Francisco Carlos Rehder Neto

**Estudo da progressão e inibição de lesões artificiais de cárie através de
alterações da microdureza superficial**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Odontologia Restauradora -
Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Campos Serra.

Ribeirão Preto
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Rehder Neto, FC

Estudo da progressão e inibição de lesões artificiais de cárie através de alterações da microdureza superficial.

Ribeirão Preto, 2008.

78 p.

Dissertação de Mestrado, apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Odontologia Restauradora – Dentística.

Orientadora: Serra, Mônica Campos.

1. Lesão artificial de cárie. 2. Esmalte. 3. Dentina. 4. Microdureza. 5. Remineralização. 6. Desmineralização.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francisco Carlos Rehder Neto

Estudo da progressão e inibição de lesões artificiais de cárie através de alterações da microdureza superficial.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Odontologia Restauradora -
Dentística

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus,

Por iluminar meu caminho com muito amor e carinho.

Aos meus pais, Francisco Carlos Rehder Filho e Silvia Fátima Alves Rehder,

Meus ídolos, os maiores exemplos da minha vida. Obrigado por terem sempre acreditado em mim. O que eu sou, e tudo o que conquistei são reflexos de todo o amor e de todo o carinho que vocês sempre me deram. Agradeço a Deus por ter me dado os pais que vocês são.

Ao meu irmão, Renato Henrique Rehder,

Como sendo seu irmão mais velho espero que eu tenha conseguido ser um bom exemplo para você o tanto quanto você sempre foi para mim. Sem você meu irmão a vida não teria muita graça. O amor e o orgulho que tenho de você são eternos.

À minha namorada, Janaína Castania,

Coisa, o que sinto por você talvez não se chame amor, deve ser algo mais, algo que ainda não recebeu um nome. Esse sentimento, esse ter você na minha vida, pode até não se chamar, pode até não ter significado - não me importa isso - quando é você, meu amor, quem dá sentido a tudo.

Ao meu avô Francisco Carlos Rehder e a Nadir Rehder,

Deus resolveu levá-los desta vida mais cedo do esperávamos. Nadir, a disciplina que tenho em relação aos estudos se deve a toda paciência que sempre teve comigo e a todo cuidado e carinho por parte de você meu avô, sempre incentivando meus estudos. A importância que vocês tiveram em minha vida foi suficiente pra saber que vocês sempre estarão comigo, olhando por mim, dedico também este trabalho a vocês e espero que estejam orgulhosos.

À professora Mônica Campos Serra,

Não gostaria de lembrar aqui suas qualidades, seja como professora da faculdade ou mesmo como minha orientadora. Poder trabalhar todos esses anos ao seu lado foi um aprendizado constante aliado a uma amizade crescente e respeito mútuo, que puxou a orelha quando necessário, mas que também elogiou da mesma maneira. Se eu pude enxergar tão longe; foi por estar apoiado sobre o ombro de gigantes.

Aos meus amigos de infância e de sempre, Eduardo, Jonas, Luciano e Willian,

Amizade é aquela que dura para sempre, mesmo que o para sempre não exista. E, ter tido a oportunidade de crescer ao lado de vocês, dividindo sonhos e nos tornando homens foi com certeza um privilégio. Muito do que sou e aonde eu cheguei se deve a vocês. Não precisamos estar pertos e nem mesmo de nos falarmos todos os dias, pois, amigo é aquele que chega mesmo quando todo o mundo já se foi e, de um jeito ou de outro vocês estão sempre por perto.

Ao amigo Márcio de Menezes,

Posso dizer com certeza que muito da minha formação como cirurgião dentista, seja como pesquisador ou como clínico se deve a você meu amigo. Trabalhamos juntos durante a minha primeira iniciação científica enquanto você estava no mestrado e, a amizade sincera que construímos foi com certeza o melhor dos resultados obtidos naqueles anos.

Ao amigo Pedro Turrini Neto,

Conheci você quando ainda estava na graduação e logo de cara nos tornamos grandes amigos, às vezes, é até engraçado, pois parece que somos amigos a muito mais tempo do que na verdade nós nos conhecemos. Sua coragem, integridade são um exemplo pra mim. Tanto você quanto Melissa sua esposa, são pessoas muito queridas.

Agradecimentos

À toda minha Família, que é demasiadamente grande. Gostaria de agradecer a minha madrinha **Ana** e a meu padrinho **Sebastião** pelo exemplo, a meu primo **Beto**, um irmão mais velho pra mim. Às minhas tias **Lucimara**, **Eilsabeth** e **Rose** por todo o amor e carinho que sempre tiveram por mim e enfim a todos meus outros tios, tias, primos e primas por tudo. A **Lourdes** e a **José Castania**, por terem me recebido como um filho em sua casa me apoiando desde o início e também a **Jaqueline**, minha cunhada folgada com a qual sempre dei muitas risadas e a meu primo e cunhado não menos folgado **Dudu**, pela amizade e incentivo.

Ao G5 nas pessoas de **Fernando Akio Maeda**; **Daniel Galafassi**; **Cesár Penazzo Lepri**; **Walter Raucci Neto**, amigos do mestrado com o qual pude dividir bons momentos. Homens íntegros, de caráter; sei que o futuro lhes reserva grandes conquistas, pelas pessoas, amigos e homens que o são.

Ao amigo **André Oliveira Pepato**, canhoto, uma pessoa de grande coração e caráter com a qual tive o privilégio de trabalhar durante os quatro anos de graduação.

À amiga **Juliana Jendiroba Faraoni-Romano**, uma pessoa incrível pela qual tenho muito carinho e amizade com a qual também pude aprender muito.

À amiga **Patrícia Marchi**, que além de comandar o laboratório em que trabalhamos foi também fundamental na ajuda e busca de soluções para a parte experimental.

Ao amigo **Carlos Feitosa dos Santos**, secretário da pós-graduação do departamento, pela amizade, paciência, sempre com um sorriso no rosto e uma piada no bolso.

À professora **Cecilia Pedroso Turssi**, pessoa com a qual tive a oportunidade de desenvolver diversos trabalhos desde a iniciação científica, com a qual pude aprender a fazer pesquisa. Obrigado pelo carinho, pela amizade e pela paciência.

À professora **Raquel Fernanda Gerlach**, por ter aberto as portas de seu laboratório para que pudéssemos trabalhar.

Ao professor **Antonio Luiz Rodrigues Junior**, pessoa maravilhosa capaz de transformar os mais loucos números e teorias em ciência.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Jaime Aparecido Cury, Cíntia Pereira Machado Tabchoury e Livia Maria Andaló Tenuta**, pelas portas que me foram abertas.

Ao amigo **Vinícius Diniz Alves**, também cirurgião dentista que também foi a pessoa que me levou a trabalhar na Dentística.

A todos os professores da FORP que de maneira direta ou indireta contribuíram para minha formação: **Silmara, Telma, Regina, Izabel, Tomio, André, Marco, Marcelo, Paulo, Vinicius, Mariane, Maria Cristina, Waldemar, Pardini** e demais professores.

Aos companheiros de graduação, **Diogo, Orsi, André Mococa, Flávio, Fernando, Lucas, Carol, Kariny, Taiana, Gisele, Larissa, Marcela** entre tantos outros amigos da 78ª Turma da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. E também ao amigo **César** que Deus resolveu levar para junto de sua casa.

Às colegas de pós-graduação em dentística, **Cristiane, Giovanna, Vivian, Danielle, Juliane, Alessandra, Daniela, Carol, Aline e Michelle** sem também esquecer os colegas da endodontia **Renato e Douglas**, e da oclusão **André e Daniel**, pessoas incríveis com as quais pude dividir o crescente aprendizado que a pós-graduação nos proporciona.

Às cirurgiãs dentistas **Solange Aparecida Gual e Rosa Cristina B. Polachini**, por sua sensibilidade e carinho no momento em que precisei.

Ao também cirurgião dentista **Thales Eduardo Piantino**, excelente pessoa e grande amigo que sempre me apoiou para a realização deste mestrado.

À **Cia do Riso**, uma experiência única que mudou o meu modo de enxergar a vida e a morte, gostaria de deixar aqui o meu imenso agradecimento a todo o grupo, por terem me aceitado e por terem trazido ao mundo o palhaço Xinelô.

À **FAPESP**, e a todas as pessoas ligadas a ela que de uma forma ou de outra depositaram sua confiança em mim permitindo que este trabalho fosse conduzido.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na pessoa do professor, **Oswaldo Luiz Bezzon**.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, na pessoa do professor, **Manoel Damião de Sousa Neto**.

Ao chefe e também professor do Departamento de Odontologia Restauradora, **Dr. Jesus Djalma Pécora**.

À **Amália, Maria Isabel, Luiza, Rosângela e Reginaldo**, funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

À **Isabel e Regiane**, funcionárias da Seção de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

A toda a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e a todos os funcionários de maneira geral, em todos os departamentos e em todas as suas funções, pelo carinho que sempre tiveram não só comigo, mas com todos os alunos. Lembrando também às tias do “bandejão” que sempre colocaram um “molhinho” a mais pra mim (como esquecê-las).

A todos os pacientes que pude atender durante as clínicas, obrigado pela confiança e pela paciência em poder me ensinar.

A todos os amigos, familiares e a aqueles que de uma maneira ou de outra estiveram presentes e me ajudaram a concluir essa jornada. Se por acaso esqueci-me de mencionar alguém e não me fiz justo; não fique triste, querido amigo, pois, o papel poder ser pequeno, mas o coração é grande. Obrigado.

**“O QUE SABEMOS É UMA GOTA; O QUE
NÃO SABEMOS É UM OCEANO.”**
ISAAC NEWTON

Sumário

Introdução Geral	10
------------------	----

Capítulo 01

Progressão de Lesões Artificiais de Cárie em Substrato Humano e Bovino

Resumo	13
Abstract	14
Introdução e Revisão	16
Proposição	25
Materiais e Métodos	27
Resultados	32
Discussão	37
Conclusão	41
Referências	43
Fluxograma	48

Capítulo 02

Agentes Remineralizantes no Controle de Lesões Artificiais de Cárie em Esmalte

Resumo	50
Abstract	51
Introdução e Revisão	53
Proposição	57
Materiais e Métodos	59
Resultados	65
Discussão	67
Conclusão	72
Referências	74
Fluxograma	78

Introdução Geral

A cárie dental envolve um processo de difusão de ácidos para o interior do esmalte e da dentina. Estes ácidos podem ser neutralizados ou resultarem em alterações de pH que, ao longo do tempo, modificam o conteúdo mineral desses tecidos, podendo levar ao desenvolvimento das lesões de cárie. Apesar de simples em conceito, a cárie é considerada complexa em termos de detalhes e envolve vários fatores - que ainda não foram totalmente compreendidos.

Assim, os modelos *in vitro*, ou “laboratoriais”, podem ser considerados o primeiro passo no surgimento de uma linha de pesquisa, e apresentam vantagens e desvantagens. Por serem modelos artificiais, os estudos *in vitro* podem ser questionados sobre sua relevância clínica. Todavia, outros aspectos devem ser considerados, como: o alto nível de controle científico, aspectos éticos relacionados á condução de determinados experimentos, diminuição na variabilidade experimental, possibilidade de utilização de métodos de avaliação altamente sensíveis, menor número de amostras e, além disso, relativo baixo custo para sua execução, quando comparados a estudos *in situ* e *in vivo*.

Desde o início do século passado, pesquisadores tem buscado a criação de modelos artificiais capazes de induzir lesões de cárie com características próximas às lesões encontradas clinicamente. Estudos *in vitro*, quando bem delineados e bem controlados, têm ajudado o entendimento da cárie quanto a sua etiologia e também frente aos processos de progressão e inibição dessas lesões. Contudo, apesar dos avanços conseguidos, alguns fatores para estes modelos experimentais ainda devem ser padronizados.

