



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

ALINE LAIGNIER SOARES

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE VERNIZES FLUORETADOS COM
DIFERENTES FORMULAÇÕES NAS LESÕES INICIAIS DE CÁRIE
ARTIFICIAIS EM DENTES DECÍDUOS**

**EFFECT OF FLUORIDE VARNISH APPLICATION WITH DIFFERENT
FORMULATIONS ON EARLY ARTIFICIAL CARIOUS LESIONS IN
PRIMARY TEETH**

Piracicaba
2016

ALINE LAIGNIER SOARES

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE VERNIZES FLUORETADOS COM
DIFERENTES FORMULAÇÕES NAS LESÕES INICIAIS DE CÁRIE
ARTIFICIAIS EM DENTES DECÍDUOS**

**EFFECT OF FLUORIDE VARNISH APPLICATION WITH DIFFERENT
FORMULATIONS ON EARLY ARTIFICIAL CARIOUS LESIONS IN
PRIMARY TEETH**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Odontologia, na área de Odontopediatria

Dissertation of Master presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Dentistry, in Pediatric Dentistry area.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE
LAIGNIER SOARES E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. FERNANDA MIORI PASCON.

Piracicaba
2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marlene Girello - CRB 8/6159

So11e Soares, Aline Laignier, 1989-
Efeito da aplicação de vernizes fluoretados com diferentes formulações nas lesões iniciais de cárie artificiais em dentes decíduos / Aline Laignier Soares. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Fernanda Miori Pascon.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Remineralização dentária. 2. Compostos de flúor. 3. Cárie dentária. I. Pascon, Fernanda Miori, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of fluoride varnish application with different formulations on early artificial carious lesions in primary teeth

Palavras-chave em inglês:

Tooth remineralization

Fluorine compounds

Dental caries

Área de concentração: Odontopediatria

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Fernanda Miori Pascon [Orientador]

Luciana Andrea Salvio

Maria Beatriz Duarte Gavião

Data de defesa: 22-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2016, considerou a candidata ALINE LAIGNIER SOARES aprovada.

PROFª. DRª. FERNANDA MIORI PASCON

PROFª. DRª. LUCIANA ANDREA SALVIO

PROFª. DRª. MARIA BEATRIZ DUARTE GAVIÃO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

A Deus por ter me dado forças, sabedoria, paciência, sempre me mostrar os melhores caminhos e ser meu amigo em todos os momentos, nunca me desamparando.

Aos meus amados pais, José e Ana por me incentivarem, me apoiarem, me aproximarem de Deus e serem meus exemplos em tudo nesta vida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À minha orientadora, Profª Drª **Fernanda Miori Pascon**, pela confiança depositada na realização deste trabalho. Por dispor do seu tempo para me orientar. Obrigada pelos bons momentos de convivência e por compartilhar seu conhecimento comigo e me mostrar os caminhos certos me ajudando a alcançar os objetivos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

*À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. **Guilherme Elias Pessanha Henriques***

*À Profª Drª **Cinthia Pereira Machado Tabchoury**, coordenadora dos Cursos de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, por ser exemplo de profissionalismo e sempre estar disposta a ajudar seus alunos.*

*À Profª Drª **Juliana Napimoga**, coordenadora do curso de pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, pela atenção e pelo exemplo de profissionalismo.*

*Agradeço à todos os professores do curso de pos-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa dos Professores Drs. **Jaime A. Cury** e **Pedro Rosalen**, pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento e formação, por serem inspiração e exemplo.*

*À Profª Drª **Marinês Nobre dos Santos**, por todos os ensinamentos concedidos.*

*À Profª Drª **Maria Beatriz Duarte Gavião**, por ser exemplo de dedicação e pesquisadora competente.*

*À Profª Drª **Regina Maria Puppim Rontani**, pela contribuição neste trabalho e por dividir tão bem seu conhecimento.*

*À Profª Drª **Carolina Alarcon**, pelos sábios conselhos e por ser exemplo de dedicação.*

*Ao funcionário do laboratório de Odontopediatria da FOP-Unicamp, **Marcelo Corrêa Maistro**, pela ajuda e pela convivência sempre muito agradável.*

*À **Ana Paula Carone** e **Domingos**, secretários da Coordenadoria de Pós Graduação da FOP-Unicamp, à **Shirley**, secretária do departamento de Odontologia Infantil, à **Maria Elisa dos Santos**, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela dedicação, pela atenção e disponibilidade.*

*À Drª. **Rita de Cássia Pedroni** e aos colegas de profissão, mães e pacientes pela doação dos dentes decíduos, o que permitiu a realização dessa pesquisa. Obrigada pela ajuda.*

Aos amigos da Área de Odontopediatria:

***Aline Pedroni**, Obrigada por ser a amiga de todas as horas. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas, pela parceria e por entrar de cabeça nas minhas aventuras. Obrigada por ser sempre fiel. Você foi um presente lindo que ganhei. Sentirei saudades do nosso dia a dia.*

***Micaela Cardoso**, Obrigada por me presentear com sua amizade, por me acompanhar nas altas madrugadas de pesquisa, me ajudar sempre e ser grande amiga. Você tem o maior coração que já vi.*

***Darlle Araujo**, Obrigada por me ensinar a ser mais tolerante, por me ensinar a ser mais sensata, por ser sempre tão doce.*

***Lenita Lopes**, Obrigada por compartilhar os aprendizados comigo e pelos bons momentos que tive ao seu lado.*

***Jossária Sousa**, Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos incríveis que dividimos e pela amizade verdadeira.*

***Fernanda Mazoni**, Obrigada por dividir comigo as conquistas, aflições e alegrias.*

***Daniela Cibim**, você é um anjo. Obrigada por tudo!*

***Kelly Maria e Andréia Cardoso**, mineiras lindas e companheiras perfeitas, obrigada pela amizade, apoio, motivação e por me ouvirem sempre que precisei.*

***Filipe Martins**, Obrigada pela motivação, pela amizade, pela ajuda constante e indispensável e por sempre me entender.*

***Samuel** amigo incrível, sem você o mestrado não seria o mesmo. Obrigada por fazer o mestrado ser mais leve e doce.*

***Claudia Lobelli**, obrigada por sua amizade sempre fiel e por ser inspiração. Você é iluminada.*

***Livia Pagotto**, Obrigada pelos momentos agradáveis, por me ajudar sempre que precisei e pelos conselhos sempre muito válidos.*

***Alexandra Iwamoto**, Obrigada por sempre ser tão disponível e por ajudar sempre sem medir esforços.*

*À amiga **Mariana Ilha**, por sua amizade mesmo distante, por dividir comigo as dúvidas e os aprendizados. Você é uma das pessoas mais responsáveis por eu estar aqui. Obrigada por ter acreditado em mim e ter feito eu acreditar que podia estudar na FOP-Unicamp. Sinto muito sua falta.*

*Aos amigos do Espaço Novo Tempo, em especial: **Andressa, Rafaela, Ana Carolina, Katia, Júlio e Paulo**, vocês fizeram Piracicaba se tornar mais alegre, obrigada por me aproximar de Deus, pela amizade mais pura e doce e pelas orações.*

*Aos amigos da FITLIFE, em especial : **Carol, Dani, Thalita, Amanda Luciana e Pedro**, Obrigada por tornar a minha vida em Piracicaba mais leve e por me divertirem tanto. A amizade de vocês é muito importante.*

*À Professora **Camila Fiorim**, pelo entusiasmo de ensinar e por me contagiar, pela dedicação em meu aprendizado, pela amizade. Você é a melhor descoberta que fiz em Piracicaba. O inglês se tornou mais prazeroso com você. Você é sensacional.*

*À minha amada avó, **Perlo-White Valentim Laignier**, pelas orações, pelo amor sempre a mim dedicado e por sempre me querer bem.*

*Ao meu namorado, **Gabriel Grunewald Paiva**, por me amar, pelo carinho, cumplicidade, por despertar o melhor que eu posso ser, por entender minha ausência, por me apoiar e me querer ver crescer*

*Aos meus sogros, **Sonimar e Welington Paiva**, por todo apoio, por torcerem por mim e me tratarem como filha, sempre me recebendo carinhosamente.*

*À minha amada irmã, **Fernanda Laignier Siqueira**, por me ensinar que existem várias formas de amar alguém, por ser fonte de inspiração, por suas orações e por me fazer querer ser uma pessoa melhor. Você é única.*

