaz de prevenir completamente a desmineralização. Essa discrepância na literatura se deve, provavelmente, à metodologia empregada e ao objetivo do trabalho.

Ao avaliar as pastas derivadas da caseína (MI Paste e MI Paste Plus), ambas tiveram fraco desempenho no presente estudo apresentando similaridade com o

grupo controle em ambas as análises (microdureza e profundidade de desmineralização), apesar da literatura (Cochrane, 2010; Tepyau, 2013) descrever que o CPP-ACP consegue penetrar as porosidades da lesão de subsuperfície do esmalte, devido ao pequeno tamanho de suas nanopartículas, e se difundir através do seu gradiente de concentração para dentro do corpo da lesão tendendo a remineralizar toda a lesão. Podendo inclusive pode possuir melhor efeito de remineralização que o NaF, aumentando a dureza e o módulo de elasticidade e diminuindo a rugosidade (Zhou et al. 2014). Resultados favoráveis do complexo CPP-ACP também foram observados para a erosão dental, onde foi demonstrado um aumento na microdureza e uma diminuição na rugosidade superficial, embora nenhum dos agentes avaliados tenha protegido contra o desenvolvimento da erosão (Tantbirojn et al., 2008; Srinivasan et al., 2010; Carvalho et al., 2013). Em estudo recente (Lima, 2013) observou que CPP-ACP (MI Paste), CPP-ACPF (MI Paste Plus) e verniz fluoretado (Duraphat) apresentaram capacidade semelhante de remineralização, mantendo a regularidade da superfície do esmalte compatível com a integridade do tecido dental. Outros estudos também consideraram as pastas de CPP-ACP efetivas na prevenção de desmineralização (Oshiro et al., 2007; Srinivasan et al., 2010; Robertson et al., 2011; Somasundaram et al., 2013), diferindo dos resultados aqui obtidos. Contudo, deve-se considerar que em uma revisão sistemática da literatura (Azarpazhooh e Limeback, 2008) observaram que grande parte dos estudos que trazem resultados positivos para o CPP-ACP seguiram o mesmo protocolo *in situ* e foram conduzidos pelo mesmo grupo de pesquisadores que patentearam o complexo CPP-ACP.

Por outro lado, outros estudos (Beerens et al., 2010; Behnan et al., 2010; Clark, 2011; Heravi et al., 2013) corroboram os resultados do presente estudo ao não observar efeito significativo de remineralização com o uso do CPP-ACP. Recentemente Mehta, Nandlal, Prashanth (2013) realizaram estudo semelhante ao presente trabalho e encontraram efeito do CPP-ACP comparável ao efeito da saliva artificial em lesões de mancha branca e contínuo processo DES/RE, após 14 dias de ciclagem. Observaram, ainda, não haver diferença significativa na ação da MI Paste e MI Paste Plus, da mesma forma que Pulido et al.(2008) também não encontraram nenhum efeito da MI Paste na redução da progressão das lesões e nem diferença entre MI Paste e MI Paste Plus. Porém, os autores acreditam que o CPP-ACP possa ter sido incorporado à lesão, mas não ter sido ativado quando necessário ou até

mesmo ter sido lavado (removido) na solução desmineralizadora. Entretanto, observaram uma desmineralização ligeiramente menor com MI Paste quando comparada com saliva artificial, podendo ter mais efeito como um tratamento preventivo contra lesões de cárie do que remineralizador das lesões formadas na superfície do esmalte.

Clinicamente, Huang et al., 2013 verificaram que o tamanho das lesões não se alteram significativamente ao longo do tempo com o uso da MI Paste Plus. Segundo Clark (2011), é difícil determinar todo o potencial da MI Paste Plus em um estudo *in vitro*, sendo necessárias mais pesquisas clínicas. O aumento de íons cálcio e fosfato no interior do biofilme dental, mantém o estado supersaturado para remineralização da superfície do esmalte. O CPP se liga a ambos, à película adquirida e às bactérias da placa (Oshiro, 2007), assim ausência de biofilme pode ser um problema nos estudos *in vitro* (Clark, 2011), visto que o CPP-ACP pode produzir uma redução dos *Streptococcus* do grupo *mutans* em crianças, sem no entanto diminuir a prevalência das lesões de cárie (Pukallus et al., 2013). Embora o mecanismo que leva a essa redução não esteja claro, é possível que as propriedades da superfície do esmalte sejam alteradas pela presença de CPP-ACP. Talvez este fato proporcione a discrepância dos resultados *in vivo* e *in vitro*, uma vez que o CPP-ACP pode afetar clinicamente a adesão do *S. mutans*.