Devido aos aspectos éticos envolvidos e pela dificuldade de aquisição de dentes humanos, a substituição deste tipo substrato tem sido uma constante

preocupação de diversos pesquisadores. Em relação à indução de lesões artificiais, muitos estudos têm utilizado os dentes bovinos, como uma opção viável. Todavia, são poucos os estudos que foram conduzidos comparando o emprego deste tipo de substrato em relação ao humano em estudos sobre cárie dental.

A avaliação da progressão das lesões de cárie como também os métodos utilizados para sua inibição, serão os objetos de estudo deste trabalho, que para melhor entendimento, foi dividido em dois capítulos.

Buscando delinear um modelo de indução de lesões artificiais de cárie, possa ser aplicado em esmalte e em dentina, o **capítulo 1** propõe o desenvolvimento de protocolos de indução baseado em ciclos de pH e compara o comportamento do substrato humano e bovino ao longo dos desafios cariogênicos.

Com a crescente demanda de novos produtos e novas tecnologias propostas para inibir o desenvolvimento de lesões de cárie, torna-se importante que a efetividade desses produtos seja devidamente avaliada. O **capítulo 2** propõe a avaliação de pastas e dentifrícios - compostos á base de cálcio e fosfato – comparando-os a um dentifrício fluoretado no controle da progressão de lesões cariosas em esmalte.

Capítulo 01

**Progressão de Lesões Artificiais de Cárie em
Substrato Humano e Bovino.**

REHDER-NETO FC. **Progressão de Lesões Artificiais de Cárie em Substrato Humano e Bovino.** 2008. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a progressão de lesões artificiais de cárie em esmalte e dentina, comparando-se substrato humano e bovino. Sessenta fragmentos de esmalte (30 humanos e 30 bovinos) e 60 fragmentos de dentina (30 humanos e 30 bovinos) medindo 4x4x2 foram embutidos, planificados e polidos. Em sua superfície, isolou-se uma área de 7mm² e avaliou-se a microdureza superficial (KNH, Knoop) utilizando-se carga estática e tempo de aplicação de 25g, por 5s para esmalte e 10 g por 10 segundos para dentina. Lesões incipientes de cárie foram induzidas através de um modelo de ciclos de pH. Os espécimes foram imersos por 1 hora em solução desmineralizante e por 22 horas em solução remineralizante, o que correspondia a um ciclo de pH. Novas medidas de KNH foram realizadas ao final de cada ciclo de pH, sendo que para dentina foram realizados 3 ciclos e para esmalte 8 ciclos. A Análise de Variância (ANOVA) foi conduzida seguindo-se o delineamento fatorial, 2x9, para esmalte; e 2x4, para dentina. Análises de Regressão foram utilizadas para determinar a equação do modelo que rege a perda de conteúdo mineral ao longo do tempo de indução das lesões de cárie. A Análise de Variância (ANOVA) demonstrou diferenças altamente significativas para o fator substrato ($p<0,01$) e para o fator ciclo ($p<0,01$) para ambos os substratos testados. Para o fator ciclo, a Análise de Regressão revelou que as funções que regem o comportamento da KHN ao longo do desafio cariogênico apresentaram como melhor ajuste, funções exponenciais, para todos os substratos. O substrato bovino apresentou comportamento semelhante ao humano quanto a progressão de lesões artificiais de cárie, podendo ser considerado como uma opção viável em estudos sobre cárie dental.

Palavras-chave: Lesão artificial de cárie; Esmalte; Dentina; Microdureza; Remineralização; Desmineralização; ciclos de pH.

REHDER-NETO FC. **Development of Caries-Like Lesions in Human and Bovine Substrate.** 2008. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Abstract

The aim of the present study was to compare the progression of caries-like lesions in human and bovine (enamel and dentin) substrates using an pH cycling model. Thirty specimens of human enamel, 30 specimens of bovine enamel, 30 specimens of human dentin and 30 specimens of bovine dentin were submitted to a pH cycle protocol to induce artificial caries lesions. In the specimens surface an exposed area of 7.15 mm² was isolated and human and bovine specimens were pretested for Knoop microhardness under 25 g load applied for 5 s for enamel and 10 g load applied for 10 s for dentin. Each pH cycle consisted of immersion of the specimens for 1 hour in demineralizing solution and 22 hours in remineralizing solution, for eight days for enamel and for three days for dentin. Surface Knoop microhardness (SMH) was daily measured at each pH cycle conducted. Data were analyzed by ANOVA as a factorial design (2x9) for enamel, and (2x4) for dentin substrate. Regression analyses were used to model the SMH values of human and bovine (enamel and dentin) over the time. Regression analyses of the data showed that the SMH values for both human and bovine (enamel and dentin) decreased in an exponential model with the number of pH cycles. Since the bovine substrate presents some advantageous characteristics over the human substrate and the similar behavior observed between both substrates for enamel and dentin. The use of bovine tooth can be considered a viable and practical alternative to human tooth in dental caries research.

Keywords: Artificial Caries Lesion; Enamel; Dentin; Microhardness; Demineralization; Remineralization; pH cycles.

[INTRODUÇÃO E REVISÃO]

Capítulo 01

Introdução e Revisão

O mecanismo de formação e desenvolvimento da cárie dental tem sido amplamente estudado ao longo das últimas décadas através de modelos laboratoriais ou dito *in vitro* (HALS, MÖRCH; SAND, 1955; FEAGIN; KOLOURIDES; PIGMAN, 1969; FEATHERSTONE et al., 1983; AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000; KIDD; FEJERSKOV, 2004; FEATHERSTONE, 2004; HARA et al., 2005; TURSSI et al., 2006; CHU et al., 2007).

Dentre os modelos criados com este propósito, podem ser citados, os que utilizam bactérias (NOORDA et al., 1985; EDMUNDS; WHITTAKER; GREEN, 1988; FONTANA et al., 1996; TORII et al., 2001; GAMA-TEIXEIRA et al., 2007), ou as chamadas “bocas artificiais”, modelos capazes de suprir de modo contínuo e intermitente o abastecimento de nutrientes na formação do biofilme dental e conseqüente desenvolvimento bacteriano, simulando as condições orais quanto a temperatura, saliva, dieta e oscilações de pH (TANG et al., 2003). Estes modelos bacterianos são capazes de avaliar as interações da microbiota oral na formação das lesões de cárie, monitorando suas características físicas, químicas, biológicas e moleculares em alto grau de precisão. Contudo, apesar das vantagens apresentadas, sua utilização é bastante crítica devido ao seu alto custo.

Outros modelos para a indução de lesões de cárie seriam os modelos essencialmente químicos, os quais utilizam soluções ácidas tamponadas (HALS, MÖRCH; SAND, 1955; FEAGIN; KOLOURIDES; PIGMAN, 1969), gel acidificado (ARENDS; SCHUTHOF, 1980; DAMATO; STRANG; STEPHEN, 1988; SMITH;

PRESTON; HIGHAM, 2005) e ciclos de pH (FEATHERSTONE, 1986; SERRA; CURY, 1992; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003; HARA et al., 2005).

Soluções tamponadas ou géis acidulados são metodologias simplificadas que se baseiam na imersão do substrato dental em soluções tampão acetato ou lactato, contendo ou não íons de cálcio e fosfato (NEWBRUN; TIMBERLAKE; PIGMAN, 1959; FEAGIN; KOLOURIDES; PIGMAN, 1969; FEAGIN et al., 1971) ou na aplicação de um gel acidulado sob a superfície do substrato dental por um determinado período (SILVERSTONE, 1982; AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; FEATHERSTONE; MELLBERG, 1981). Apesar de amplamente utilizados em diversos estudos, a desvantagem deste modelo é o fato de ser estático, não simulando os adventos de desmineralização e remineralização do substrato dental, como acontece clinicamente.

O modelo baseado em ciclos de pH teve seu formato e modelo propostos no início da década de 80, com os trabalhos de ten Cate e Duijsters (1982) para a indução *in vitro* de lesões artificiais de cárie. Esta metodologia basicamente consiste na imersão dos fragmentos dentais em soluções desmineralizantes e remineralizantes alternadamente em diferentes tempos, sendo, portanto, considerada um modelo dinâmico.

Apesar de diferentes tipos de soluções desmineralizantes serem propostas e aplicadas na indução de lesões artificiais de cárie *in vitro* no intuito de simular as condições *in vivo* (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; ANDERSON; LEVINKIND; ELLIOT 1998; IIJIMA et al., 1999; KAWASAKI et al., 2000; MARGOLIS et al., 1999; ten CATE, 1996; WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995), na formação de lesões de cárie, estas soluções geralmente seguem um padrão de formulação, sendo compostas por soluções ácidas, à base de ácido láctico ou acético com a

inclusão de cálcio, fosfato (FEATHERSTONE et al., 1986; SERRA; CURY, 1992; AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; HARA et al., 2005) e mais recentemente o flúor (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003).

O emprego de uma solução remineralizante com concentração constante de íon cálcio, fósforo (FEATHERSTONE et al., 1986; SERRA; CURY, 1992; AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; HARA et al., 2005) e mesmo flúor (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003), apesar de não permitir uma total semelhança com o processo que ocorre *in vivo*, fornece a vantagem acerca do conhecimento da quantidade de íons disponíveis. O uso desses íons é justificado pela intenção de produzir uma lesão de cárie artificial com uma camada superficial relativamente intacta e rica em mineral e uma camada sub-superficial pobre em conteúdo mineral, como observada clinicamente (ten CATE; DUIJSTERS, 1982; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003). Em esmalte, já se demonstrou que as lesões artificiais de carie obtidas *in vitro* através de um modelo de ciclos de pH apresentou correlação com lesões carie produzidas *in vivo* (FEATHERSTONE et al., 1986).

Por ser um modelo dinâmico e que apresenta correlação com lesões de cárie *in vivo*, os ciclos de pH tornaram-se métodos de eleição para muitas pesquisas (WHITE, 1995), sendo utilizados em estudos que avaliam não apenas a formação de lesões artificiais de cárie (ten CATE; DUIJSTERS, 1982; FEATHERSTONE et al., 1986; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003) como também aplicados na avaliação da eficácia e no modo de ação de diversos agentes preventivos (SERRA E CURY 1992; WHITE et al., 1999; FEATHERSTONE et al., 1996; ten CATE, 1999; HARA et al., 2005; ten CATE; EXTERKATE; BUIJS, 2006).

Quanto a avaliação da progressão e inibição das lesões de cárie, alguns métodos podem ser utilizados como a microradiografia (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; FEATHERSTONE et al., 1983; KAWASAKI et al., 2000; MUKAI; ten CATE, 2002), a microdureza (FEAGIN; KOLOURIDES; PIGMAN, 1969; ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; ten CATE; DUIJSTERS, 1982; FEATHERSTONE et al., 1983; FEATHERSTONE et al., 1986; SERRA; CURY, 1992; PEREIRA et al., 1998; McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000; HARA et al., 2003; TURSSI et al., 2006) e a microscopia de luz polarizada (SCHMIDT; KEIL, 1971; WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995; McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000; HARA et al., 2003; HARA et al., 2005; CAIN et al., 2006; PERIS et al., 2007).

A microscopia de luz polarizada (McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000; HARA et al., 2003) é um método histológico para caracterização de lesões de cárie (WEFEL; CLARKSON; HEILMAN, 1985). Esta técnica faz uso das propriedades birrefringentes dos componentes do tecido dental (SCHMIDT; KEIL, 1971; McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000), para diferenciar tecidos hígidos e desmineralizados (WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995), permitindo análises em condições de umidade (WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995). Com uso de técnicas adequadas e instrumentos específicos, permite avaliação quantitativa das alterações e distribuição de mineral (WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995) e da profundidade das lesões (McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000; HARA et al., 2003; CAIN et al., 2006).