*À minha querida irmã, **Josana Laignier Soares Teixeira**, pela confiança, por ser exemplo constante em minha vida, por ser minha amiga, ser companheira, torcer sempre por mim.*

*Ao meu cunhado, **Rafael Calheiros Teixeira**, por ser um irmão, um amigo, por ser uma pessoa tão boa e ter alegrado minha família.*

*Aos meus pais, **José Siqueira Soares e Ana da Conceição Laignier Soares**, pelo amor incondicional, pela confiança, por entenderem minhas escolhas, me apoiarem quando eu estava certa e me alertarem dos caminhos errados que eu queria trilhar, por serem as melhores pessoas, por sempre orarem por mim. Quando seus joelhos estavam dobrados, Deus me fazia mais forte. Eu amo vocês.*

“Ele põe um sorriso no meu rosto. Ele é o Meu Deus.”
Salmos 42:5

RESUMO

O objetivo neste estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito de três vernizes de fluoreto de sódio a 5% (NaF), sendo dois deles com formulação modificada (RECALDENT™ - CPP-ACP e Tri-Cálcio Fosfato - TCP), em lesões de cárie iniciais em dentes decíduos, submetidas ao desafio cariogênico. Sessenta e quatro blocos de esmalte (4x4 mm) de dentes decíduos foram selecionados e as lesões iniciais foram produzidas utilizando-se solução desmineralizadora sub-saturada em relação à hidroxiapatita, por 16 horas. Estes blocos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=16): Controle Negativo – água deionizada; Controle Positivo - Duraphat® (verniz de NaF a 5%); MI Varnish™ (verniz de NaF a 5% com RECALDENT™ - CPP-ACP) e Vanish™ (verniz de NaF a 5% com TCP). Em seguida, os materiais foram aplicados sob os blocos e armazenados em saliva artificial por 12 horas, e após remoção, os blocos foram submetidos à ciclagem de pH por 7 dias (solução desmineralizadora – 2 horas; solução remineralizadora – 22 horas). Os blocos foram seccionados e analisados quanto: a perda mineral (dureza Knoop), a profundidade das lesões (microscopia de luz polarizada - MLP) e quantidade de cálcio (Ca) e fósforo (P) (espectroscopia por energia dispersiva - EDS). Para a dureza Knoop foram realizadas três fileiras de 12 impressões (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 μ m) (25g/5s). Valores de dureza Knoop (KHN) foram obtidos e a variação do KHN (Δ S) foi calculada. Para a profundidade foram realizadas 3 medidas em cada lesão (em μ m) e calculada a média. Para EDS, os espécimes foram observados em microscopia eletrônica de varredura e a quantidade de Ca, P e a relação Ca/P foi calculada nas regiões superficiais. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov. Os dados de Δ S foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey. Os dados da MLP, para comparação das áreas pré e pós-tratadas, foram submetidos ao teste-t pareado. Para a comparação entre os grupos, os dados da MLP e EDS foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$). Não foi observada diferença significativa nos valores de Δ S entre Duraphat®, MI Varnish™ e Vanish™, mas foi observada diferença entre os vernizes fluoretados e controle negativo ($p<0,05$), indicando efeitos positivos de tratamento com vernizes fluoretados. Os resultados de MLP não mostraram diferença significativa para o pré-tratamento ($p=0,1548$). O controle negativo apresentou aumento na profundidade da lesão e os grupos tratados apresentaram diminuição na profundidade da lesão ($p=0,004$). No entanto, não houve diferença significativa na porcentagem de alteração entre os grupos tratados com os vernizes ($p=0,764$). Em relação à análise EDS, não foi observada diferença significativa nas taxas de Ca, P e Ca/P entre os grupos ($p>0,05$). Pode-se concluir que todos os vernizes fluoretados, sejam apenas com fluoreto de sódio ou com adição de CPP-ACP ou TCP foram eficazes para promover a remineralização em lesões iniciais de cárie de dentes decíduos.

Palavras-chave: Remineralização dentária. Compostos de flúor. Cárie dentária.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the effect of three fluoride varnishes (5% NaF), two of them with modified formulation (Recaldent™ - CPP-ACP and Tri-Calcium Phosphate) in early caries lesion in primary teeth, submitted to cariogenic challenge. Sixty-four enamel blocs (4x4 mm) of primary teeth were selected and were produced using demineralizing sub-saturated solution concerning hydroxyapatite for 16h. This blocs were randomly divided into 4 groups (n = 16): Negative Control - deionized water; Positive Control - Duraphat® (5% NaF varnish); MI Varnish™ (NaF varnish with 5% Recaldent™ - CPP-ACP) and Vanish™ (5% NaF varnish Tri-Calcium Phosphate - TCP). Then, the materials were applied in the blocks and stored in artificial saliva for 12 hours, were removed and subjected to pH cycling for 7 days (demineralizing solution - 2 hours; remineralizing solution - 22 hours). The specimens were sectioned and analyzed: mineral loss (Knoop hardness), the depth of lesions (polarized light microscopy - MLP) and the amount of calcium (Ca) and phosphorus (P) (energy dispersive spectroscopy - EDS). For Knoop hardness were performed three rows of 12 print (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 μ M) (25g / 5s). Knoop hardness (KHN) was obtained and the variation of KHN (Δ S) was calculated. For depth were carried out 3 measures each lesion (in μ m) and averaged. For SDS, the samples were observed by SEM and the amount of calcium and phosphorus was calculated in surface regions. The results were submitted to the Kolmogorov-Smirnov normality test. The data Δ S were submitted to ANOVA and Tukey test. Data from the MLP, to compare the pre and post-treated areas were submitted to paired t-test. For comparison between groups, data from the MLP and EDS were submitted to the Kruskal-Wallis test ($\alpha = 5\%$). There was no significant difference in values between Δ S Duraphat®, MI Varnish™ and Varnish™ but was difference between fluoride varnishes and negative control ($p < 0.05$), demonstrating positive effects of treatment with fluoride varnishes. The results of MLP showed no significant difference to the pre-treatment ($p = 0.1548$). The negative control showed an increase in the depth of the lesion and treated groups showed decrease in the lesion depth ($p = 0.004$). However, there was no significant difference in the percentage change between the groups treated with varnish ($p = 0.764$). Regarding the EDS analysis, there was no significant difference in the Ca, P and Ca / P rates between groups ($p > 0.05$). It can be concluded that all fluoride varnishes, are only fluoride varnishes, sodium fluoride or CPP-ACP or TCP were effective to promote remineralization of initial carious lesions of deciduous teeth.

Keywords: Tooth Remineralization, Fluoride Varnishes, dental caries

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 ARTIGO – EFFECT OF FLUORIDE VARNISH APPLICATION WITH DIFFERENT FORMULATIONS ON EARLY ARTIFICIAL CARIOUS LESIONS IN PRIMARY TEETH	18
3 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXOS	41
ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP	41
ANEXO 2 – Declaração	42
APÊNDICE 1 - Figuras ilustrativas com a descrição da metodologia empregada no estudo	43

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é um problema de saúde pública, altamente prevalente (Selwitz et al., 2007). No Brasil, de acordo com dados do SB Brasil (2010), aos 5 anos de idade, 53,4% das crianças brasileiras possuem lesões de cárie na dentição decídua. Nessa idade uma criança brasileira possui, em média 2,43 dentes com experiência de cárie (com predomínio do componente cariado). Kramer et al. (2013) avaliaram por 3 anos, a prevalência e o desenvolvimento de cárie em 271 crianças, de 3 a 6 anos de idade. Observaram que a prevalência de cárie aos 3 anos de idade foi de 27,3%, e a de lesões iniciais foi de 13,7%. Estes autores constataram também que as lesões de cárie inicial em esmalte foram as mais prevalentes em todas as idades. Borges et al. (2012) avaliaram a influência dos fatores socioeconômicos, a prevalência e a severidade de cárie em 1993 crianças de 4-6 anos. Observaram que a prevalência de lesões cavitadas foi de 41,2%. Quando a inclusão de lesões não cavitadas foi incluída no levantamento essa prevalência aumentou para 43,9%, com um número de 139 crianças que apresentavam somente lesões de mancha branca.