Essa divergência de resultados provavelmente ocorreu devido às diferentes metodologias empregadas. Na comparação entre os quatro tratamentos propostos neste estudo observou-se que todos apresentaram um comportamento semelhante entre si, porém nenhum foi capaz de paralisar o processo de desmineralização, e muito menos remineralizar lesões frente ao alto desafio ácido proposto. Essa constatação foi sustentada pela análise de FTIR onde foi observado que o perfil dos grupos experimentais foi semelhante. Isto se deve, possivelmente, a variações na DES e também no tratamento. Algumas limitações devem ser consideradas ao extrapolar esses resultados para a prática clínica. Por se tratar de um estudo *in vitro*, não foram incluídas as variáveis de proteção biológica conferidas pela saliva (Mehta, Nandlal, Prashanth, 2013), como estimulação salivar (Rios et al., 2008) e formação da película adquirida (Eisenburger et al., 2001) e nem os ataques bacterianos presentes em uma situação clínica (Mehta, Nandlal, Prashanth, 2013). Outros autores também têm considerado que o tratamento remineralizador só demonstra ser efetivo quando combinado ao controle de outras variáveis, para diminuição do

desequilíbrio do ciclo de DES/RE (Nicoló et al., 1997; Jacobs et al., 1998; Soares, Valença, 2003). No presente estudo o desafio cariogênico foi mantido por 21 dias sobre um esmalte já desmineralizado, tornando os métodos empregados incapazes de paralisar e/ou reverter o processo

Assim, com base na literatura pesquisada e frente aos resultados encontrados neste trabalho, considera-se que a participação dos fluoretos é fundamental na prevenção do processo de perda mineral do esmalte, em decorrência da formação de um reservatório de fluoretos na cavidade oral resultante da deposição do fluoreto de cálcio e liberação do mesmo em pH baixo, aumentando a remineralização e retardando o processo de desmineralização (Belfort de Carvalho Filho, 2010).

Apesar de a literatura apontar os produtos à base do complexo CPP-ACP como promissores na prevenção da desmineralização do esmalte, com a vantagem de não apresentarem toxicidade e nem risco de desenvolvimento de fluorose dentária, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os produtos pesquisados embora contribuam na luta pela manutenção da saúde bucal, não são capazes de evitar totalmente a progressão das lesões de desmineralização. Ainda são necessárias novas pesquisas analisando não só o uso e eficácia desses produtos, mas também os inúmeros fatores que podem influenciar o complexo processo de interação dos fatores etiológicos da cárie dental. Estudos têm demonstrado que a formação da lesão de mancha branca em esmalte está diretamente atribuída ao efeito da acumulação e retenção prolongada do biofilme bacteriano visível (Mattousch, 2007), tornando-se indispensável a remoção do mesmo (Séllos, 2008). A deficiência no controle de placa torna o meio bucal propício a constantes desafios ácidos, que mesmo frente a aplicações constantes de flúor, ou outros produtos potencialmente remineralizadores, não será suficiente para paralisar o processo de desmineralização e permitir a remineralização das lesões de mancha branca. Deve-se considerar sempre que um tratamento remineralizador só será efetivo em pacientes que sejam capazes de mudar seus hábitos de higiene bucal e dieta, tendo a melhoria na qualidade da higiene como a maior responsável pela melhoria do esmalte com cárie iniciais. Assim, torna-se importante ressaltar que a Odontologia atual precisa estar voltada para a prevenção e a educação em saúde bucal, buscando a cooperação do paciente na manutenção de sua saúde bucal.

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.
- o flúor-gel teve o melhor desempenho, sendo capaz de tornar a perda mineral menor do que o grupo controle, porém não promoveu o aumento do fosfato no esmalte desmineralizado.
- CPP-ACP com e sem flúor e verniz cavitário apresentaram dureza e profundidade de desmineralização semelhante ao controle (sem tratamento).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

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; 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.

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

Antunes, A; de Rossi, W; Zezell, DM. Spectroscopic alterations on enamel and dentin after nanosecond Nd:YAG laser irradiation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2006 Aug; 64(5):1142-1146.