A microradiografia quantifica o conteúdo mineral, mas não o orgânico (FEATHERSTONE, 1983). Por isso, em esmalte, onde há pouca matrix orgânica, tem sido bastante utilizada (ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980;

FEATHERSTONE et al., 1983; THOMAS et al., 2007). Em dentina, este tipo de análise, apesar de aplicado (HARA et al., 2005; THOMAS et al., 2007), apresenta um fator complicador que é a contração da superfície da lesão, que ocorre devido à perda de mineral e ao colapso da matriz orgânica (WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995).

Por considerar alterações de conteúdo orgânico e inorgânico (FEATHERSTONE, et al., 1983; HARA et al., 2003), a microdureza Knoop é extensamente utilizada para avaliar lesões de cárie em esmalte (FEAGIN; KOLOURIDES; PIGMAN, 1969; ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; ten CATE; DUIJSTERS, 1982; FEATHERSTONE et al., 1983; FEATHERSTONE et al., 1986; SERRA; CURY, 1992) e dentina (PEREIRA et al., 1998; McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000; HARA et al., 2003; TURSSI et al., 2006; de MENEZES et al., 2007). É um método que permite a obtenção de dados quantitativos e, em esmalte, apresenta correlação entre microdureza Knoop e o conteúdo mineral das lesões, analisado por microrradiografia (FEATHERSTONE et al., 1983). Entretanto, em dentina, a utilização de microdureza pode ser limitada pela contração que pode ocorrer após a secagem, necessária para efetuar as indentações (WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995; HARA et al., 2003), o que poderia levar a erros na medida (HARA et al., 2003).

Dentro do processo de progressão das lesões de cárie, sabe-se que ele se inicia pela dissolução da superfície do esmalte (MARGOLIS; MORENO, 1990) e dado a importância de se avaliar as mudanças ocorridas na superfície dental, o emprego de microdureza superficial pode ser considerada a técnica mais adequada de avaliação (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003).

A microdureza superficial é um método altamente sensível que pode ser utilizado para estudar os estágios iniciais das lesões de cárie, tanto para desmineralização do esmalte (ZERO et al., 1992; de MENEZES et al., 2007) e dentina (ZERO et al., 1992; HARA et al., 2003; HARA et al., 2005; TURSSI et al., 2006; de MENEZES et al., 2007), quanto para remineralização do esmalte (WHITE, 1987; ZERO et al., 1992; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003) e dentina (HARA et al., 2003; HARA et al., 2005; TURSSI et al., 2006). White, (1987), chama atenção para o fato de a microdureza superficial ser um método atrativo para a medida da reatividade do esmalte, por ser um procedimento simples e não invasivo; observou que o conteúdo mineral da superfície do esmalte tem relação linear com a diagonal da indentação ou com sua penetração, mas que, no entanto, essa relação se restringe às lesões cariosas pouco profundas (menos de 50 μm). Além disso, o método é desejável, pois permite a realização de medidas ao longo do tempo no mesmo espécime, o que reduz o erro experimental (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003).

Em estudos relacionados à cárie, outro aspecto relevante e bastante questionado é o uso de dentes bovinos, cada vez mais utilizados em detrimento ao emprego de dentes humanos (ZERO 1995; AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998; SCHILKE et al., 2000; HARA et al., 2005; TURSSI et al., 2006; CHU et al., 2007). Além de serem mais facilmente obtidos e manipulados que os dentes humanos (MELLBERG, 1992), os substratos bovinos apresentam composição química mais uniforme, que resulta em menor variabilidade experimental (ARENDS *et al.*, 1980). Embora o esmalte bovino seja mais poroso que o humano, sugere-se que existam apenas diferenças quantitativas, e não qualitativas, entre ambos (MELLBERG, 1992; ZERO, 1995). Em relação à

dentina, a densidade dos túbulos dentinários é significativamente maior em dente bovino que em humano (SCHILKE et al., 2000) – o que poderia levar à difusão mais rápida dos ácidos (EDMUNDS; WHITTAKER; GREEN, 1988), uma maior desmineralização, e o desenvolvimento de lesões cariosas em menor tempo (FEATHERSTONE; MELLBERG, 1981; EDMUNDS; WHITTAKER; GREEN, 1988). Apesar de dentes bovinos serem bastante usados, poucos estudos compararam o substrato bovino e humano quanto ao desenvolvimento de lesões artificiais de cárie em esmalte (FEAGIN; KOLOURIDES; PIGMAN, 1969; ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980; FEATHERSTONE; MELLBERG, 1981; EDMUNDS; WHITTAKER; GREEN, 1988) ou em dentina (McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000; HARA et al., 2003).

O comportamento comparado do desenvolvimento de lesões artificiais de cárie ao longo do tempo em esmalte e dentina para o substrato humano e bovino ainda não se encontra estabelecido. Dentre os estudos que compararam ambos os substratos, em esmalte, foram utilizadas soluções ácidas tamponadas (FEAGIN; KOLOURIDES; PIGMAN, 1969; ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED, 1980) e géis acidificados (EDMUNDS; WHITTAKER; GREEN, 1988) como metodologia de indução das lesões artificiais e em dentina, géis acidificados (McINTYRE; FEATHERSTONE; FU, 2000) e um modelo *in situ* (HARA et al., 2003).

Assim, com relação à metodologia baseada em ciclos de pH, dada sua vasta aplicação em estudos sobre carie dental, tendo este se tornado método de eleição na indução de lesões artificiais de cárie (WHITE, 1995). Não existem trabalhos que, através de um protocolo de ciclos de pH, utilizando-se mesmas

soluções, avaliem a progressão de lesões artificiais de cárie, comparando-se o substrato humano ao bovino tanto para esmalte quanto para dentina.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de lesões artificiais de cárie em esmalte e dentina comparando o substrato humano ao bovino quanto a seu comportamento ao longo dos desafios cariogênicos empregados.

[PROPOSIÇÃO]

Este estudo teve como objetivos:

- 1) Avaliar se a perda mineral do substrato bovino não difere daquela apresentada pelo humano, quanto à formação de lesões artificiais de cárie em esmalte.
- 2) Avaliar a perda mineral do substrato bovino não difere daquela apresentada pelo humano, quanto à formação de lesões artificiais de cárie em dentina.
- 3) Comparar o comportamento das lesões artificiais de cárie no esmalte humano e bovino, analisadas ao longo do tempo.
- 4) Comparar o comportamento das lesões artificiais de cárie na dentina humana e bovino, analisadas ao longo do tempo.

[MATERIAIS E MÉTODOS]

Materiais e Métodos

Delineamento experimental

Os fatores em estudo foram *substrato dental* em dois níveis (humano e bovino), sendo investigados separadamente esmalte e dentina e *número de ciclos de pH*, seguindo-se um delineamento fatorial 2x9 para esmalte e 2x4 para dentina. Sessenta fragmentos de esmalte (30 bovinos e 30 humanos) e sessenta fragmentos de dentina (30 humanos e 30 bovinos) foram aleatoriamente distribuídos. A variável de resposta foi perda de conteúdo mineral, avaliada através de microdureza superficial (SMH).

Aspectos éticos

O estudo foi conduzido de acordo com as regulamentações sobre pesquisas em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Resolução nº 196, de 10 de Outubro de 1996), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (CEP nº: 0057.0.138.000-06).

Obtenção dos fragmentos dentais

Foram utilizados fragmentos dentais provenientes de incisivos inferiores bovinos e de terceiros molares humanos, com as raízes completamente formadas, extraídos por motivos não relacionados à execução deste estudo. Os dentes foram limpos com lâminas de bisturi, polidos com pedra pomes, utilizando escova de Robinson em baixa rotação, e mantidos em solução de timol a 0,1%.

Os incisivos bovinos e os molares humanos hígidos foram seccionados obtendo-se fragmentos de dentina (humana e bovina) e fragmentos de esmalte (humano e bovino) de 4 x 4 x 2 mm. Os fragmentos foram então incluídos em resina de poliéster, planificados e polidos em politriz giratória (Phonix β – Buehler), com lixas de Al₂O₃ de granulação decrescente (400, 600 e 1200) e pasta abrasiva de alumina, sob refrigeração com água. Posteriormente, os espécimes foram lavados com água deionizada e submetidos ao ultra-som por 10 minutos em água deionizada. Os fragmentos foram então identificados, codificados e armazenados individualmente em recipientes com umidade relativa, a 37°C (TURSSI et al., 2006; de MENEZES et al., 2007).

Medida de microdureza para seleção dos fragmentos

Após a inspeção da superfície para verificação da ausência de trincas, os fragmentos foram avaliados quanto a sua microdureza superficial. Para tal, foi utilizado o microdurômetro Shimadzu HMV-2 e penetrador Knoop, com carga estática de 25 gramas aplicada por 5 segundos para esmalte (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003) e 10 gramas (TURSSI et al., 2006) aplicada por 10 segundos para dentina.

Foram realizadas cinco indentações em cada fragmento. Com base na média obtida para dentina (humana e bovina) e esmalte (humano e bovino), foram selecionados os fragmentos cujos valores ficaram mais próximos da média, não excedendo o limite superior e inferior de 20% (de MENEZES et al., 2007).

Protocolo de indução de lesões artificiais de cárie

Nos fragmentos de esmalte e de dentina foram induzidas lesões de cárie através de um modelo de ciclos de pH, semelhante ao proposto para esmalte por Featherstone et al., (1986), modificado por Serra e Curry (1992), Argenta et al., (2003) e adaptado por Hara et al., (2002), Hara et al., (2005) para dentina.

Cada fragmento tinha sua superfície externa isolada com esmalte, deixando exposta uma área circular de 7 mm², que entrava em contato com as soluções durante a dinâmica de indução das lesões de cárie artificiais.

Os espécimes de esmalte e dentina foram imersos individualmente em 1,5 ml de solução desmineralizante (1.4 mM Ca, 0.9 mM P, 0.03 ppm F, 0.05 M tampão acetato, pH 5.0) por 1 hora, sendo então lavados com água deionizada, e posteriormente imersos em 1,5 ml de solução remineralizante (1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 0.05 ppm F, 0.1 M tampão Tris, pH 7.0) por 22 horas, o que correspondeu a um ciclo de pH.

Medidas repetidas de microdureza

Mensurações diárias da microdureza superficial foram conduzidas ao final de cada ciclo de pH, sendo que para esmalte foram conduzidos oito ciclos, enquanto que para dentina foram conduzidos apenas três. As leituras foram conduzidas de forma análoga ao descrito para a seleção dos espécimes.

Análise Estatística

A análise dos dados foi conduzida com o auxílio do programa Statgraphics Centurion XV, a um nível de significância de $\alpha = 0,05$. A Análise de Variância (ANOVA) foi conduzida seguindo-se o delineamento fatorial 2x9, para esmalte; e 2x4 para dentina. Análises de Regressão foram utilizadas para determinar a equação do modelo que rege a perda de conteúdo mineral ao longo do tempo de indução das lesões de cárie.

[RESULTADOS]

Resultados

Esmalte

A Análise de Variância (ANOVA) demonstrou diferenças altamente significativas para o fator substrato ($p < 0,01$) e para o fator ciclos ($p < 0,01$). Não houve interação significativa entre os fatores substrato e ciclos ($p = 0,9731$). Apesar de não ter sido possível inferir as diferenças estatísticas a cada ciclo, pode ser observado (Gráfico 01), que o esmalte bovino apresentou maiores taxas de desmineralização ao longo do tempo.

O efeito do fator ciclos foi verificado pelas Análises de Regressão. Dessa forma foram encontradas as funções que regem o comportamento da KHN ao longo do desafio cariogênico. O melhor ajuste para os substratos humano e bovino foi encontrado através das funções exponenciais descritas abaixo. O Gráfico 01 ilustra a progressão das lesões artificiais em esmalte ao longo do desafio cariogênico.

$$\text{SMH bovino} = \exp(5,80198 - 0,124173^{\text{Ciclos}})$$

$$\text{SMH humano} = \exp(5,83061 - 0,104358^{\text{Ciclos}})$$

Gráfico 01: Progressão das lesões artificiais em esmalte ao longo do desafio cariogênico.