Muitos levantamentos epidemiológicos não incluem nas avaliações as lesões de cárie iniciais em esmalte, também chamadas de lesões de mancha branca. A inclusão de lesões iniciais, não cavitadas ativas e inativas, em tais levantamentos deve ser feita, pois oferece uma estimativa mais realista da prevalência de cárie (Parisotto et al., 2012; Kramer et al., 2013), ao mesmo tempo que oferece mais informação sobre possíveis mudanças na atividade e gravidade das lesões (Carvalho e Mestrinho, 2014), e permite que o atendimento odontológico preventivo seja realizado mais facilmente, ou mais precocemente (Borges et al., 2012).

As lesões de mancha branca são a primeira expressão clínica da desmineralização que ocorre na superfície do esmalte. Isto é resultante das sucessivas alterações de pH que ocorrem na interface dente-biofilme, provocadas pelo metabolismo bacteriano (Ferreira e Mendes, 2005). A perda mineral e as microporosidades são resultados desse processo. Essas microporosidades podem ser reconhecidas clinicamente pela formação de áreas brancas, opacas e rugosas, podendo progredir, para lesões cavitadas se não tratadas (Drury et al., 1999). É de extrema importância a realização do diagnóstico precoce quando a lesão está em estágio inicial em esmalte, pois pode fornecer valiosas informações para o estabelecimento de medidas preventivas, especialmente para crianças em idade pré-escolar com alta atividade de cárie (Parisotto et al., 2012).

Sendo assim, a Odontologia contemporânea tem como um dos principais objetivos, a prevenção da ocorrência da doença cárie (para aqueles indivíduos que possuem o risco), e a remineralização de lesões não cavitadas (para aqueles que possuem a doença já instalada), de forma não invasiva, por meio da remineralização do esmalte, na tentativa de paralisação da progressão da doença (Cochrane et al., 2010).

Durante o processo de remineralização, íons cálcio e fosfato são fornecidos, a partir de uma fonte externa, para a superfície de esmalte dentário, e estes promoverão o preenchimento dos espaços vazios entre os cristais de hidroxiapatita do esmalte desmineralizado (Cochrane et al., 2010).

Outro íon importante no processo de remineralização é o fluoreto, o qual promove a remineralização e inibe a dissolução dos cristais do esmalte dentário, no processo de desmineralização (Schemehorn et al., 2011). O flúor fracamente ligado pode promover ativação da remineralização utilizando íons cálcio e fosfato, usando esses íons para a suplementação de mineral. Já o flúor fortemente ligado, apresentando altas concentrações de fluorapatita nas superfícies do esmalte, pode inibir a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, quando o esmalte estiver exposto ao processo de desmineralização (Schemehorn et al., 2011), reduzindo o desenvolvimento de lesões (ten Cate e Featherstone, 1991).

Sabendo que o esmalte dentário é constituído principalmente pelos minerais fósforo e cálcio (Schemehorn et al., 2011), a presença de íons cálcio, fosfato e fluoreto biodisponíveis no fluído oral é essencial durante o processo de remineralização (Cochrane et al., 2010).

Existem materiais, como dentifrícios, géis, soluções e vernizes fluoretados que auxiliam na remineralização de lesões cariosas (Hawkins et al., 2003; Jacobsen et al., 2003; Lo et al., 2012). Dentre esses materiais, os vernizes fluoretados possuem como vantagem capacidade de aderir-se às superfícies do esmalte, o que prolonga o tempo de contato do fluoreto, melhorando a absorção desse íon para a superfície do esmalte e reduzindo o risco de ingestão de flúor (Hawkins et al., 2003). Após a aplicação profissional do verniz fluoretado, ocorre reatividade entre o flúor existente com o substrato dentário formando um reservatório de fluoreto de cálcio (CaF_2), sobre a superfície dentária, promovendo um efeito anti-cárie (ten Cate, 1997; Fernandez et al., 2014). O fluoreto de cálcio é recoberto por fosfato e proteínas, e quando ocorre o processo de desmineralização, os íons fluoreto e cálcio são liberados (ten Cate,

1997), para que, no processo de remineralização, ocorra a formação da fluorapatita (Retief et al., 1983).

A adição de fosfato de cálcio aos vernizes fluoretados objetivou o aumento da quantidade de íons Ca e P na saliva, melhorando a eficácia dos materiais odontológicos (Schemehorn et al., 2011; Cochrane et al., 2014). Essa adição poderá potencializar os efeitos terapêuticos do flúor e proporcionará remineralização de lesões de cárie iniciais e também irá ajudar na prevenção da desmineralização (Cochrane et al., 2010; Karlinsey et al., 2010; Schemehorn et al., 2011; Cochrane et al., 2014). Quando adicionado os íons cálcio e fosfato aos vernizes fluoretados, após a aplicação deste material na superfície da lesão inicial de cárie, irá ocorrer deposição de flúor sobre a lesão.

Além dos materiais já existentes comercialmente, atualmente foram desenvolvidos biomateriais (Sinhoreti et al., 2013), que promovem a remineralização de lesões e possuem em sua formulação fosfato de cálcio, com o objetivo de reparar o esmalte desmineralizado com fluorapatita ou fluorhidroxiapatita (Cochrane et al., 2010; Schemehorn et al., 2011). Este material é composto por fosfato de cálcio amorfo (ACP) estabilizado, ou formulações instáveis de cristais amorfos de fosfato de cálcio. Esses compostos podem ser associados com fosfopeptídeos de caseína (CPP) para que ocorra a estabilização e liberem íons cálcio, fosfato e flúor e assim ocorra o processo de remineralização (Cochrane et al., 2010). Essas novas tecnologias foram incorporadas a dentifrícios, agentes clareadores, materiais restauradores e a vernizes fluoretados (Cochrane et al., 2014).

Ainda, a adição de CPP-ACP na formulação de materiais odontológicos aplicados sob o esmalte dentário pode contribuir para aumentar a resistência deste substrato à desmineralização (Hamba et al., 2011) e potencializar o efeito remineralizador de lesões de cárie inicial em esmalte (Cochrane et al., 2008; Li et al., 2014) diminuindo a profundidade destas lesões e proporcionando um mecanismo anti-cárie (Pithon et al., 2014). Outro composto recentemente adicionado aos vernizes fluoretados é o Tri-Cálcio Fosfato (TCP), o qual é uma forma cristalina do fosfato de cálcio, semelhante ao fosfato de cálcio do esmalte dentário (Karlinsey et al., 2010). Esse biomaterial fornece íons Ca e P biodisponíveis para a estrutura dental, gerando remineralização mesmo quando usado em pequenas quantidades. O TCP pode melhorar significativamente a capacidade de proteção do verniz em dentes decíduos (Alamoudi et al., 2013), promovendo a redução da área da lesão sub-superficial de esmalte, implicando que a cavidade levaria mais tempo para se desenvolver ou até ser paralisada, resultando em

menor número de lesões cárias nos níveis individuais e populacionais (Manarelli et al., 2015). Estudos *in vitro*, demonstraram que a dureza de superfície do esmalte foi maior para grupos tratados com verniz de fluoreto de sódio e TCP quando comparado com grupos tratado com verniz de fluoreto de sódio (Karlinsky et al., 2012; Alamoudi et al., 2013).

Devido à etiologia multifatorial da doença cárie, sabe-se que intervenções profissionais, mesmo que minimamente invasivas são necessárias principalmente em pacientes com lesão de cárie inicial em esmalte ativas. Importante salientar que o tratamento destas lesões não se baseia somente na utilização de materiais para a prevenção da progressão das lesões, mas também na conscientização e educação dos pais e dos pacientes, implementação de medidas de higiene oral, avaliações periódicas e diminuição da exposição à sacarose. Entretanto para pacientes com alto risco à cárie, é necessária também a utilização de medidas suplementares como o uso de fluoretos (AAPD, 2011).

De acordo com o exposto a maioria dos estudos foi realizada em dentes permanentes humanos e bovinos (Cochrane et al., 2008; Karlinsky et al., 2012; Hamba et al., 2011; Schemehorn et al., 2011; Pithon et al., 2014) e sabendo que clinicamente, dentes decíduos e permanentes são diferentes anatomicamente e que a apresentação de lesões de cárie difere entre as duas dentições (Bayram et al., 2015), e apesar dos indícios de que vernizes fluoretados com formulação modificada promovam remineralização do esmalte dentário, ainda não há estudos *in vitro* sobre o efeito desses materiais em lesão de cárie inicial em esmalte, após serem submetidas ao desafio cariogênico, que simule *in vitro* um paciente que esteja em tratamento das lesões de cárie. Dessa maneira, tornou-se relevante e necessária a condução de estudos que comparem esses agentes promotores da remineralização da cárie dentária nesse substrato e nestas condições.