Arends, J; Christoffersen, J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res*. 1986; 65(1): 2-11.

Arends, J; ten Bosch, JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992; 71: 924–928.

Attin, T; Grieme, R; Paqué, F; Hannig, C; Buchalla, W; Attin, R. Enamel fluoride uptake of a novel water-based fluoride varnish. *Archives of Oral Biology*. 2005; 50 (3): 317-322.

Attin, T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006; 20:152-72.

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): 915-924.

Barbour, ME; Parker, DM; Allen, GC; Jandt, KD. Human enamel erosion in constant composition citric acid solutions as a function of degree of saturation with respect to hydroxyapatite. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2005; 32:16–21.

Beerens, MW; van der Veen, MH; van Beek, H; ten Cate, JM. Effects of casein phosphopeptide amorphous calcium fluoride phosphate paste on white spot lesions and dental plaque after orthodontic treatment: a 3-month follow-up. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 610–617.

Behnan, SM; Arruda AO.; González-Cabezas, C; Woosung S; Peters, MC. e Mich, AA. In-vitro evaluation of various treatments to prevent demineralization next to orthodontic brackets. *Am J of Orthod Dentofacial Orthop*. 2010; 138(6): 712e1-712e7.

Belfort de Carvalho Filho AC. Avaliação dos efeitos de compostos fluoretados na erosão ácida dental por fluorecência de raios- X. [Dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2010.

Borges, BCD; Vasconcelos, AAM de; Cunha, AGG; Pinheiro, FHDL; Machado, AJS. Preliminary Clinical Reports of a Novel Night-Guard Tooth Bleaching Technique Modified by Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP). *Eur J Esthet Dent*. 2011; 6 (4): 446-453.

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

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.

Buzalaf MA; Pessan JP; Honório HM; tem Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries controls. *Monogr Orla Sci*. 2011; 22:97-114

Carounanidy U; Sathyanarayanan R. Dental caries: A complete changeover, Part III: Changeover in the treatment decisions and treatments. *J Conserv Dent*. 2010; 13:209–217.

Carvalho FG; Brasil VLM; Silva Filho TJ; Carlo HL; Santos RL; Lima BASG. *Braz Oral Res*. 2013 Nov-Dec; 27(6):463-470.

Castellan CS; Luiz AC; Bezinelli LM; Lopes RM; Mendes FM; de P Eduardo C; de Freitas PM. In vitro evaluation of enamel demineralization after Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on primary teeth. *Photomed Laser Surg*. 2007 Apr; 25(2):85-90.

Chalmers, JM. Minimal intervention dentistry: strategies for the new caries challenge in our older patients. *J Can Dent Assoc*. 2006; 72:325-331.

Chedid, SJ; Guedes-Pinto, AC Flúor – Uso externo. In: Guedes-Pinto, AC. *Odontopediatria*. 6.ed. São Paulo: Santos, 1984. Cap. 26, p.415-448

Christoffersen, J; Christoffersen, MR; Kibalczyk, W; Perdok, WG. Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. *Acta Odontol Scand*. 1988;46:325–336.

Clark, KD. "The efficacy of 37% phosphoric acid + MI Paste Plus on remineralization of enamel white spot lesions.[Tese]. University of Iowa; 2011.

Clasen, ABS, Ogaard B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta Odontol Scand*. 1999; 57: 334-341.

Cochrane, NJ; Cai, F; Huq, NL; Burrow, MF; Reynolds, EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*. 2010 Nov; 89(11): 1187-97.

Corrêa, MSNP. Odontopediatria na primeira infância. São Paulo: Santos, 1998.

Corrêa, FNP. Efeito do flúor e da caseína fosfopeptídea – fosfato de cálcio amorfo na inibição da erosão em dentes decíduos e permanentes [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

Correa-Afonso, AM; Bachmann, L; Almeida, CG; Corona, AS; Borsatto, MC. FTIR and SEM analysis of CO2 laser irradiated human enamel. Arch Oral Biol. 2012 Sep; 57(9):1153-8.

Cruz, MEMS; Santos, RA; Santos, VIM. Tratamento de cáries incipientes. Rev. Gaúcha Odont. 1991 jul/ago; 39(4): 257-264.