Substrato	Número de ciclos de pH								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Humano	362	289	268	244	229	210	184	164	145
	(6,3)	(7,4)	(7,7)	(9,5)	(10,0)	(9,6)	(8,8)	(8,1)	(7,5)
Bovino	344	268	259	232	207	182	157	141	118
	(5,3)	(8,2)	(6,8)	(9,7)	(10,7)	(9,4)	(8,4)	(8,6)	(7,2)

*Valores de SMH ao longo do desafio cariogênico

** Entre parênteses – Erro padrão.

Dentina

Para dentina, a Análise de Variância (ANOVA) revelou diferenças altamente significativas para o fator substrato ($p < 0,01$) e para o fator ciclos ($p < 0,01$), não sendo observada interação significativa entre os fatores substrato e ciclos ($p = 0,7361$).

Através de Análises de Regressão avaliou-se o efeito do fator ciclos ao longo do tempo. O Gráfico 02 ilustra a progressão das lesões artificiais em esmalte ao longo do desafio cariogênico. Foram encontradas as funções que regem o comportamento da KHN ao longo do desafio cariogênico para dentina, sendo que o melhor ajuste para os substratos humano e bovino foram as funções exponenciais descritas abaixo.

$$\text{SMH bovino} = \exp(3,94473 - 0,498893 * \text{Ciclos})$$

$$\text{SMH humano} = \exp(4,00579 - 0,484446 * \text{Ciclos})$$

Gráfico 02: Progressão das lesões artificiais em dentina ao longo do desafio cariogênico.

Substrato	Número de ciclos de pH			
	0	1	2	3
Humano	61,1	29,8	19,5	14,0
	(1,7)	(1,3)	(0,7)	(0,4)
Bovino	58,8	26,8	17,7	12,8
	(1,5)	(1,0)	(0,6)	(0,3)

*Valores de SMH ao longo do desafio cariogênico

** Entre parenthesis – Erro padrão.

[DISCUSSÃO]

Discussão

Entre os modelos existentes para a indução de lesões de cárie, todos apresentam vantagens e limitações quanto sua aplicação. Entretanto, o uso de ciclos de pH é considerado o método mais próximo de indução em relação à formação natural das lesões de cárie (ten CATE, 1990) por ele reproduzir a dinâmica do processo alternando tempos de desmineralização e remineralização como acontece clinicamente (FEATHERSTONE, 2004). Além disso, ciclos de pH aplicados sobre o esmalte dental na indução de lesões artificiais apresenta correlação com as lesões naturais encontradas *in vivo* (FEATHERSTONE et al., 1986).

Em relação á escolha da microdureza superficial como uma das variáveis de resposta, esta foi feita, pelo fato do método ser considerado rápido e não destrutivo (ZAMFIROVA et al., 2003), além de possibilitar a condução de medidas ao longo do tempo no mesmo espécime, ao final de cada ciclo de pH (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003). O delineamento adotado permitiu a obtenção da equação do modelo ajustado que rege a perda de conteúdo mineral ao longo do tempo e, para ambos os substratos o valor de r^2 observado foi maior que 90%.

Para que as leituras de microdureza pudessem ser realizadas na superfície dos substratos dentais ao longo do tempo, modificações no modelo de ciclos de pH descritos por Featherstone et al., (1986) foram realizadas. O volume e o tempo de imersão em solução desmineralizante foram diminuídos tanto em para esmalte quanto para dentina. Também foram acrescidas pequenas concentrações de flúor (0,03 ppm na solução desmineralizante e 0,05 na solução remineralizante). Estas alterações foram realizadas com o intuito de conter a agressividade do desafio cariogênico promovido pelo modelo e permitir assim, leituras diárias de

microdureza superficial ao longo da progressão das lesões artificiais de cárie. As avaliações das alterações ocorridas nos valores de microdureza superficial dos substratos dentais apresentam extrema relevância, no que se refere aos processos de desmineralização e remineralização, uma vez que as principais interações entre os tecidos dentais e o meio bucal ocorrem na sua camada superficial (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003).

Apesar das similaridades entre o substrato humano e bovino, seja em esmalte ou dentina, a Análise de Variância demonstrou diferença significativa entre ambos, e a progressão mais rápida dos substratos bovinos pode ser observada nos Gráficos 01 e 02. A Análise de Regressão revelou que em ambos os substratos, a redução dos valores de dureza foi regida por equações exponenciais. As equações relacionadas ao decréscimo dos valores de dureza ao longo do tempo mostram que o comportamento de ambos os substratos é similar (Gráficos 01 e 02). Entretanto, uma maior taxa de desmineralização foi observada para o substrato bovino, corroborando com outros estudos (FEATHERSTONE; MELLBERG, 1981; EDMUNDS; WHITTAKER; GREEN, 1988). A explicação para tal fato é que a alta susceptibilidade do esmalte bovino a episódios cariogênicos poderia estar relacionada à sua alta porosidade (ARENDS et al., 1989). Microscopicamente, o esmalte humano e bovino exibe similares orientações nos cristais prismáticos. Todavia, o esmalte bovino apresenta uma grande região interprismática em relação ao humano (BOYDE, 1965; BOYDE, 1971). Além disso, deve-se também considerar que a superfície do esmalte humano pode apresentar uma alta incorporação de fluoretos, o que sabidamente reduz suas taxas de dissolução mineral (ELLWOOD et al., 2008).

Neste estudo *in vitro* a metodologia aplicada para a indução das lesões artificiais de cárie possibilitou a indução de uma dentina desmineralizada em ambos os substratos. Ao contrario do esmalte o substrato dentinário apresenta um menor conteúdo mineral - sendo constituído por matéria inorgânica (70%), matéria orgânica (20%) e água (10%) (NANCI, 2003) – e neste modelo de indução de lesões de carie, um aspecto a ser considerado é a ausência de componentes orgânicos na solução remineralizante utilizada.

A formação de uma lesão de carie, clinicamente pode se estender por semanas, meses ou anos; dado às respostas biológicas que podem ocorrer como, a formação de dentina reacional (WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995). Contrariamente ao que acontece na indução de uma lesão de carie artificial, que, geralmente é realizada em poucas horas. Diferente do descrito para esmalte, onde as leituras de microdureza foram conduzidas por oito dias (8 ciclos de pH), em dentina estes testes de microdureza superficial foram conduzidos por apenas três dias (3 ciclos de pH), dado que este substrato apresenta um menor conteúdo mineral quando comparado ao esmalte (NANCI, 2003) e também pelo fato de que após este número de ciclos a mensuração microdureza superficial se tornava crítica.

Outro aspecto a ser levado em consideração é o fato de alguns autores criticarem a utilização da microdureza para a avaliação de alterações ocorridas no substrato dentinário, pautados em um encolhimento da indentação que ocorreria devido à secagem necessária para sua realização (WEFEL; HEILMAN; JORDAN, 1995), levando à introdução de erros nos valores mensurados (HARA ET AL., 2003). Todavia, neste estudo os dados dos valores de microdureza foram obtidos de espécimes não desidratados e os valores de dureza medidos imediatamente

após a indentação ter sido realizada, evitando-se assim a influência que a deformação elástica da dentina teria nos dados de microdureza superficial (HERKSTRÖTER et al., 1989), padronizando-se as condições de todas as amostras.

Apesar da dentina humana e bovina terem apresentado um comportamento semelhante (Gráfico 2), ao longo do tempo, o substrato bovino sempre apresentou uma menor taxa de desmineralização, e este fato pode ser associado a sua morfologia. Os túbulos dentinários bovinos possuem sua base maior voltada para a superfície externa do dente (DUTRA-CORREA; ANAUATE-NETTO; ARANA-CHAVEZ, 2007), diferente dos túbulos em dentina humana, que têm sua base maior voltada para o tecido pulpar (NANCI, 2003). Essas diferenças podem influenciar a permeabilidade de cada substrato quanto a aplicação das soluções durante o desafio cariogênico empregado para a indução das lesões em dentina.

Em relação ao desenvolvimento das lesões cárie, ainda existem detalhes a serem esclarecidos, sendo que, o entendimento do fenômeno clínico ainda tende a buscar suas respostas em simplificados estudos *in vitro*. Os conhecimentos obtidos com este trabalho, não serão aplicados á situações clínicas, mas que, no entanto podem ser utilizados como um modelo viável para a avaliação e desenvolvimento de medidas e materiais que levem ao controle do processo *in vivo* da doença cárie.

Conclusões

Dadas as limitações dos estudos *in vitro*, o modelo aplicado foi capaz de induzir lesões de cárie tanto em esmalte quanto em dentina para ambos os substratos (humano e bovino). Apesar de uma desmineralização mais rápida no substrato bovino em relação ao humano, tanto para esmalte quanto para dentina, conclui-se que este pode ser utilizado em detrimento a dentes humanos em estudos de cárie dental.

[REFERÊNCIAS]

Referências¹

1. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Factors affecting development of carious lesions in bovine teeth in vitro. **Arch. Oral Biol.**, v.43, p.619-628, 1998.
2. ANDERSON, P.; LEVINKIND, M.; ELLIOT, J.C. Scanning microradiographic studies of rates *in vitro* desmineralization in human and bovine dental enamel. **Arch Oral Biol.**, v. 43, n. 8, p. 649-56, 1998.
3. ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; JONGEBLOED, W.G. Lesions depth and microhardness Indentations on Artificial White Spot Lesions. **Caries Res.**, v.14, p.190-195, 1980.
4. ARENDS, J.; SCHUTHOF, J. Microhardness and Lesion depth studies of Artificial Caries Lesions: a Comparison of Gelatin and HEC based Systems. **J. Biol. Buccale.**, v.8, p. 175-181, 1980.
5. ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J.; RUBEN, J.; JONGEBLOED, W.L. Remineralization of bovine dentine *in vitro*. The influence of the F contents in solution on mineral distribution. **Caries Res.**, v.23, n.5, p.309-314, 1989.
6. ARGENTA, R.M.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. **Pesq. Odont. Bras.**, v.17, p. 241-246, 2003.
7. BOYDE A. **Dental morphology and evolution**. Chicago University Press, Chicago, ed. Dahlberg A. A, p. 81-94, 1971.
8. BOYDE A. **Tooth Enamel** (Eds Stack M. V. and Fearnhead R. W.), Wright, Bristol, p.163-167, 1965.
9. CAIN, K.; HICKS, J.; ENGLISH, J.; FLAITS, C.; POWERS, J.M.; RIVES, T. In vitro enamel caries formation and orthodontic bonding agents. **Am. J. Dent.**, v.19; p.187-192, 2006.
10. CHU, J.P.; LI, J.Y.; HAO, Y.Q.; ZHOU. X.D. Effect of compounds of *Galla chinensis* on remineralisation of initial enamel carious lesions in vitro. **J. Dent.**, v.35, p.383-387, 2007.
11. DAMATO, F.A.; STRANG, R.; STEPHEN, K.W. Comparison of Solution- and Gel-prepared Enamel Lesions an in vitro pH-cycling Study. **J. Dent. Res.**, v. 67, n. 8, p. 1122-1125, 1988.

¹ De acordo com as normas da ABNT.