Dessa forma, este estudo objetivou avaliar o efeito de vernizes fluoretados com diferentes formulações no tratamento *in vitro* de lesões de cárie sub-superficiais em dentes decíduos submetidas ao desafio cariogênico. Para atingir o objetivo proposto, essa dissertação será apresentada em formato alternativo, composta de um capítulo.

2 ARTIGO – EFFECT OF FLUORIDE VARNISH APPLICATION WITH DIFFERENT FORMULATIONS ON EARLY ARTIFICIAL CARIOUS LESIONS IN PRIMARY TEETH¹

Aline Laignier Soares (ALS), Area of Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Thais Varanda (TV), Area of Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Alexandra Shizue Iwamoto (ASI), Area of Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Kamila Rosamília Kantovitz (KRK), School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas and São Leopoldo Mandic Institute and Dental Research Center, Campinas, São Paulo Brazil.

Regina Maria Puppim Rontani (RMPR), Area of Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

Fernanda Miori Pascon (FMP), Area of Pediatric Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

FLUORIDE VARNISH EFFECT ON EARLY ARTIFICIAL CARIOUS LESIONS

Key words: Tooth Remineralization, Fluoride Varnishes, Dental Caries.

Correspondence to:

Prof. Fernanda Miori Pascon

Departamento de Odontologia Infantil, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.
Av. Limeira, 901, Piracicaba, SP, Brazil. CEP 13414-903

E-mail: fmpascon@fop.unicamp.br

¹ Submetido ao periódico Caries Research (Anexo 1)

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

ABSTRACT

This study has evaluated the effect of fluoride varnish with tri-calcium phosphate (TCP) and casein phosphopeptide – amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on the treatment of early carious lesions in primary teeth submitted to cariogenic challenge. The sample consisted of 64 slabs (4x4) of primary teeth, divided into four groups (n=16): Negative Control Group - deionized water; Positive Control Group - Duraphat® - 5% NaF varnish; and, the Experimental groups - MI Varnish™ - 5% NaF varnish with Recaldent™ (CPP-ACP) and Vanish™ - 5% NaF varnish with Tri-Calcium Phosphate. Early carious lesions were produced in enamel blocks using a demineralizing solution, undersaturated with respect to hydroxyapatite, for a period of 16 h. Then, the specimens were submitted to material application according to the manufacturer's instructions and were stored in artificial saliva for 12 h. After that, the varnishes were removed and then submitted to cariogenic challenge (pH cycling) for 7 days (demineralizing solution – 2 h – and remineralizing solution – 22 h). The specimens were sectioned and analyzed by Knoop hardness test, Polarized Light Microscopy (PLM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Data from the cross-sectional microhardness has revealed significant effects of the treatment with fluoride varnishes, but a difference was found only between the fluoride varnishes and negative control ($p < 0.05$). However, there was no significant difference in percent change between groups treated with the varnishes ($p = 0.7641$). The EDS analysis has not shown differences in Ca, P and Ca/P ratios between groups ($p > 0.05$). All varnishes have shown potential to remineralize enamel surface lesions regardless of the addition of CPP-ACP or TCP.

Keywords: Tooth Remineralization, Fluoride Varnishes, Dental Caries.

INTRODUCTION

White spot lesions are the first clinical expression of demineralization and occur on enamel surface as a result of successive changes in pH that happen in the biofilm-tooth interface caused by bacterial metabolism [Ferreira and Mendes, 2005], which causes mineral loss and creates microporosity on the enamel. These microporosities can be recognized clinically by the formation of white areas that are opaque and rough, which may progress to spot lesions if untreated [Drury et al., 1999]. The early diagnosis is very important as, when the lesion is at an early stage in the enamel, it can provide valuable information for the establishment of preventive measures, especially for preschool children with high caries activity [Parisotto et al., 2012].

There are many dental materials, such as toothpastes, gels, solutions and fluoride varnishes that aid in the remineralization of carious lesions [Hawkins et al., 2003; Jacobsen et al., 2003; Lo et al., 2012]. Among these materials, fluoride varnishes are safe, easy and suitable for use in young children every 6 months [Menarpour et al., 2015]. They have the advantageous ability of adhering to enamel surfaces, which prolong the contact time of the fluoride, thus improving the absorption of these ions into the enamel surface and reducing the risk of ingestion of the fluoride [Hawkins et al., 2003]. Enamel remineralization produces mineral gain and is defined as the process in which calcium and phosphate ions are supplied from an external source to the tooth to promote ion deposition into crystal voids in demineralized enamel [Cochrane et al., 2010]. In addition, fluoride ions can drive the fluorapatite or fluorhydroxyapatite formation on the subsurface of carious lesions if adequate salivary or plaque calcium and phosphate ions are available when the fluoride is applied [Cochrane et al., 2010]. Reactivity occurs between the existing fluoride and tooth substrate to form a calcium fluoride reservoir (CaF_2) on the tooth surface, thus promoting an anticaries effect [ten Cate, 1997; Fernandez et al., 2014]. Calcium fluoride is covered by phosphate and protein, and when the demineralization process occurs, fluoride and calcium ions are released [ten Cate, 1997], so that the formation of fluorapatite occurs in the de- / remineralization process [Retief et al., 1983].

Currently, many novel calcium-phosphate-based remineralization delivery systems have been developed for clinical application [Cochrane et al., 2010]. The CPP-ACP is composed of Casein Phosphopeptide (CPP), which is a product derived from milk and amorphous calcium phosphate (ACP) [Reynolds, 1997]. The addition of CPP-ACP in the formulation of dental materials to be applied in the enamel can increase the resistance of this substrate to demineralization [Hamba et al., 2011] and enhance the remineralizing effect of early artificial carious lesions [Cochrane et al., 2008; Li et al., 2014]. Another compound

currently added to the fluoride varnish is the tri-calcium phosphate (TCP), which is a crystalline form of calcium phosphate similar to that of tooth enamel [Karlinsky et al., 2010]. It provides bioavailable calcium and phosphate ions to the dental structure, which generates remineralization even when used in small amounts [Alamoudi et al., 2013]. Further reduction of the area of the enamel subsurface lesions would consequently result in the cavity taking more time to develop, or being even paralyzed, thus resulting in fewer carious lesions in the individual and population levels [Manarelli et al., 2015].

Most of the studies have been conducted in bovine [Hamba et al., 2011; Schemehorn et al., 2011; Pithon et al., 2014] and human permanent teeth [Cochrane et al., 2008; Karlinsky et al., 2012]. However, the primary enamel is different of the permanent one; carious lesion progress faster in primary teeth than in permanent teeth [Wang et al., 2006; Bayram et al., 2015]. Despite the anticariogenic potential of fluoride varnishes that has been documented [Marinho et al., 2013] and the evidence that fluoride varnishes with modified formulation promotes remineralization of tooth enamel, there is no in vitro studies that have verified the effect of these materials in early carious lesions of primary teeth after being subjected to cariogenic challenge. The pH cycling is widely used with the purpose of investigating the changes in oral cavity and the chemical reactions that occur in the enamel, which lead to dental caries [ten Cate, 2015]. Thus, the aim of this study was to evaluate the in vitro effect of fluoride varnish with different formulations in the treatment of early carious lesions in primary teeth submitted to cariogenic challenge. The first tested hypothesis was that fluoride varnishes could improve remineralization in early carious lesions after pH cycling and the second one was that there would be significant differences in the remineralization of early carious lesions by the different varnishes

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ethical considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba – University of Campinas (Protocol No. 121/ 2014).

2.2. Experimental design

This was an in vitro study and the experimental units were enamel slabs (4x4) obtained from sound human primary teeth (incisor and molar). The power of the sample was calculated using previous data of a pilot study and the power analysis software BioEstat 5.3 (Pará, Brazil). The minimum required sample, with alpha of 0.05 and power of 0.80, was sixteen samples in each group. The slabs were submitted to carious lesion formation for 16 hours. Then, the slabs

were randomized into four treatment groups (n=16): no treatment (negative control), Duraphat (5% NaF varnish - positive control), MI Varnish™ (CCP-ACP) and Vanish™ (TCP). After treatment, the slabs were subjected to pH cycling for eight days. The variables of response were: mineral loss, evaluated by cross-sectional microhardness (ΔS), carious lesion depth, evaluated by Polarized Light Microscopy (μm), and the content (%) of calcium (Ca), phosphorus (P) and Ca/P, analyzed by Energy-dispersive X-ray spectroscopy.