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

Cury, JA. Flúor: dos 8 aos 80?, pp. 375-82. In Bottino MA, Feller C (org.). Atualização na clínica odontológica. Artes Médicas, São Paulo, 1992.

Cury,JA; do Amaral R; Tenuta L; Del Bel Cury A; Tabchoury C. Low-fluoride toothpaste and decíduos enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. Eur J Oral Sci. 2010 Aug; 118(4): 370-375.

Delbem, ACB; Brighenti, FL; Vieira, AEM; Cury JA · Comparação in vitro do efeito cariostático entre a aplicação tópica de flúor e dentifrício fluoretado. J. Appl. Oral Sci. 2004 Apr/Jun; 12(2).

Delbem, ACB; Sassaki, KT; Vieira, AE; Rodrigues, E; Bergamaschi, M; Stock, SR; Cannon, ML; Xiao, X; De Carlo, F. Comparison of methods for evaluating mineral loss: hardness versus synchrotron microcomputed tomography. Caries Res. 2009; 43(5):359-65.

Damato, FA; Strang, R; Stephen, KW. Effect of fluoride concentration on remineralization of carious enamel an in vitro pH-cycling study. Caries Res. 1990; 24(3): 174-180.

Edmunds, DH; Whittaker, DK; Green, RM. Suitability of human, bovine, equine and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. Caries Res. 1988; 22:327-36.

Eisenburger, M; Addy, M; Hughes, JA; Shellis, RP. Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. Caries Res. 2001; 35:211-215.

El-Sayad, IL; Sakr, AK.; Badr, YA. Combining CPP-ACP with fluoride: synergistic remineralization potential of artificially demineralized enamel or not? J Biomed Opt. 2009; 14(4).

Esteves-Oliveira, M; Zezell, DM; Meister, J; Franzen, R.; Stanzel, S; Lampert, F; Eduardo CP; Apel, C. CO2 laser (10.6µm) parameters for caries prevention in dental enamel. *Caries Res.* 2009; 43(4): 261-268.

Featherstone, JDB; Behrman, JM; Bell, JE. Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. 1993; 4(3): 357-362.

Featherstone, JDB; Barrett-Vespe, 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): 1397-1403.

Featherstone, JDB. The science and practice of caries prevention. *The J Am Dent Assoc.* 2000; 131: 887-99.

Fejerskov, O; Kidd, E. Cárie dentária. A doença e o seu tratamento clínico. 2 ed. São Paulo: Santos, 2011.

García-Godoy F; Hicks, MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventative agents in enamel demineralization and remineralization. *The J Am Dent Assoc.* 2008; 139 Suppl: 25S-34S.

Guzman-Armstrong, S.; Warren, J.J. White spot lesions: prevention and treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010; 138 (6): 690-696.

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

Hegde, MN; Shetty, S; Pardal, D. Remineralization of enamel sub-surface lesion using casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate: A quantitative energy dispersive X-ray analysis (EDAX) *J Conserv Dent.* 2007;10:19–25.

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 ; 6(2):e121-126.

Huang, GJ; Roloff-Chiang, B; Mills, EB; Shalchi, S; Spiekerman, C; Korpak, AM; Starrett, JI; Greenlee, GM; Drangsholt, RJ; Matunas, JC. Effectiveness of MI Paste Plus and PreviDent fluoride varnish for treatment of white spot lesions: A randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013; 143: 31-41.

Jacobs, MMRP; Masuda, MS; Tenis, 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. Eficácia do CPP-ACP e CPP-ACPF em remineralização do esmalte - Um estudo *in vitro*, utilizando microscópio eletrônico de varredura e DIAGNOdent®. *J Dent Res.* 2014; 22:77-82. [periódico online] 2011 [citado em 08 janeiro 2014];. Disponível em: <http://www.ijdr.in/text.asp?2011/22/1/77/80001>

Kamburoğlu, K; Kurt, H; Kolsuz, E; Oztaş, B; Tatar, I; Celik, HH. Occlusal caries depth measurements obtained by five different imaging modalities. J Digit Imaging. 2011; 24: 804-813.

Kantorowiz, Z; Featherstone, JD; Fried, D. Caries prevention by CO2 laser treatment: dependency on the number of pulses used. J Am Dent Assoc. 1998; 129(5): 585-591.