12. de MENEZES, M.; TURSSI, C.P.; FARAONI-ROMANO, J.J.; SERRA, M.C. Susceptibility of bleached enamel and root dentin to artificially formed caries-like lesions. **Am. J. Dent.**, v.20, p. 173-176, 2007.
13. DUTRA-CORREA, M.; ANAUATE-NETTO, C.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. **Arch. Oral Biol.**, v.52, p.850-855, 2007.
14. EDMUNDS, D.H.; WHITTAKER, D.K.; GREEN, R.M. Suitability of human, bovine, equine, and ovine tooth enamel for studies of artificial bacterial carious lesions. **Caries Res.**, v.22, p.327-336, 1988.
15. ELLWOOD, R.; FEJERSKOV, O.; CURY, J.A.; CLARKSON, B. Fluoride in caries control. In: **Dental caries: the disease and its clinical management**. Fejerskov O, Kidd E (Editors). 2nd. ed. Oxford: Blackwell & Munksgaard; p.287-323, 2008.
16. FEAGIN, F.; KOULOURIDES, T.; PIGMAN, W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization and associated hardness changes in human and bovine material. **Arch. Oral Biol.**, v.14, n.12, p. 1407-1417, 1969.
17. FEAGIN, F.; PATEL, P.R.; KOULOURIDES, T.; PIGMAN, W. Study of effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces. **Arch. Oral Biol.**, v.16, n.5, p.535-548, 1971.
18. FEATHERSTONE, J.D.B.; MELLBERG, J.R. Relative rates of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. **Caries Res.**, v.15, p.109-114, 1984.
19. FEATHERSTONE, J.D.B.; O'REALLY, M.M.; SHARIATI, M.; BRUGLER, S. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. In: **Factors Relating to Demineralization and Remineralization of the Teeth**. Leach SA (Editor). Oxford: IRL, p. 23-34, 1986.
20. FEATHERSTONE, J.D.B.; ten CATE, J.M.; SHARIATI, M.; ARENDS, J. Comparison of artificial caries like-lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**, v.17, p.385-391, 1983.
21. FEATHERSTONE, J.D. The continuum of dental caries evidence for a dynamic disease process. **J. Dent. Res.**, v.83 (Spec Issue) No C, p.C39-42. 2004.
22. FEATHERSTONE, J.D.B.; MELLBERG, J.R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine, and human enamel. **Caries Res.**, v.15, p.109-114, 1981.

23. FONTANA, M.; DUNIPACE, A.J.; GREGORY, R.L.; NOBLITT, T.W.; LI, Y.; PARK, K.K.; STOOKEY, G.K. An in vitro microbial model for studying secondary caries formation. **Caries Res.**, v.30, p.112–118, 1996.
24. GAMA-TEIXEIRA, A.; SIMIONATO, M.R.L.; ELIAN, S.N.; SOBRAL, M.A.P.; LUZ, M.A.A.C. Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro. **Brazilian Oral Res.**, São Paulo, v.21, n.4, 2007.
25. HALS, E.; MÖRCH, T.; SAND, H.S. Effect of lactate buffers on dental enamel in vitro – as observed in polarizing microscope. **Acta. Odont. Scand.**, v.13, n.1, p.88-122, 1955.
26. HARA, A.T.; MAGALHÃES, C.S.; SERRA, M.C.; RODRIGUES Jr, A.L. Cariostatic effect of fluoride-containing restorative systems associated with dentifrices on root dentin. **J. Dent.**, v.30, p.205-212, 2002.
27. HARA, A.T.; QUEIROZ, C.S.; FREITAS, P.M.; GIANNINI, M.; SERRA, M.C.; CURY, J.A. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentin. **European J. Oral Sci.**, v.113, p. 245-250, 2005.
28. HARA, A.T.; QUEIROZ, C.S.; PAES-LEME, A.F.; SERRA, M.C.; CURY, J.A. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. **Caries Res.**, v.37, p.339-344, 2003.
29. HERKSTRÖTER, F.M.; WITJES, M.; RUBEN, J.; ARENDS, J. Time dependency of microhardness indentations in human and bovine dentin compared with human enamel. **Caries Res.**, v.23, p.342-44, 1989.
30. HSU, C.Y.S.; DONLY, K.J.; DRAKE, D.R.; WEFEL, J.S. Effects of aged fluoride-containing restorative materials on recurrent root caries. **J. Dent. Res.**, v.77, p.418–425, 1998.
31. IJIMA, Y.; TAKAGI, O.; RUBEN, J.; ARENDS, J. *In vitro* remineralization of *in vivo* and *in vitro* formed enamel lesions. **Caries Res.**, v.33, n.3, p.206-213, 1999.
32. KAWASAKI, K.; RUBEN, J.; TSUDA, H.; HUYSMANS, M.C.D.N.J.M.; TAGAKI, O. Relationship between mineral distributions in dentine lesions and subsequent remineralization in vitro. **Caries Res.**, v.34, p.395-403, 2000.
33. MARGOLIS, H.C.; MORENO, E.C. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. **J. Dent. Res.**, v.69(Spec Issue), p.606-613, 1990.
34. MARGOLIS, H.C.; ZHANG, Y.P.; LEE, C.Y.; KENT, R.L.J.R.; MORENO, E.C. Kinetics of enamel demineralization *in vitro*. **J. Dent. Res.**, v.78, n.7, p. 1326-1335, 1999.

35. MCINTYRE, J.M.; FEATHERSTONE, J.D.B.; FU, J. Studies of dental root surface caries. 1: Comparison of natural and artificial root caries lesions. **Aust. Dent. J.**, v.45, p.24-30, 2000.
36. MELLBERG, J.R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. **J. Dent. Res.**, v.71 (Spec Issue), p.913-919, 1992.
37. MUKAI, Y.; ten CATE, J.M. Remineralization of advanced root dentin lesions in vitro. **Caries Res.**, v.36, p.275-280, 2002.
38. NANJI, A. **Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function**. 6rd ed. 445p., Mosby: St. Louis, 2003.
39. NEWBRUN, E.; TIMBERLAKE, P.; PIGMAN, W. Changes in microhardness of enamel following treatment with lactate buffer. **J. Dent. Res.**, v.38, n.2, p.293- 300, 1959.
40. NOORDA, W.D.; PURDELL-LEWIS, D.J.; de KONING, W.; van MONTFORT, A.M.; WEERKAMP, A.H. A new apparatus for continuous cultivation of bacterial plaque on solid surfaces and human dental enamel. **J. Appl. Bacteriol.**, v.58, p.563–569, 1985.
41. PEREIRA, P.N.R.; INOKOSHI, S.; YAMADA, T.; TAGAMI, J. Microhardness of in vitro caries inhibition zone adjacent to conventional and resin-modified glass ionomer cements. **Dent. Materials**, v.14, p.179-185, 1998.
42. PERIS, A.R.; MITSUI, F.H.; LOBO, M.M.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; MARCHI, G.M. Adhesive systems and secondary caries formation: Assessment of dentin bond strength, caries depth and fluoride release. **Dent. Materials**, v.23, p.308-316, 2007.
43. SCHILKE, R.; LISSON, J.A.; BAUSS, O.; GEURTSSEN, W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Arch. Oral Biol.**, v.45, p.355-361, 2000.
44. SCHMIDT, W.J.; KEIL, A. **Polarizing microcopy of dental tissues**. Oxford: Pergamon Press, 1971.
45. SERRA, M.C.; CURY, J.A. The in vitro effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. **Quint. Int.**, v.23, p.143-147, 1992.
46. SILVERSTONE, L.M. The effect of fluoride in the remineralization of enamel caries and caries-like lesions in vitro. **J. Publ. Health Dent.**, v.42, n.1, p.42-53, 1982.

47. SMITH, P.W.; PRESTON, K.P.; HIGHAM, S.M. Development of an in situ root caries model. A. In vitro investigations. **J. Dent.**, v.33, n.3, p.253-267, 2005.
48. TANG, G.; YIP, H.K.; CUTRESS, T.W.; SAMARANAYAKE, L.P. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **J. Dent.**, v.31, p.161–171, 2003.
49. ten CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P.E. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res.**, v.16, p.201-210, 1982.
50. ten CATE, J.M.; EXTERKATE, M.J.; BUIJS, M.J. The relative efficacy of fluoride toothpastes assessed with pH cycling. **Caries Res.**, v.40, p.136-141, 2006.
51. ten CATE, J.M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontol. Scand.**, v.57, p. 325-329, 1999.
52. ten CATE, J.M. In vitro studies on the effects of fluoride on de-and remineralization. **J. Dent. Res.**, v.69 (Spec Issues), p.614–619, 1990.
53. ten CATE, J. M. Preparation and measurement of artificial enamel lesions, a four-laboratory ring test. **Caries Res.**, v.30, n.6, p.400-407, 1996.
54. THOMAS, R.Z.; RUBEN, J.L.; ten BOSH, J.J.; HUYSMANS, M.C. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. **J. Dent.**, v.35, p.547-551, 2007.
55. TORII, Y.; ITOTA, T.; OKAMOTO, M.; NAKABO, S.; NAGAMINE, M.; INOUE, K. Inhibition of artificial secondary caries in root by fluoride-releasing restorative materials. **Oper Dent.**, v.26, n.1, p.36-43, 2001.
56. TURSSI, C.P.; LIMA, R.Q.; FARAONI-ROMANO, J.J.; SERRA, M.C. Rehardening of caries-like lesions in root surfaces by saliva substitutes. **Gerodontol.**, v.23, p.226-230, 2006.
57. WEFEL, J.S.; CLARKSON, B.H.; HEILMAN, J.R. Natural root caries: a histological and microradiographic evaluation. **J. Oral Pathol.**, v.14, p.615-623, 1985.
58. WEFEL, J.S.; HEILMAN, J.R.; JORDAN, T.H. Comparison of in vitro root caries models. **Caries Res.**, v.29, p.204-209, 1995.
59. WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. **Caries Res.**, v. 21, p.126-140, 1987.

60. ZAMFIROVA, G.; LORENZO, V.; BENAVENTE, R.; PERENA, J.M. On the relationship between modulus of elasticity and microhardness. **J. App. Polymer Sci.**, v.88, p.1794–1798, 2003.
61. ZERO, D.T.; FU, J.; ANNE, K.M.; CASSATA, S.; MCCORMACK, S.M.; GWINNER, L.M. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. **J. Dent. Res.**, v.71 (Spec Issue), p.871-878, 1992.
62. ZERO, D.T. In situ caries models. **Adv. Dent. Res.**, v.9, p.214–230, 1995.

Fluxograma – Capítulo 01

Fragmentos de esmalte e dentina de substratos humano e bovino medindo 4x4x2 foram embutidos, planificados, polidos e levados ao ultra-som. Em sua superfície, isolou-se uma área de 7mm² e avaliou-se a microdureza superficial (KNH, Knoop) utilizando-se carga estática e tempo de aplicação de 25g, por 5s para esmalte e 10 g por 10 segundos para dentina. Os espécimes foram então submetidos a ciclos de pH, para a indução de lesões artificiais de cárie. Leituras de microdureza superficiais foram conduzidas ao final de cada ciclo de pH tendo sido realizados 8 ciclos para esmalte e 3 ciclos para dentina.

Capítulo 02

Agentes Remineralizantes no Controle de Lesões

Artificiais de Cárie em Esmalte Bovino.

REHDER-NETO FC. **Agentes Remineralizantes no Controle de Lesões Artificiais de Cárie em Esmalte Bovino**. 2008. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a progressão de lesões artificiais de cárie em esmalte bovino, na presença ou ausência de agentes potencialmente remineralizantes. Fragmentos de esmalte bovino foram embutidos, planificados e polidos. Em sua superfície, isolou-se uma área de 7mm² e avaliou-se a microdureza superficial (MDS, Knoop, 25g, 5s). Lesões incipientes de cárie foram induzidas através de um modelo de des-remineralização (1 e 23 h, respectivamente). Novas medidas de MDS foram realizadas (MDS_{pós-lesão}). Instituíram-se, então, os seguintes tratamentos com: 1) dentifrício regular (RE, 1.100 ppm F, Sensodyne, GSK); 2) dentifrício contendo um vidro bioativo (VB, Oravive); 3) pasta à base de fosfato de cálcio amorfo, estabilizado por fosfopeptídeo de caseína (CPP-ACP, MI Paste, GC America) ou 4) CPP-ACP com 900 ppm F (MI Plus Paste, GC America). O grupo controle não foi exposto a qualquer agente potencialmente remineralizante (n=15). Aplicaram-se os tratamentos cinco vezes, sendo estes intercalados por um novo desafio cariogênico. Mensurou-se a MDS_{final}. A ANOVA, aplicada à diferença percentual entre as MDS_{final}/MDS_{pós-lesão}, revelou diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,0161$). Os espécimes expostos ao VB (7,1%)^a, RE (6,7%)^a e CPP-ACP+F (3,8%)^a apresentaram menor perda mineral em relação àqueles que serviram como controle (11,0%)^b. O grupo CPP-ACP (3,2%)^{ab} não diferiu dos demais. Conclui-se que, na dependência do agente utilizado, pode haver efeito remineralizante, que se reflete no controle da progressão de lesões de cárie.