2.3. Sample Preparation

Sixty-four crowns of extracted sound human primary incisors and molars were selected. The teeth were carefully cleaned and washed in running water to remove adhered soft tissue. Then, they were stored in a 0.1% thymol solution [Tagliaferro et al., 2007]. The teeth were visually assessed with the aid of a stereoscopic lens at 20x magnification (Leica MZ6, Leica, Wetzlar, Germany). Only those without enamel defects caused by tooth extraction and/or deformities on the enamel formation or without the presence of decay were selected. The teeth were sectioned at the cemento-enamel junction with a precision sectioning cutter (ISOMET 1000, Buehler, Lake Bluff, USA), separating the crown from the root, which was discarded.

Blocks of 4x4 mm were obtained by vertically cutting the molar crowns (parallel to the tooth axis), on the buccal and lingual sides, to produce two enamel discs [Wang et al., 2006], and the incisors were cut on the buccal side. No polishing was performed on the enamel surface to keep its natural feature [Masson et al., 2012]. The enamel block surfaces were isolated by being double coated with acid-resistant nail varnish (nail polish, RISQUÉ®, São Paulo, Brazil). In order to maintain the sound reference surfaces, two layers of acid-resistant nail varnish (nail polish, RISQUÉ®, São Paulo, Brazil) were applied carefully on 1x4 mm of the surface of each block, on the left sides. After drying, the enamel surface area of 12 mm² was exposed to the formation of artificial subsurface lesions.

2.4. Formation of artificial early carious lesions

Early artificial carious lesions were produced by immersing each enamel block in a solution containing 0.05 M sodium acetate (NaAc) buffer that was 50% saturated with enamel powder, pH 5.0, for 16 h at 37°C, in a proportion of 2 ml/mm². To prepare this solution, enamel powder of the primary teeth (particles from 74–105 μm) was agitated in 0.05 sodium acetate buffer, pH 5.0, for 96 h at 37°C (0.50 g/l) [Paes-Leme et al., 2003; Kantovitz et al., 2013]. In order to maintain the surface reference for lesion depth determination, two layers of nail varnish were applied on 1x4 mm of the surface of each block, on the right side, leaving only the lesion surface exposed for the treatment.

2.5. Treatment

After preparation, the specimens were randomly assigned to four experimental groups (n=16): no treatment (negative control), Duraphat® (5% NaF varnish - positive control), MI Varnish™ (CCP-ACP) and Vanish™ (TCP) (Table 1). The varnishes were applied once in a thin layer using a microbrush. After that, the specimens were immersed in artificial saliva (1.5 mM calcium, 0.9 mM phosphate, 150 mM KCl in 0.1 M Tris buffer and 0.05 ug F/ml, pH=7) for 12 h [Fernandez et al., 2014]. After this period, the varnishes were carefully removed from the surface and the slabs were cleaned with acetone-soaked cotton swab for 30 s to ensure complete removal of the varnishes [Fernandez et al., 2014]. The complete removal of the varnishes was verified with the aid of a stereoscopic lens at 20x magnification (Leica MZ6, Leica, Mannheim, Germany).

Table 1. Materials, composition, manufactory and batch number of fluoride varnishes studied

Material	Composition	Manufactory	Batch Number
Duraphat®	30–60% colophonium, 10–30% ethanol, 5% sodium fluoride, white wax, shellac, mastic saccharin, raspberry essence (containing Ethyl butyrate, geraniol, resinoid iris, isoamyl acetate, essence of jasmine, vanilla and propylene glycol).	COLGATE®	10.12-02
MI Varnish™	30–50% polyvinyl acetate, 10–30% hydrogenated rosin, 20–30% ethanol, 1–8% sodium fluoride, 1–5% CPP-ACP, 1–5% silicone dioxide.	GC CORPORATION	1407231
Vanish™	30–75% pentaerythritol glycerol ester of colophony resin, 10–15% n-hexane, 1–15% ethyl alcohol, 1–5% sodium fluoride, 1–5% flavour enhancer, 1–5% thickener, 1–5% food grade flavour, <5% modified tricalcium phosphate (TCP).	3M ESPE	N586421

2.6. The pH-cycling model

The pH-cycling model used in this study was previously reported by Zancopé et al. [2014]. In summary, each block was kept in a demineralizing solution (6.25 mL/mm² of exposed enamel) containing 1.28 mmol/L calcium and 2.0 mmol/L phosphate in 74 mmol/L acetate buffer pH=5, for 2 h. After that, each block was placed in remineralizing solution (3.12 mL/mm² of exposed enamel) containing 1.5 mmol/L calcium, 0.9 mmol/L phosphate and 150 mmol/L KCl in 20 mmol/L cacodylic buffer pH=7, for 22 h each day. The solutions were changed on the 4th day of pH cycling. The slabs were washed with deionized water for 10 s and dried with tissue paper, between the demineralizing and remineralizing stages and at the end of the pH cycling. This process was performed for seven days.

2.7. Section and preparation of specimens

After pH cycling, each block was longitudinally sectioned twice through the border of the exposed enamel, resulting in three cut sections averaging 1 mm each. One cut section of each block was embedded in acrylic resin (VIPCril Plus- VIPI, Pirassununga, Brazil) and serially flattened and polished with 420, 600 and 1200 grade silicon carbide paper, followed by 6, 3 and 1 µm abrasive diamond slurry (Buehler, Lake Bluff, USA) for cross-sectional microhardness analysis. The other cut sections of each block were mounted on aluminum stubs for EDS analysis. For PLM analysis, one cut section of each block was carefully and serially flattened and polished with 420, 600 and 1200 grade silicon carbide paper until reaching thickness of ~ 100 µm, followed by 3 µm abrasive diamond slurry (Buehler Ltd. Lake Bluff, Illinois, USA).

2.8. Cross-sectional microhardness testing

The cross-sectional microhardness was conducted using a Knoop diamond (Future-Tech Corp, Tokyo, Japan) under a 25 g load for 5 s. Three rows of twelve indentations each were made, one in the central region of the block and the other two 100 µm below and above it. Their depths were of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, and 180 µm from the enamel surface. For each distance, the average values were calculated between all measurement points, and then the average was expressed as Knoop hardness number (kg/mm²), since there is a discrepancy in the literature regarding the conversion of hardness to mineral concentration [Featherstone et al., 1983; Kielbassa et al., 1999]. The area of hardness loss was calculated by numerical integration using a trapezoidal rule, which is the difference between the area under the curve (kg/mm²) of the sound enamel and the area of the demineralized enamel. The hardness variation values (ΔS) were calculated for all groups [Ana et al., 2012].

2.9. Polarized light microscopy

After pH cycling, one third of each specimen was examined by a polarized light microscope using Red I filter (10x magnification), coupled to a high-resolution digital camera (DFC 280; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), using the image analysis software LAS (Leica Microsystems) to evaluate quantitatively the depth of the lesions in the enamel sections. The measurement was performed at three different points in the center of each specimen. To quantify the depth of the carious lesions, a tool was used to measure the linear distance determined by the software. For this end, three measures were performed in the center of the lesion, in triplicate, and mean values were obtained. Both the carious and the treated sections and the mean values were considered for statistical analysis.

2.10. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)

For EDS analysis, the specimens were mounted on aluminum stubs and sputter-coated with carbon (Denton Vacuum, Moorestown, USA). Surface morphology was examined with Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL, JSM – 5600 LV, Scanning Electron Microscope, Tokyo, Japan), at 200x magnification, to determine the content of Ca and P of the early artificial carious lesions. They were identified and quantified by the software Easy Macro (VANTAGE – digital microanalysis system) available in the SEM. For this end, the measurements were performed in three different areas in the carious part and treated part, both being in the surface area. Within each of these areas, three spectra were performed on two different areas (1.5 x 1.5 mm), amounting to six spectra. The specimens were subjected to the analysis of the content of calcium (Ca) (wt% Ca), phosphorus (P) (wt% P) and the Ca / P ratio was also measured. The results were expressed as a percentage.

2.11. Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was applied to verify the normality of the data. The cross-sectional microhardness data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test. For comparison of the pre- and post-treatment data obtained by PLM, the paired t-test was used. For comparison among groups, PLM and EDS data presented different variances and the Kruskal-Wallis test was applied. The intra-examination reliability was determined using Pearson's correlation coefficient and 20% of the sample was examined twice by the same examiner under the same conditions using the same equipment and the results had good reliability.