Lima, CMP 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*. [Tese] Campo Grande; 2013.

Lima, TJ; Ribeiro, CCC; Tenuta, LMA; Cury JA. Low-fluoride dentifrice and caries lesion control in children with different caries experience: a randomized clinical Trial. Caries Res. 2008; 42(1):46-50.

Magalhães, AC; Rios, D; Buzalaf, MAR. Influência dos fluoretos na prevenção de lesões erosivas. In: Buzalaf MAR. Fluoretos e saúde bucal. São Paulo: Ed Santos; 2008. p. 221-46.

Marinho, VCC; Higgins, JPT; Logan, S; Sheiham, A. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database Syst Rev, 2003, Issue 1.

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): 294-298.

Medeiros, UV; Brum, SC. A proteção do esmalte por substâncias fluoretadas e os desafios cariogênicos. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1998 nov/dez; v.52, n.6, p.454-459.

Medeiros, UV; Marques, M.S. 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. 1999; 1 (1): 35-46.

Medeiros, UV; Souza, MIC. Avaliação clínica do tratamento remineralizador de lesões iniciais de cárie coadjuvados por métodos de auto- aplicação de flúor. Rev. Bras. Odont. 1994 nov/dez; 51 (6): 19-24.

Mellberg, JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. J Den Res. 1992; 71: 913-999.

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; 24:681-689.

Meurman, JH; Frank, RM. Progression and surface ultrastructure of *in vitro* caused erosive lesions in human and bovine enamel. Caries Res 1991; 25(2):81-87.

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, RD; Myaki, SL; Long, SM; Rocha, RG. Prevenção em odontopediatria: fluoretos. Conceitos atuais e tendências futuras. Rev. Bras. Odont. 1997 mai/jun; 54(3): 163-166.

Ogaard, B; Rølla, G; Arends, J; ten Cate, JM. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1: lesion development. Am J of Orthod Dentofacial Orthop. 1988; 94(2): 123-128.

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

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

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):550-555.

Peters, MC; Bresciani, E; Barata, TE; Fagundes, TC; Navarro, RL; Navarro, MFL; Dickens, SH. In vivo dentin remineralization by calcium-phosphate cement. J Dent Res. 2010; 89(3): 286-291.

Pinheiro, IVA; Medeiros, MCS; Andrade, AKM; Ruiz,PA. Lesões brancas no esmalte dentário: como diferenciá-las e tratá-las. Rev Bras Patol Oral. 2003 jan/mar; 2(1): 11-18.

Pinheiro, SL; Mendes, FM; Bengtson, AL; Guirado, TE. Contagem de Streptococcus mutans do tecido cariado de dentes decíduos e permanentes. Rev Assoc Paul Cir Dent. 2006; 60(3): 212-217.

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>.

Portella, W; Gonçalves, BC. Remineralização do esmalte: comprovação clínica. Rev. Bras. Odont. 1989 nov/dez; 46(6): 10-16.

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): 550-555.

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.

Raucci-Neto, W. Avaliação dos efeitos do laser nd:yag na prevenção de lesões de cárie oclusal na dentição decídua e permanente: estudo *in vitro* e *in vivo*. [Tese] . Ribeirão Preto; 2013.

Reynolds, EC. Anticariogenicphosphopeptides. U.S Patent 5015628, 1991

Reynolds, EC; Cain, CJ; Webber, EL; Black, CL; Riley, PF; Johnson, IH; Perich, JW. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. J Dent Res. 1995; 74(6): 1272-1279.

Reynolds, EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptidestabilized calcium phosphate solutions. J Dent Res. 1997; 76(9): 1587-1595.

Reynolds, EC; Black, CL.; Cai, F. et al. Advances in enamel remineralization: anticariogenic casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. J Clin Dent 1999; 10: 86-88.

Reynolds, EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? Australian Dental Journal. 2008; 53: 268-273.

Rios, D; Honorio, HM; Franciscone, LF; Magalhães, AC; Machado, MAAM; Buzalaf, MAR. In situ effect of an erosive challenge on diferent restorative materials and on enamel adjacent to these materials. J Dent. 2008; 36: 152-157.

Robertson, MA.; Kau, CH.; English, JD; Lee RP; Powers, J; Nguyen, JT. MI Paste Plus to prevent demineralization in orthodontic patients: a prospective randomized controlled trial. Am J of Orthod Dentofacial Orthop. 2011; 140:660-668.