Palavras-chave: Lesão artificial de cárie; Esmalte; Microdureza; Remineralização; ciclos de pH; CPP-ACP; Fosfosilicato de cálcio e sódio.

REHDER-NETO FC. **Potential remineralizing agents to control artificial enamel caries lesions.** 2008. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Abstract

The aims of this study were to investigate pastes containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) and calcium sodium phosphosilicate (VB) to control artificial caries lesion progression. Enamel slabs of bovine teeth were embedded in polyester resin and had their enamel surfaces serially polished, and tested for surface microhardness (SMH) with a static load of 25 g applied for 5 s. After preformed incipient caries-like lesions they were evaluated by microhardness ($SMH_{\text{post-lesion}}$) and randomly assigned to five treatment groups ($n=15$): 1) regular dentifrice (RE, 1.100 ppm F, Sensodyne, GSK); 2) dentifrice with bio glass (VB, Oravive); 3) amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptide (CPP-ACP, MI Paste, GC America); 4) CPP-ACP with 900 ppm F (MI Plus Paste, GC America) and 5) Control group - not exposed to any remineralising agent ($n=15$). Treatments were applied five times, after the demineralization period in the cariogenic challenges. Post-treatments SMH measurements were conducted ($SMH_{\text{post-treatment}}$). The ANOVA applied to the percentage difference between $SMH_{\text{post-treatment}}/SMH_{\text{post-lesion}}$, reveals a significant difference among the treatments ($p=0.0161$). The specimens exposed to VB (7.1%), RE (6.7%) and CPP-ACP+F (3.8%), showed lower mineral loss content in relation to those that was used as a control group (-11.0%). The group CPP-ACP (3.2%) did not differed from the other groups. The remineralizing effect is dependent of the remineralizing agent used, which reflects over the control of caries lesions progression.

Keywords: Artificial Caries Lesion; Enamel; Microhardness; Remineralization; pH cycles; CPP-ACP; calcium sodium phosphosilicate.

[INTRODUÇÃO E REVISÃO]

Capítulo 02

Introdução e Revisão

Substanciais avanços têm sido feitos sobre novos produtos e métodos empregados no controle da progressão das lesões de cárie, sendo que, apesar dos estudos clínicos continuarem considerados o padrão ouro de avaliação (CASALS et al., 2007), a dificuldade e os custos atrelados à condução desse tipo de estudo (ten CATE et al., 2008) tem levado os pesquisadores a buscarem novas opções, fazendo dos modelos *in vitro* uma viável alternativa. Em relação a carie dental, estudos laboratoriais, quando bem delineados e controlados, podem fornecer subsídios valiosos e eficazes na avaliação do potencial anti cariogênico de determinados produtos (CASALS et al., 2007).

A diminuição das propriedades mecânicas do esmalte dental está relacionada a alterações do conteúdo mineral, devido à desmineralização que ocorre no processo de cárie (FEATHERSTONE et al., 1983; ARENDS; ten BOSCH, 1992; MARSHALL et al., 2001) e com relação aos métodos empregados para seu controle, o uso de flúor² têm se destacado como um dos métodos mais efetivos (FEJERSKOV, 1996, CURY et al., 2004; ELLWOOD et al., 2008). Assim, por desempenhar um papel importante no controle da cárie, o flúor tem sido adicionado a diversos produtos para uso individual e profissional (ELLWOOD et al., 2008). O flúor pode atuar tanto no processo de desmineralização dental, inibindo a progressão das lesões (ten CATE, 1990; CURY et al., 2004; HARA et al. 2005; ELLWOOD et al., 2008) quanto no processo de remineralização, alterando a estrutura dental, tornando a sua superfície menos solúvel (FEJERSKOV, 1996; ELLWOOD et al., 2008).

O uso de dentifrícios contendo flúor tem sido apontado como a principal causa da redução de cárie em diversos países, nas últimas décadas (RÖLLA;

ØGAARD; CRUZ., 1991; BARTIZEK et al., 2001), além de ser considerado o modo mais simples e racional de controlar a doença cárie em diferentes grupos etários (RICHARDS; BANTING 1996). De fato, inúmeros estudos clínicos têm demonstrado que os usos de dentifrícios fluoretados podem reduzir os índices de cárie em aproximadamente 25% quando comparado com o uso de dentifrícios não fluoretados (CLARKSON; ELLWOOD; CHANDLER, 1993).

Contudo, apesar dos dentifrícios regulares contendo 1000 ppm de flúor se mostrarem efetivos no controle de lesões de cárie em esmalte (RICHARDS; BANTING 1996), novos materiais para potencializar a remineralização dental em condições cariogênicas, têm sido propostos, como por exemplo, o uso de dentifrícios com maior concentração de flúor (FEATHERSTONE et al. 2007) ou a aplicação de agentes bioativos (RAHIOTIS; VOUGIOUKLAKIS, 2007). Estes agentes teriam em sua composição compostos de fosfato de cálcio (como o ACP*), associado ou não a fosfopeptídeo de caseína (CPP**) (REYNOLDS, 1997), ou ainda vidros bioativos contendo em sua composição fosfosilicato de cálcio e sódio (Novamin***) (FEATHERSTONE et al., 2007).

Em relação a estes produtos, tem sido demonstrado que soluções contendo ACP-CPP apresentam um efeito benéfico no controle de lesões cariosas (REYNOLDS, 1997), mas quando utilizado na forma de pasta ou dentifrício, resultados conflitantes têm sido obtidos. Hicks e Flaitz (2006) e Oshiro et al., (2007), demonstraram um efeito positivo no controle da progressão das lesões de cárie, quando uma pasta contendo CPP-ACP foi utilizada como tratamento anti-cariogênico, enquanto que Pulido et al. (2008) e Kumar et al. (2008) não observaram um efetivo efeito remineralizante quanto da aplicação destas pastas na progressão de lesões de cárie. Em relação aos materiais

bioativos, quando aplicados a lesões radiculares estes, têm demonstrado um potencial efeito anti cariogênico com e sem a adição de flúor a sua composição (FEATHERSTONE et al., 2007), no entanto, ainda não existem estudos que tenham avaliado seus efeitos no esmalte dental. De modo que, é necessária a condução de estudos que comprovem e avaliem a efetividade desses dentifrícios para posterior indicação aos pacientes (PULIDO et al., 2008) e até o presente momento não existem estudos que comparem a efetividade da aplicação destes novos agentes, potencialmente remineralizantes no controle da progressão de lesões de cárie em esmalte.

Considerando os vários modelos *in vitro* que podem ser aplicados para induzirem-se lesões artificiais de cárie, a utilização de ciclos de pH têm sido descrito como um método que pode trazer informações importantes, não disponíveis em estudos clínicos na avaliação da eficácia de novos produtos ou agentes remineralizantes (ten CATE et al., 2008).

Dessa maneira, pouco se sabe quanto à progressão de lesões de cárie em esmalte após aplicação de diferentes pastas – contendo fosfosilicato de cálcio e sódio; compostos de fosfato de cálcio associado a fosfopeptídeo de caseína e dentifrício regular. Sendo também inexistentes estudos que comparem os diferentes tipos de tratamentos, e com base nos aspectos apontados, o objetivo desse estudo é avaliar *in vitro* o efeito de potenciais agentes remineralizantes no controle da progressão de lesões de cárie em esmalte bovino.

■

Flúor: denominação genérica para definir as formas iônicas (fluoreto), ionizável e não ionizável do elemento F.

*ACP: Fosfato de Cálcio Amorfo

**CPP: Fosfopeptídeo de Caseína

***Novamin: Fosfosilicato de Sódio e Cálcio

[PROPOSIÇÃO]

O presente estudo teve com proposta:

Avaliar e comparar a resposta da aplicação de diferentes agentes remineralizantes no controle da progressão de lesões de cárie em esmalte bovino.

[MATERIAIS E MÉTODOS]

Materiais e Métodos

Delineamento experimental

Segundo um delineamento em blocos completos casualizados, fragmentos de esmalte bovino foram aleatoriamente distribuídos entre os cinco grupos experimentais (n=15). O fator em estudo foi *tratamento* em cinco níveis (Tabela 01). A variável de resposta quantitativa foi perda mineral, avaliada através de microdureza de superfície (KNH).

Obtenção dos fragmentos dentais

Foram utilizados fragmentos dentais provenientes de incisivos inferiores bovinos. Os dentes foram limpos com lâminas de bisturi, polidos com pedra pomes, utilizando escova de Robinson em baixa rotação, e mantidos em solução de timol a 0,1%.

Os incisivos bovinos foram seccionados na junção amelo-cementária e fragmentos de esmalte medindo 4 x 4 x 2 mm foram obtidos da superfície vestibular (de MENEZES et al., 2007). Os espécimes foram então incluídos em resina de poliéster e a planificação e polimento realizada em politriz giratória (Phonix β – Buehler), com lixas de Al₂O₃ de granulação decrescente (400, 600 e 1200) e pasta abrasiva de alumina, sob refrigeração com água (TURSSI et al., 2006; de Menezes et al., 2007). Posteriormente, os espécimes foram lavados com água deionizada e submetidos ao ultra-som por 10 minutos em água deionizada. Os fragmentos foram codificados e armazenados individualmente em recipientes com umidade relativa, a 37°C (TURSSI et al., 2006; de MENEZES et al., 2007).

Medida de microdureza para seleção dos fragmentos

Após a inspeção da superfície para verificação da ausência de trincas, os fragmentos foram avaliados quanto a sua microdureza superficial. Para tal, foi utilizado o microdurômetro Shimadzu HMV-2 e penetrador Knoop, com carga estática de 25 gramas aplicada por 5 segundos (Argenta et al., 2003). Foram realizadas cinco endentações em cada fragmento e selecionados os espécimes cujos valores ficaram mais próximos da média, não excedendo o limite superior e inferior de 20% (de MENEZES et al., 2007).

Através de um sorteio aleatorizado, os fragmentos foram então divididos em cinco grupos de acordo com respectivo tratamento a ser aplicado: A) dentifrício regular (RE, 1.100 ppm F, Sensodyne, GSK) B) dentifrício contendo um vidro bioativo (VB, Tooth Revitalizing Paste, Oravive,) C) CPP-ACP (CPP-ACP, MI Paste, GC America) D) CPP-ACP com 900 ppm Flúor(CPP-ACP, MI Paste Plus, GC America) (Tabela 01) e E) grupo controle (não exposto a qualquer agente potencialmente remineralizante).

Tabela 01 – Agentes Remineralizantes.

Produto	Sigla	Ingredientes Ativos	Fluoreto	Lote
Sensodyne (Sensodyne, GSK)	RE	Nitrato de Potássio 5%	1100 ppm (NaF)	705072
MI Paste (GC America)	CCP-ACP	Fosfato de Cálcio Amorfo e Fosfopeptídeo de Caseína	-	070316t
MI Paste Plus (GC America)	CCP-ACP+F	Fosfato de Cálcio Amorfo e Fosfopeptídeo de Caseína	900ppm (NaF)	070309t
Tooth Revitalizing Paste (Oravive)	VB	Fosfosilicato de Sódio e Cálcio, Silica	-	0610301

* Fonte: De acordo com as informações do fabricante contidas na embalagem.