($r=0.9321$). The power analysis software BioEstat 5.3 (Pará, Brazil) was used in the analyses, with significance level set at 5%.

RESULTS

Data from the cross-sectional microhardness revealed significant effects for the treatment with fluoride varnishes ($p<0.05$). No significant differences in the ΔS values were observed between the three fluoride varnishes (Duraphat[®], MI Varnish[™] and Varnish[™]) ($p=0.98$), but a difference was found between the fluoride varnishes and negative control ($p<0.05$) (Table 2).

The results of lesion depth showed significant differences among all fluoride varnishes and negative control ($p<0.05$) but no significant difference among fluoride varnishes ($p=0.07$). After pH cycling, the lesion depth of the negative control group was significantly greater than that found for the pre-treatment ($p<0.0001$). In the same way, all fluoride varnishes presented significantly different lesion depths when compared to pre-treatment values ($p=0.004$) (Table 2) (Figure 1).

Table 2. Mean and standard deviation of lesion depth (μm) considering groups and pre, post-treatment analyzed by Polarized light microscopy and area of hardness loss (ΔS - Kg/mm^2).

Groups	Lesion Depth (μm)		ΔS (Kg/mm^2)
	Pre-treatment	Post-treatment	
Negative Control	60.5 (± 26.1) ^{bA}	95.8 (± 22.1) ^{aA}	6757.8 (± 2274.7)
Duraphat [®]	73.5 (± 35.3) ^{aA}	34.8 (± 11.5) ^{bB}	4098.4 (± 1407.9) [*]
MI Varnish [™]	80.1 (± 34.8) ^{aA}	38.3 (± 12.0) ^{bB}	4164.0 (± 1407.9) [*]
Vanish [™]	83.2 (± 34.8) ^{aA}	51.4 (± 26.6) ^{bB}	4183.2 (± 1527.2) [*]

Different uppercase (in column) means significant difference between groups by Kruskal-Wallis ($p<0.05$)

Different lowercase (in line) means significant difference between pre and post treatment by paired-t test ($p<0.0001$)

* Means significant difference between groups by Tukey tests ($p<0.05$)

Concerning the EDS analysis, no significant differences were observed in the content of Ca, P and Ca/P ratio between groups ($p>0.05$) (Table 3). No significant differences were found among sound enamel, pre-treatment and post-treatment ($p=0.27$).

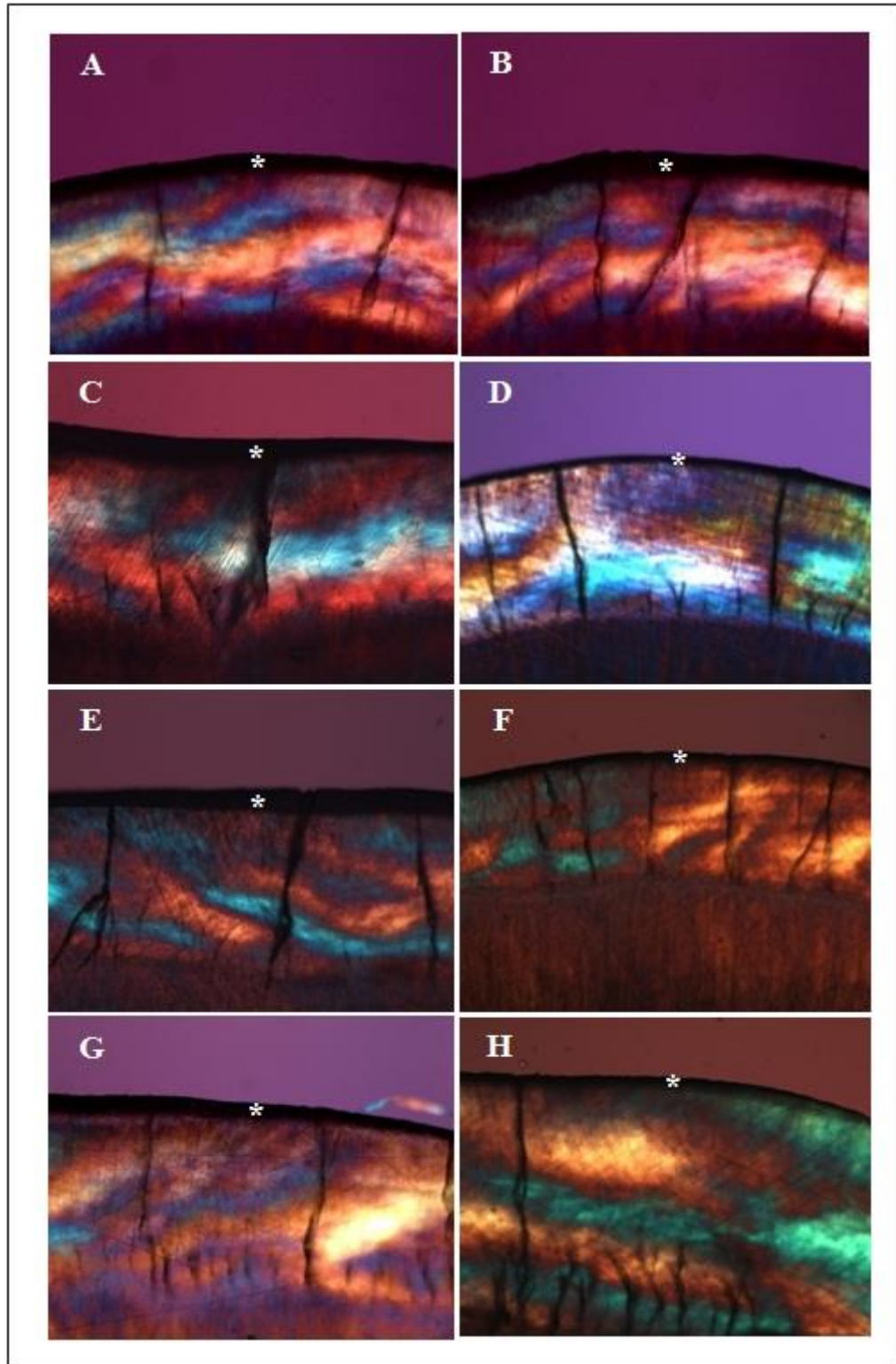


Fig 1. Polarized light photomicrograph at 10x magnification of lesion pre-treatment (A, C, E and G) and post-treatment after 7 days pH-cycling: deionized water (B), Duraphat[®] (D), MI Varnish[™] (F) and Vanish[™] (H). * represents the image of the early caries lesions in enamel observed in Polarized Light Microscopy.

Table 3. Mean and standard deviation for Calcium (Ca), Phosphorous (P) and Ca/P data obtained by Energy-dispersive X-ray spectroscopy.

GROUPS	Ca			P			Ca/P		
	Sound	Pre Treatment	Post Treatment	Sound	Pre Treatment	Post Treatment	Sound	Pre Treatment	Post Treatment
Control	70.1±1.3	65.2±8.2	70.0±1.0	28.1±0.9	26.6±2.6	28.8±1.0	2.4±0.1	2.4±0.2	2.4±0.1
Duraphat®	70.1±1.1	69.9±1.0	70.2±1.1	28.5±1.1	28.7±0.9	28.8±1.2	2.4±0.1	2.4±0.1	2.4±0.1
MI Varnish™	70.7±2.5	69.9±1.6	70.4±1.1	27.6±2.0	27.7±1.3	28.5±1.0	2.5±0.1	2.4±0.1	2.5±0.1
Varnish™	69.3±2.5	71.6±4.4	69.6±0.7	29.5±2.7	26.3±2.6	28.9±0.5	2.3±0.1	2.7±0.1	2.4±0.1

p>0.05, Kruskal-Wallis test.

DISCUSSION

The present in vitro study intended to evaluate the effects of fluoride varnishes on early carious lesion after remineralization using fluoride varnishes with different formulations in primary teeth. The present findings show that fluoride varnishes (Duraphat[®], MI Varnish[™] and Vanish[™]) present significantly further remineralization of carious lesions in primary enamel lesion when compared with negative control, thus confirming the first hypothesis. However, despite the different formulations (NaF, NaF + CPP-ACP and NaF + TCP), no significant differences have been observed between the varnishes. Therefore, the second hypothesis was rejected.