Santos, LM; Reis, JIL; Medeiros, MP; Ramos, SM; Araújo, JM; Avaliação *in vitro* de produtos fluoretados no desenvolvimento de lesões de cárie em dentes decíduos. Braz Res Orais. 2009 jul/set; 23(3).

Séllós, MC; Malta, MCB; Ferreira, JOR; Santos, APP; Soviero, VM. Avaliação clínica do efeito adicional do verniz fluoretado sobre a inativação de lesões iniciais de cárie em dentes Decíduos *Cienc Odontol Bras* 2008 jul./set.; 11 (3): 66-73.

Silverstone, LM. The role of fluorides in remineralization of enamel. Caries Res., Basel, v.11, p. 39-41, 1977, Suppl.1.

Soares, ALS. Fotorreflectância, microdureza e microscopia eletrônica de varredura do esmalte dental humano submetido ao clareamento in vitro com ativação por laser de argônio ou matriz de LEDs associado a laser de diodo. São José dos Campos: Univap, 2004. 93p

Soares, JMP; Valença, AMG. Clinical evaluation of the therapeutic effect of fluoride gel and varnish in the remineralization of incipient dental caries. Pesq Bras Odontop Clin Integr. 2003 jul/dez 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; 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]. Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo, 2009.

Steiner-Oliveira, C; Rodrigues LK; Lima EB; Nobre dos Santos M. Effect of the CO₂ laser combined with fluoridated products on the inhibition of enamel demineralization. J Contemp Dental Pract. 2008; 9(2): 113-121.

Srinivasan, N; Kavitha, M; Loganathan, SC. Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900 ppm fluoride on eroded human enamel: an in situ study. Arch Oral Biol. 2010 jul; 55(7):541-544.

Tagliaferro, EP; Rodrigues, LK; Nobre dos Santos, M; Soares, LE; Martin, AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: An in vitro study. Caries Res. 2007; 41(1): 74-76.

Takagi, S; Liao, H; Chow LC. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/ remineralization in vitro. Caries Res. 2000 Jul-Aug;34(4):281-8.

Tanaka, JLO; Medici Filho, E; Salgado, JAP; Salgado, MA; Moraes, LC, Moraes, ME; Castilho, JC. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. Braz Oral Res. 2008 Oct-Dec;22(4):346-51.

Tantbirojn, D; Huang, A; Ericson, MD; Poolthong, S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. Journal of Dentistry. 2008; 36 : 74-79.

ten Cate, JM. In situ models, physic-chemical aspects. Adv Dent Res. 1994; 8(2): 125-133.

Thepyou, R; Chanmitkul, W; Thanatvarakorn, O; Hamba, H; Chob-Isara, W; Trairatvorakul, C; Tagami, J. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and glass ionomer show distinct effects in the remineralization of proximal artificial caries lesions in situ. Dent Mater J. 2013; 32(4): 648-653.

Thylstrup, A; Fejerskov, O. Flúor no tratamento da cárie dentária – Implicações clínicas. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica. 2. ed. São Paulo: Santos, 1995. Cap. 12, p. 259-281.

Vashisht, R; Indira, R; Ramachandran, S; Kumar, A; Srinivasan, MR. Role of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate in remineralization of white spot lesions and inhibition of *Streptococcus mutans*? J Conserv Dent. 2013 julaug; 16(4): 342–346.

Warren, DP; Henson, HA; Chan, JT. Dental hygienist and patient comparisons of fluoride varnishes and gels. J. Dent. Hygiene. 2000; 72 (2): 94-101.

White, DJ. Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res* 1987; 21: 228-242.

White, DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res*. 1995; 9(3): 175-193.

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; 118:604–609.

Yamazaki, H; Litman, A; Margolis, HC. Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(2):110-120.

Zero, DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995; 9 (3): 214-230.

Zero, DT. Dental caries process. *Dent. Clin. North Amer*. 1999 oct; 43(4): 635-664.

Zero, DT. Recaldent: evidence for clinical activity. *Adv Dent Res*. 2009; 21(1):30-34.

Zhou, C; Zhang, D; Bai, Y; Li, S. Casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate remineralization of primary teeth early enamel lesions. *J Dent*. 2014; 42: 21-29. (journal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/jden)