Protocolo de indução de lesões artificiais de cárie

Cada fragmento teve sua superfície externa isolada com esmalte, deixando exposta uma área circular de cerca de 7,0 mm², a qual entrava em contato com as soluções durante a dinâmica de indução das lesões de cárie artificiais.

Em todos os espécimes foram induzidas lesões de cárie através de um modelo de ciclos de pH. Os espécimes de esmalte eram imersos individualmente em 1,5 ml de solução desmineralizante (1.4 mM Ca, 0.9 mM P, 0.03 ppm F, 0.05 M tampão acetato, pH 5.0) por 1 hora, sendo então lavados com água deionizada, e posteriormente imersos em 1,5 ml de solução remineralizante (1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 0.05 ppm F, 0.1 M tampão Tris, pH 7.0) por 22 horas, o que correspondia a um ciclo de pH. Modelo semelhante aos propostos por Featherstone et al., (1986) e Argenta et al., (2003) para esmalte.

Medidas de microdureza pós-lesão

Inicialmente, três ciclos de pH foram conduzidos antes que os tratamentos fossem instituídos, de forma a criar uma lesão de cárie incipiente. Após os ciclos de pH iniciais mensurações de microdureza foram realizadas (MDS_{pós-lesão}), de forma análoga ao realizado na seleção dos fragmentos.

Tratamentos remineralizantes

Após a formação das lesões, foram então instituídos os tratamentos remineralizantes, realizados concomitantemente a novos ciclos de pH.

Antes da aplicação dos produtos, todos os espécimes receberam sobre sua superfície a aplicação uma fina camada de saliva artificial. A saliva artificial utilizada foi similar a descrita por McKnight-Hanes and Whitford (1992), sendo

modificada pela exclusão do sorbitol. Sendo composta por (em g:L): Methyl-*p*-hydroxybenzoate, 2 g; sodium carboxymethyl cellulose, 10 g; KCl, 0.625 g; MgCl₂.6H₂O, 0.059 g; CaCl₂.2H₂O, 0.166 g; K₂HPO₄, 0.804 g; KH₂PO₄, 0.326 g. A viscosidade da saliva foi simulada pelos dois primeiros componentes enquanto que os outros constituintes formam a parte inorgânica a níveis comparáveis àqueles encontrados na saliva natural. A saliva teve seu pH ajustado para 6,75 utilizando-se KOH (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1999).

A aplicação dessa camada de saliva artificial sobre todos os espécimes antes da instituição do agente remineralizante foi realizada com o intuito de simular o que acontece clinicamente na superfície dental, e devido à recomendações-do fabricante quanto à aplicação dos agentes ACP-CPP e ACP-CPP+F, justificando a contribuição da saliva no processo de remineralização.

Assim, após de período de imersão em solução desmineralizante e aplicação da camada de saliva, os tratamentos com dentifrícios (grupos VB e RE) foram aplicados através de um “slurry” preparado em água deionizada na proporção de 1:3. (TURSSI et al., 2004). Enquanto que os tratamentos com pastas (ACP-CPP e ACP-CPP+F) foram realizados através de aplicação tópica pelos mesmos 90 s. A aplicação dos tratamentos foi realizada por cinco dias.

Medida de microdureza pós-tratamento

Ao término das aplicações dos tratamentos, novas leituras de microdureza Knoop (MDS_{final}) foram conduzidas. Para tal, foi empregada a mesma carga estática e tempo utilizado para a seleção dos fragmentos e na avaliação pós-lesão.

Análise Estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados no programa Statgraphics Centurion XV, considerando o nível de significância de 5%. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) para delineamento do tipo split-polt revelando diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,0161$). O Teste de Tukey aplicado à diferença percentual entre as $MDS_{final}/MDS_{pós-lesão}$.

[RESULTADOS]

Resultados

Os espécimes expostos ao VB (7,1%)^a, RE (6,7%)^a e CPP-ACP+F (3,8%)^a apresentaram menor perda mineral em relação àqueles que serviram como controle (11,0%)^b. O grupo CPP-ACP (3,2%)^{ab} não diferiu dos demais (Gráfico 1).

Gráfico 1: Resposta dos tratamentos no controle da progressão das lesões de cárie.

[DISCUSSÃO]

Discussão

A proposta deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes dentifrícios e pastas remineralizantes contendo fosfosilicato de cálcio e sódio e compostos de cálcio e fosfato após a indução de lesões de cárie artificial em esmalte. O método escolhido para a indução das lesões foi o de ciclos de pH, pelo fato deste possibilitar a reprodução da dinâmica do processo de formação das lesões de cárie alternando tempos de desmineralização e remineralização (ten CATE, 1990; FEATHERSTONE et al., 1986; ten CATE et al., 2008); além de ser um método aplicado já aplicado em diversos estudos para se avaliar a ação de dentifrícios (DAMATO; STRANG; STEPHEN, 1990; CURY et al., 2004; VIEIRA et al., 2005; FEATHERSTONE et al. 2007; CASALS et al., 2007; PULIDO et al., 2008).

Contudo em relação ao modelo de ciclos de pH utilizado, pequenas concentrações de fluoretos (0,03 e 0,05 ppm F) foram respectivamente adicionadas às soluções desmineralizante e remineralizante empregadas. Essas concentrações simulam as concentrações de flúor encontradas na saliva (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003; VIEIRA et al., 2005) sendo este aspecto relevante na formação de uma lesão de cárie sub-superficial típica onde a superfície do esmalte se mantivesse preservada, permitindo assim, a análise superficial da microdureza ao longo do tempo (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003).

Em uma condição de subsaturação iônica, a desmineralização do esmalte resulta da dissolução da hidroxiapatita pela difusão de íons cálcio (Ca) e fosfato (P) em direção à superfície externa do esmalte. A hiper-saturação destes íons na superfície resulta em uma re-precipitação destes íons ou remineralização formando uma camada de hidroxiapatita que recompõe essa camada superficial

do esmalte (ARNOLD et al., 2006). Note-se, portanto que a maior parte das interações dentais no meio bucal ocorre na camada superficial do substrato dental (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003). De modo que os dados obtidos através da microdureza superficial podem fornecer informações importantes a cerca das mudanças ocorridas na estrutura superficial do esmalte, e, em relação a estas mudanças, valores positivos são indicativos do grau de remineralização alcançado, enquanto que os valores negativos são indicativos de desmineralização (CASALS et al., 2007) (Gráfico 1).

Dentro do processo de remineralização dental sabe-se que a presença dos íons cálcio e fosfato, encontrados na saliva são essenciais. No entanto, os componentes orgânicos da saliva também influenciam no processo de remineralização, um aspecto a ser considerado. De modo que, um cuidado adicional foi tomado, sendo feita a aplicação de uma pequena e fina película de saliva artificial contendo compostos orgânicos e inorgânicos sobre a superfície dos espécimes antes da aplicação dos tratamentos remineralizantes, na tentativa de se imitar o que acontece clinicamente e também favorecer o processo de remineralização.

Freqüentemente empregada em estudos que avaliam remineralização dental (WHITE, 1987; WHITE, 1995; FALLER et al., 1997; VIEIRA et al., 2005; NEWBY et al., 2006, CASALS et al., 2007), quando comparado a outros métodos, a análise da microdureza superficial apresenta algumas vantagens, como o seu baixo custo e técnica simplificada, além de ser um método não destrutivo (ZAMFIROVA et al., 2003) e permitir assim medidas ao longo do tempo no mesmo espécime, reduzindo a variação experimental (ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003) refletindo as alterações minerais que poderiam ocorrer em função

dos tratamentos aplicados (WHITE, 1987; WHITE, 1995; NEWBY et al., 2006, CASALS et al., 2007). Aspectos estes importantes e levados em consideração frente ao delineamento do tipo “spli-plot” adotado.

De fato, o emprego da microdureza superficial aplicado a variações percentuais do conteúdo mineral revelou que todos os tratamentos aplicados tiveram um efeito positivo no que tange a taxas de remineralização (Gráfico 1). Os grupos tratados com VB, RE e CCP-ACP+F tiveram as menores taxas na redução da microdureza quando comparados ao grupo controle. O grupo tratado com CPP-ACP teve uma resposta intermediária, apresentando um efeito positivo, mas não diferindo do grupo controle.

Em relação ao grupo tratado com VB, a tecnologia dos materiais bioativos (Novamin) ainda parece estar nos estágios iniciais de desenvolvimento, sendo que estudos *in vitro* ou *in situ* que suportem o seu emprego como agente remineralizante no controle de lesões de cárie em esmalte não foram encontrados (REYNOLDS, 2008). Assim, para este grupo, uma possível explicação para os resultados encontrados estaria no fato de que quando o vidro bioativo é exposto a uma solução aquosa, as interações químicas que se formam entre o meio e o material bioativo, leva à modificação das partículas vítreas contidas no material liberando um conteúdo iônico rico em cálcio e fosfato para o ambiente bucal. Além disso, na presença de hidrogênio ionizado, este é capaz de reagir com as partículas vítreas do material complexando íons sódio, elevando o pH do meio (GILLAN ET AL., 2002). O conteúdo iônico liberado das partículas vítreas formaria uma camada superficial rica em cálcio e fosfato (SCHEPERS; DUCHEYNE, 1997; GILLAM ET AL., 2002). Este reservatório iônico formado poderia proteger o esmalte contra novos episódios cariogênicos, atuando nas condições de

saturação do meio, inibindo a desmineralização e favorecendo a remineralização dental.

Para os grupos tratados com CPP-ACP o mecanismo de ação estaria relacionado ao complexo formado da reação que envolve os fosfopeptídeos de caseína com cálcio e fosfato amorfos (REYNOLDS, 2008), o que formaria uma solução supersaturada com relação às fases amorfas e cristalinas de cálcio e fosfato que serviriam de reserva desses íons frente a novos desafios cariogênicos, favorecendo processo de remineralização (REYNOLDS, 1998; REYNOLDS, 2008). Entretanto, para o grupo CPP-ACP, apesar do grau positivo de remineralização (Gráfico 01), este não diferiu do grupo controle corroborando com o observado por Pulido et al. (2008). Já em relação ao grupo CPP-ACP+F, era esperado que a presença de íons flúor elevasse o grau de remineralização e de fato, em relação ao grupo controle isso ocorreu (Gráfico 1). Entretanto, apesar do aumento observado, o grupo CPP-ACP+F não diferiu do grupo CPP-ACP (Gráfico 1), também corroborando com o descrito por Pulido et al. (2008). Especula-se que a presença de íons flúor na composição do produto poderia levar a uma reação entre estes íons e o ACP (componente do complexo de caseína), formando como precipitado dessa reação fluoreto de cálcio, tornando os componentes inorgânicos (CPP-ACP) não efetivos (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008). Assim, parece ser sugestivo afirmar que a presença de 900 ppm de Flúor poderia ser o principal responsável pelas taxas de remineralização observadas para o grupo tratado com CPP-ACP+F e de fato estes resultados corroboram com o descrito por Kumar et al. (2008), que relata que um maior potencial remineralizante foi conseguido quando da utilização de uma pasta contendo ACP-CPP combinado a um dentífrico fluoretado do que quando este foi utilizado

sozinho. Contudo, uma recente revisão sistemática, conclui que ainda não existem evidências em termos de eficácia e eficiência que levem a recomendar os derivados de caseína, mais especificamente CPP-ACP no controle de lesões de cárie (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008).