The specimens treated with every fluoride varnish showed remineralization of the lesion even after the completion of the pH cycling. This could have occurred because, after the application of fluoride varnish, there was reactivity between the existing fluoride in the dental substrate, thus forming a calcium fluoride reservoir (CaF₂) on the tooth surface and promoting an anti-caries effect [ten Cate, 1997; Fernandez et al., 2014]. Calcium fluoride is covered by phosphate and protein and, when the demineralization process occurs, fluoride and calcium ions are released [ten Cate, 1997], so that, in the remineralization process, fluoride has the ability of improving the crystalline structure, generating fluorapatite and accelerating remineralization [Kumar et al., 2008]. In the pH-cycling model used in this study, aimed at remineralization, the blocks were immersed for 2 h in the demineralizing solution with pH 5, per cycle.

Despite the great reduction in lesion depth after treatments with Duraphat[®], MI Varnish[™] and Vanish[™] (reduction of 41.8%, 38.8% and 36.3%, respectively), no differences between the experimental and positive control groups (Duraphat[®]) were observed by the cross-sectional microhardness and PLM analyses. Probably, the efficacy of the varnish was due to the effect of the fluoride, as all fluoride varnishes have in common the presence of NaF. The same result has been found when the treatment of early carious lesions was assessed with Duraphat[®] fluoride varnish with TCP and fluoride varnish with ACP after seven days of pH cycling using only PLM [Rirattapong^a et al., 2014]. Unlike this study, in which lesion remineralization occurred, in their study the progression of lesions in primary teeth was inhibited. This has likely happened because they have used a different pH-cycling model, being it a more aggressive model, with 6 hours of immersion in the demineralizing solution per cycle. Fluoride is not the sole agent used for remineralization; calcium and phosphate can enhance fluoride uptake [Rirattanapong et al, 2015]. Fluoride varnishes with TCP inhibit the progression of early primary enamel lesions (Rirattanapong^a et al., 2014). The CPP-ACP consists of multiphosphorylated peptides that stabilize calcium and phosphate ions in solution form and

are localized to tooth surfaces during acidogenic challenges, and the CPP provides a reservoir of bioavailable calcium and phosphate in the saliva and on the surface of the tooth [Shen et al., 2015]. During oral acidic challenges, ACP is released from the CPP complex, and the CPP bound to ACP would buffer the pH of the plaque and, in doing so, would dissociate to calcium and phosphate ions [Shen et al., 2015].

Recently, a study by Shen et al. [2015] has examined the effect of fluoride varnishes with calcium phosphate (Duraphat[®], MI Varnish[™] - CPP-ACP, Clinpro White varnish - TCP) on enamel demineralization using transverse microradiography. All tested fluoride varnishes have inhibited enamel demineralization when compared with negative control, similar to the results of this study. Unlike this study, the study above was carried out in permanent teeth and did not perform pH cycling.

The in vitro studies are models commonly used in the remineralization of early carious lesion [Karlinsky et al., 2011; Rirattanapong^a et al., 2014; Memarpour et al., 2015; Peric et al., 2015; Rirattanapong et al., 2015; Shen et al., 2015]. The major advantage of in vitro models is the ability to carry out single variable experiments under highly controlled conditions [White, 1995]. In this study, slabs were prepared with three different areas (sound enamel, pre-treatment and post-treatment). The advantage of this division is that lesion depth can be determined at baseline, therefore minimizing variations in the initial lesion depth among specimens [Rirattanapong^a et al., 2014]. This result could be observed in the pre-treatment groups after PLM analysis.

In addition to what was presented above, the results obtained by the PLM analysis showed no significant differences among the fluoride varnish groups, but the negative control group had significant differences in relation to the fluoride varnish groups ($p < 0.05$). The negative control group had increased percentage of lesion depth, and the groups treated with fluoride varnishes had decreased lesion depth ($p = 0.004$). This shows that there was remineralization of the lesions when fluoride varnishes were used. On the other hand, Rirattanapong^b et al. [2014] evaluated the in vitro effect of deionized water, Duraphat[®] and fluoride varnish with TCP on early enamel lesions in primary teeth after using a 7-day pH-cycling model by PLM. The fluoride varnish containing TCP and Duraphat[®] that inhibited the progression of enamel lesions were not significantly different from each other, but there was no remineralization of lesions, as the pH-cycling model was more aggressive, as the specimen was immersed for 6 h in the demineralizing solution per cycle. The results of this study agree with Santos et al. [2009], who, although using a 14-day pH-cycling model, found that Duraphat[®] reduced lesion depth compared to the control group in primary teeth.

In this study, three methodologies were used to evaluate the effects of different varnishes: cross sectional microhardness, PLM and EDS. Cross-sectional hardness gives information regarding the mechanical (physical strength) properties of the carious lesions since it gives important evidence regarding the mechanical resilience of the demineralized enamel, in depth [Magalhães et al., 2009]. Moreover, this analysis is adequate and sensitive to evaluate indirectly mineral loss and the natural or artificial progression of carious lesions and there is a correlation between the volume percent of mineral present and the hardness of human demineralized and remineralized enamel [White, 1992]. The hardness measurement of lesions is an important measurement tool for remineralization studies [White and Featherstone, 1987]. In association with cross-sectional microhardness, the PLM analysis can give an accurate measurement of the lesion depth [Lo et al, 2010]. Regarding the EDS analysis, no statistically significant difference could be observed in the amount of Ca, P and Ca/P ratio between groups. The EDS is a semi-quantitative analytical method and exhibits certain limitations, especially in the analysis of elements present at relatively low concentrations [Peric et al., 2015]. This method cannot accurately detect low levels of chemical elements. In this study, fluorine ions were not detected. Therefore, it can be assumed that it was not possible to detect fluorine ions although they might have been present at the surface of the enamel. Peric et al. [2015] have evaluated the potential of toothpastes containing CPP-ACP in the remineralization of enamel lesions and have also reported no differences between groups treated with toothpastes containing CPP-ACP in the EDS analysis.

One of the limitations of this study was that the *in vitro* conditions did not reproduce the *in vivo* conditions. In addition, *in vitro* models have significant limitations related to their inability to simulate the complex biological processes involved in dental caries [White, 1995]. Although it is not possible to simulate the biological aspects of caries, laboratory models are still of great importance for caries research [Peric et al., 2015].

Based on the conditions of this *in vitro* study, it can be concluded that all fluoride varnishes containing sodium fluoride (NaF) were effective in promoting remineralization in early carious lesions in primary teeth, regardless of the combination of CPP-ACP and TCP.

Acknowledgements

The authors would like to thank Espaço da Escrita/ General Coordination UNICAMP

REFERENCES

- Alamoudi SA, Pani SC, Alomari M: The effect of the addition of tricalcium phosphate to 5% sodium fluoride varnishes on the microhardness of enamel of primary teeth. *Int J Dent* DOI: 10.1155/2013/486358.
- Ana PA, Tabchoury CP, Cury JA, Zezell DM: Effect of Er,Cr:YSGG laser and professional fluoride application on enamel demineralization and on fluoride retention. *Caries Res* 2012;46:441-451.
- Bayram M, Deeley K, Reis MF, Trombetta VM, Ruff TD, Sencak RC, Hummel M, Dizak PM, Washam K, Romanos HF, Lips A, Alves G, Costa MC, Granjeiro JM, Antunes LS, Küchler EC, Seymen F, Vieira AR: Genetic influences on dental enamel that impact caries differ between the primary and permanent dentitions. *Eur J Oral Sci* DOI: 10.1111/eos.12204.
- Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC: Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008;42:88-97.
- Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC: New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res* 2010;89:1187-1197.
- Drury TF, Horowitz AM, Ismail AI, Maertens MP, Rozier RG, Selwitz RH: Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. *J Public Health Dent* 1999; 59: 192-197.
- Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res* 1983; 17: 385–391.
- Fernández CE, Tenuta LM, Zárate P, Cury JA: Insoluble NaF in Duraphat® may prolong fluoride reactivity of varnish retained on dental surfaces. *Braz Dent J* 2014;25:160-164.
- Ferreira MA, Mendes NS : Factors associated with active white enamel lesions. *Int J Paediatr Dent* 2005;15:327-334.
- Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J: Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assessment using micro-computed tomography. *J Dent* 2011;39:405-413.
- Hawkins R, Locker D, Noble J, Kay EJ: Prevention. Part 7: professionally applied topical fluorides for caries prevention. *Br Dent J* 2003;195:313-317.