Para o grupo tratado com RE, o grau e remineralização observado pode ser relacionado à presença de 1100 ppm de flúor (NaF) em sua composição. Sabe-se que o íon fluoreto circundante a estrutura dental é capaz de interferir nos processos de desmineralização e remineralização dental (FEJERSKOV, 1996; ten CATE, 1999; ARGENTA; TABCHOURY; CURY, 2003; CURY et al., 2004; ten CATE et al., 2008). A presença de íons flúor no meio oral faz com que íons cálcio, seguido de íons fosfato sejam atraídos e se precipitem sobre a superfície do esmalte favorecendo a remineralização dental (FEJERSKOV, 1996; ten CATE, 1999; CURY et al., 2004; TANTBIROJN et al., 2008; ELLWOOD et al., 2008). Além disso, a presença de fluoretos pode modificar a estrutura da apatita do esmalte, e dentro do processo de remineralização levar a formação de uma apatita fluoretada, tornando a superfície do esmalte menos solúvel (WHITE, 1987; DAMATO; STRANG; STEPHEN, 1990; FEJERSKOV, 1996; ELLWOOD et al., 2008).

O uso de dentifrícios associado à escovação dental para o controle da doença cárie pode ser considerado um método relativamente simples e efetivo, que, entretanto é largamente dependente de fatores como, nível sócio-econômico e sócio-cultural, hábitos de higiene pessoal, disponibilidade e habilidade dos indivíduos em comprar e fazer uso desses produtos de modo regular (GOLDMAN et al., 2008). Dentre os dentifrícios testados, ao considerar a recomendação de uso para pacientes, o custo destes produtos e os resultados obtidos com este

trabalho, o dentifrício fluoretado continua sendo a escolha mais viável para o controle do desenvolvimento de lesões de cárie.

Conclusão

Baseado nos resultados obtidos, e dentro das limitações de um estudo *in vitro*, foi possível concluir que todos os tratamentos empregados demonstraram um efeito remineralizante, mostrando que as aplicações de materiais bioativos podem vir a se tornar uma alternativa aplicável no controle de lesões de cárie. Entretanto, o emprego e a indicação de pastas contendo CPP-ACP e dentifrícios baseados em fosfosilicatos de cálcio e sódio, dependem da condução de mais estudos.

[REFERÊNCIAS]

Referências²

1. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Factors influencing the development of dental erosion in vitro: enamel type, temperature and exposure time. **J. Oral Rehab.**, v. 26, p.624–30, 1999.
2. ARENDS, J.; ten BOSCH, J.J. Demineralisation and remineralisation evaluation techniques. **J Dent Res.**, v.71, p.924-928, 1992.
3. ARGENTA, R.M.; TABCHOURY, C.P.; CURY, J.A. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. **Pesq. Odont. Bras.**, v.17, p. 241-246, 2003.
4. ARNOLD, W.H.; DOROW, A.; LANGENHORST, S.; GINTNER, Z.; BÁNÓCZY, J.; GAENGLER P. Effect of fluoride toothpastes on enamel demineralization. **BMC Oral Health.**, v.15 p.1-6, 2006.
5. AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK H. Clinical Efficacy of Casein Derivatives: A Systematic Review of the Literature. **JADA.**, v.139, p. 915-24, 2008.
6. BARTIZEK, R.D.; GERLACH, R.W.; FALLER, R.V.; JACOBS, S.A.; BOLLMER, B.W.; BIESBROCK, A.R. Reduction in dental caries with four concentrations of sodium fluoride in a dentifrice: A meta analysis evaluation. **J. Clin. Dent.**, v.12, p.57-62, 2001.
7. CASALS, E.; BOUKPESSI, T.; McQUEEN, C.M.; EVERSOLE, S.L.; FALLER RV. Anticaries Potential of Commercial Dentifrices as Determined by Fluoridation and Remineralization Efficiency. **J. Cont. Dent. Pract.**, v.8, p.1-19, 2007.
8. CLARKSON, J.E.; ELLWOOD, R.P.; CHANDLER, R.E. A comprehensive summary of fluoride dentifrice caries clinical trials. **Am. J. Dent.**, v.6, p. S59–S106, 1993.
9. CURY, J.A.; TENUTA, L.M.A.; RIBEIRO, C.C.C.; PAES-LEME, A.F. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. **Braz. Dent. J.**, n.15 p.167–174, 2004.
10. DAMATO, F.A.; STRANG, R.; STEPHEN, K.W. Effect of fluoride concentration on remineralization of carious enamel: an *in vitro* pH-cycling study. **Caries Res.**, v.24 p.174-180, 1990.
11. de MENEZES, M.; TURSSI, C.P.; FARAONI-ROMANO, J.J.; SERRA, M.C. Susceptibility of bleached enamel and root dentin to artificially formed caries-like lesions. **Am. J. Dent.**, v.20, p. 173-176, 2007.

² De acordo com as normas da ABNT.

12. ELLWOOD, R.; FEJERSKOV, O.; CURY, J.A.; CLARKSON, B. Fluoride in caries control. In: **Dental caries: the disease and its clinical management**. Fejerskov O, Kidd E (Editors). 2nd. ed. Oxford: Blackwell & Munksgaard; p.287-323, 2008.
13. FALLER, R.V.; PFARRER, A.M.; EVERSOLE, S.L.; COX, E.R.; LANDRIGAN, W.F.; WANG, Q. The comparative anticaries efficacy of Crest toothpaste relative to some marketed Chinese toothpastes – results of in vitro pH cycling testing. **Inter. Dent. J.**, v.47, p.313-20, 1997.
14. FEATHERSTONE, J.D.B.; O'REALLY, M.M.; SHARIATI, M.; BRUGLER, S. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. In: **Factors Relating to Demineralization and Remineralization of the Teeth**. Leach SA (Editor). Oxford: IRL, p. 23-34, 1986.
15. FEATHERSTONE. J.D.B.; RAPOZO-HILO, M.L.; RECHMANN, P.; RECHMANN, B.; GREENSPAN, D. In Vitro Root Caries Inhibition by Phosphosilicate and Fluoride Dentifrices. **J. Dent. Res.** 2007 - Abstract 0501 – IADR (www.dentalresearch.org).
16. FEATHERSTONE, J.D. The science and practice of caries prevention. **JADA.**; v.131, n.7, p.887-99, 2000.
17. FEJERSKOV, O.; CLARKSON, B.H. Dynamics of caries lesion formation. In: **Fluoride in dentistry**. Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA: (Editors). 2nd. Ed. Copenhagen: Munksgaard, p.187–214, 1996.
18. GILLAM, D.G.; TANG, J.Y.; MORDAN, N.J.; NEWMAN, H.N. The effects of a novel Bioglass dentifrice on dentine sensitivity: a scanning electron microscopy investigation. **J. Oral Rehab.**, v.29, n.4, p.305-13, 2002.
19. GOLDMAN. A.S.; YEE, R.; HOLMGREN, C.J.; BENZIAN, H. Global affordability of fluoride toothpaste. **Global Health** v. 13, p.1-8, 2008.
20. HARA, A.T.; QUEIROZ, C.S.; FREITAS, P.M.; GIANNINI, M.; SERRA, M.C.; CURY, J.A. Fluoride release and secondary caries inhibition by adhesive systems on root dentin. **European J.Oral Sci.**, v.113, p. 245-250, 2005.
21. HICKS, M.J.; FLAITZ, C. Amorphous calcium phosphate- casein phosphopeptide paste: Effect on enamel caries formation. **J. Dent. Res.**, n. 85(Special Issue A), 2006 - Abstract #0501 IADR (www.dentalresearch.org).
22. KUMAR, V.L.N.; ITTHAGARUN, A.; KING, N.M. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. **Aust. Dent J.**, v.53, p.34–40, 2008.

23. MARSHALL, G.W.; HABELITZ, S.; GALLAGHER, R.; BALOOCH, M.; BALOOCH G. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentine. **J. Dent. Res.**, v.80, n.8, p.768-1771. 2001.
24. McKNIGHT-HANES, C.; WHITFORD, G.M. Fluoride release from three glass ionomer materials and the effects of varnishing with or without finishing. **Caries Res.**, v.26, p.345-350, 1992.
25. NEWBY, C.S.; CREETH, J.E.; REES, G.D.; SCHEMEHORN, B.R. Surface microhardness changes, enamel fluoride uptake, and fluoride availability from commercial toothpastes. **J. Clin. Dent.**, v.17 (Special Issue), p.94-99, 2006.
26. OSHIRO, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKAMIZAWA, T.; INAGE, H.; WATANABE, T.; IROKAWA, A.; ANDO, S.; MIYAZAKI, M. Effect of CPP-ACP paste on tooth mineralization: an FE-SEM study. **J. Oral Sci.**, v.49, p.115-120, 2007.
27. PULIDO, M.T.; WEFEL, J.S.; HERNANDEZ, M.M.; DENEHY, G.E.; GUZMAN-ARMSTRONG, S.; CHALMERS, J.M.; 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.**, v.33, n.5, p.550-555, 2008.
28. RAHIOTIS, C.; VOUGIOUKLAKIS, G. Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. **J. Dent.**, v.35, p. 695-698, 2007.
29. REYNOLDS, E.C. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. **Special Care Dent.**, v.18, p.8–16, 1998.
30. REYNOLDS, E.C. Remineralization of Enamel Subsurface Lesions by Casein Phosphopeptide-stabilized Calcium Phosphate Solutions. **J. Dent. Res.**, v.76, p.1587-1595, 1997.
31. REYNOLDS, E.C. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? **Aust. Dent. J.**, v.53, p.268–73, 2008.
32. RICHARDS, A.; BANTING, D.W. Fluorides toothpastes. In: **Fluoride in dentistry**. Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA: (Editors). 2nd. ed Copenhagen: Munksgaard, p.328–346, 1996.
33. RÖLLA, G.; ØGAARD, B.; CRUZ, R.D. Fluoride containing toothpastes, their clinical effect and mechanism of cariostatic action: a review. **Int. Dent. J.**, v.41, p.171-174, 1991.
34. SCHEPERS, E.J.; DUCHEYNE, P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. **J. Oral Rehab.**, v.24, n.3, p.171-81, 1997.

35. TANTBIROJN, D.; HUANG, A.; ERICSON, M.D.; POOLTHONG, S. Change in surface hardness of enamel by a cola drink and a CPP-ACP paste. **J. Dent.**, v.36, p.74-9, 2008.
36. ten CATE B. The role of saliva in mineral equilibrium caries, erosion and calculus formation. In: Edgar M, Dawes C, O'Mullane D, editors. **Saliva and Oral Health.**, 3rd ed. London: BDJ Books; p. 120–35, 2004.
37. ten CATE, J.M. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odont. Scandinavica.**, v.57, n.6, p.325-329, 1999.
38. ten CATE, J.M. In vitro studies on the effects of fluoride on de and remineralization. **J. Dent. Res.**, v.69, p.614–619, 1990.
39. ten CATE, J.M.; BUIJS, M.J.; MILLER, C.C.; EXTERKATE, R.A. Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. **J. Dent. Res.**, v.87 n.10, p.943-947, 2008.
40. TURSSI, C.P.; FARAONI, J.J.; RODRIGUES Jr, A.L.; SERRA, M.C. An in situ Investigation into the Abrasion of Eroded Dental Hard Tissues by a Whitening Dentifrice. **Caries Res.**, v.38, p.473-477, 2004.
41. TURSSI, C.P.; LIMA, R.Q.; FARAONI-ROMANO, J.J.; SERRA, M.C. Rehardening of caries-like lesions in root surfaces by saliva substitutes. **Gerodontol.**, v.23, p.226-230, 2006.
42. VIEIRA, A.E.; DELBEM, A.C.; SASSAKI, K.T.; RODRIGUES, E.; CURY, J.A.; CUNHA, R.F. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res.**, v.39 p.514-520, 2005.
43. WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early carious lesions: Fluoride uptake, surface hardening and remineralization. **Caries Res.**, v.21, p.126-140, 1987.
44. WHITE, D.J. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. **Adv. Dent. Res.**, v.9, p.175-193, 1995.
45. ZAMFIROVA, G.; LORENZO, V.; BENAVENTE, R.; PERENA, J.M. On the relationship between modulus of elasticity and microhardness. **J. App. Poly. Sci.**, v.88, p.1794–8, 2003.