- Jacobsen P, Young D: The use of topical fluoride to prevent or reverse dental caries. *Spec Care Dentist* 2003;23:177-179.
- Kantovitz KR, Pascon FM, Nociti FH Jr, Tabchoury CP, Puppin-Rontani RM: Inhibition of enamel mineral loss by fissure sealant: an *in situ* study. *J Dent* 2013;41:42-50.
- Karlinsey RL, Mackey AC, Stookey GK: In vitro remineralization efficacy of NaF systems containing unique forms of calcium. *Am J Dent* 2009; 22: 185-188.
- Karlinsey RL, Mackey AC, Walker ER, Frederick KE: Surfactant-modified beta-TCP: structure, properties, and in vitro remineralization of subsurface enamel lesions. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21: 2009-2020.
- Karlinsey RL, Mackey AC, Walker TJ, Frederick KE, Blanken DD, Flaig SM, Walker ER: In vitro remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: A pilot study. *J Dent Oral Hyg* 2011;3:22-29.
- Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E: Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 243–251.
- Kumar VL, Itthagarun A, King NM: The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Aust Dent J* 2008; 53:34-40.
- Li J, Xie X, Wang Y, Yin W, Antoun JS, Farella M, Mei L: Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *J Dent* 2014;42:769-777.
- Lo EC, Tenuta LM, Fox CH: Use of professionally administered topical fluorides in Asia. *Adv Dent Res* 2012;24:11-15.
- Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA: Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res* 2009;43: 474-483.
- Manarelli MM, Delbem AC, Binhardi TD, Pessan JP: In situ remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Clin Oral Investig* 2015;19:2141-2146.
- Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE: Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* DOI: 10.1002/14651858.

- Masson N, Domingues RR, Cury JA, Paes Leme AF: Acidulated phosphate fluoride application changes the protein composition of human acquired enamel pellicle. *Caries Res* 2013;47:251-258.
- Memarpour M, Soltanimehr E, Sattarahmady N: Efficacy of calcium- and fluoride-containing materials for the remineralization of primary teeth with early enamel lesion. *Microsc Res Tech* 2015; 78: 801-806.
- Paes Leme AF, Tabchoury CP, Zero DT, Cury JA: Effect of fluoridated toothpaste and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent* 2003; 16: 91–95.
- Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, De Souza-E-Silva CM, Peres RC, Rodrigues LK, Nobre-Dos-Santos M: Assessment of cavitated and active non-cavitated caries lesions 3- to 4-year-old preschool children: a field study. *Int J Paediatr Dent* 2012;22: 92-99.
- Peric TO, Markovic DL, Radojevic VJ, Heinemann RM, Petrovic BB, Lamovec JS: Influence of pastes containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on surface of demineralized enamel. *J Appl Biomater Funct Mater* 2014; 12: 234-239.
- Pithon MM, Dos Santos MJ, Andrade CS, Leão Filho JC, Braz AK, de Araujo RE, Tanaka OM, Fidalgo TK, Dos Santos AM, Maia LC: Effectiveness of varnish with CPP-ACP in prevention of caries lesions around orthodontic brackets: an OCT evaluation. *Eur J Orthod* DOI:10.1093/ejo/cju031.
- Retief DH, Bradley EL, Holbrook M, Switzer P: Enamel fluoride uptake, distribution and retention from topical fluoride agents. *Caries Res* 1983;17: 44-51.
- Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* 1997;76:1587-1595.
- Rirattanapong^a P, Vongsavan K, Saengsiravin C, Pornmahala T: Effect of fluoride varnishes containing tri-calcium phosphate sources on remineralization of initial primary enamel lesions. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2014; 45:499-504.
- Rirattanapong^b P, Vongsavan K, Saengsiravin C, Pornmahala T: Effect of fluoride varnishes containing different calcium phosphate sources on mineralization of initial primary enamel lesions. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2014; 45:1503-10.
- Rirattanapong P, Vongsavan K, Saengsiravin C, Phuekcharoen P: Efficacy of fluoride mouthrinse containing tricalcium phosphate on primary enamel lesions: a polarized light microscopic study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2015;46:168-74.

- Santos L de M, Reis JI, Medeiros MP, Ramos SM, Araújo JM: In vitro evaluation of fluoride products in the development of carious lesions in deciduous teeth. *Braz Oral Res* 2009; 23: 296-301.
- Schemehorn BR, Wood GD, McHale W, Winston AE: Comparison of fluoride uptake into tooth enamel from two fluoride varnishes containing different calcium phosphate sources. *J Clin Dent* 2011;22: 51-54.
- Shen P, Bagheri R, Walker GD, Yuan Y, Stanton DP, Reynolds C, Reynolds EC: Effect of calcium phosphate addition to fluoride containing dental varnishes on enamel demineralization. *Aust Dent J* DOI: 10.1111/adj.12385.
- 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;41:74-76.
- ten Cate JM: Models and role models. *Caries Res* 2015; 49: 3-10.
- ten Cate JM: Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci* 1997; 105:461-465.
- Wang LJ, Tang R, Bonstein T, Bush P, Nancollas GH: Enamel demineralization in primary and permanent teeth. *J Dent Res* 2006;85:359-363.
- White DJ, Featherstone JD: A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. *Caries Res* 1987; 21:502-12.
- White DJ: The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res* 1995; 9: 175-193.
- White DJ: The comparative sensitivity of intra-oral, in vitro, and animal models in the 'profile' evaluation of topical fluorides. *J Dent Res* 1992; 71:884-894.
- Zancopé, BR, Cesar, MMC, Rodrigues, KA, Nobre-dos-Santos, M: Evaluation of the effect of a CO2 laser and fluoride on the reduction of carious lesions progression in primary teeth. An *in vitro* study. *Lasers in Dentistry* XX DOI: 10.1117/12.2037284.

3 CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos e com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os vernizes fluoretados modificados ou não se mostraram efetivos em reduzir a perda mineral de lesões iniciais de cárie em esmalte de dentes decíduos;

- Os vernizes fluoretados, apenas com fluoreto de sódio ou com CPP-ACP e de TCP foram eficazes em promover a remineralização em lesão inicial de cárie em esmalte em dentes decíduos.

REFERÊNCIAS[†]

American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD). Guideline on caries-risk assessment and management for infants, children, and adolescents. Reference manual. 2011; 33:111-7.

Bayram M, Deeley K, Reis MF, Trombetta VM, Ruff TD, Sencak RC, et al. Genetic influences on dental enamel that impact caries differ between the primary and permanent dentitions. *Eur J Oral Sci.* 2015 DOI: 10.1111/eos.12204.

Borges HC, Garbín CA, Saliba O, Saliba NA, Moimaz SA. Socio-behavioral factors influence prevalence and severity of dental caries in children with primary dentition. *Braz Oral Res.* 2012;26(6):564-70.

Carvalho JC, Mestrinho HD. Diagnosing non-cavitated lesions in epidemiological studies: practical and scientific considerations. *Braz Oral Res.* 2014;28 (1) :1-7.

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

Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilised solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res.* 2008;42(2):88-97.

Cochrane NJ, Shen P, Yuan Y, Reynolds EC. Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. *Aust Dent J.* 2014;59(1):100-5.

Drury TF, Horowitz AM, Ismail AI, Maertens MP, Rozier RG, Selwitz RH. Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. *J Public Health Dent.* 1999;59(3):192-7.

Ferreira MA, Mendes NS. Factors associated with active white enamel lesions. *Int J Paediatr Dent.* 2005;15(5):327-34.

Hamba H, Nikaido T, Inoue G, Sadr A, Tagami J. Effects of CPP-ACP with sodium fluoride on inhibition of bovine enamel demineralization: a quantitative assessment using micro-computed tomography. *J Dent.* 2011;39(6):405-13.

[†] De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Hawkins R, Locker D, Noble J, Kay EJ. Prevention. Part 7: professionally applied topical fluorides for caries prevention. *Br Dent J.* 2003;195 (6):313-7

Jacobsen P, Young D. The use of topical fluoride to prevent or reverse dental caries. *Spec Care Dentist.* 2003;23(5):177-9.

Karlinsey RL, Mackey AC, Schwandt CS. Effects on dentin treated with eluted multi-mineral varnish in vitro. *Open Dent J.* 2012;6:157-63.

Karlinsey RL, Mackey AC, Walker ER, Frederick KE. Surfactant-modified beta-TCP: structure, properties, and in vitro remineralization of subsurface enamel lesions. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(7):2009-20.

Kramer AC, Skeie MS, Skaare AB, Espelid I, Ostberg AL. Caries increment in primary teeth from 3 to 6 years of age: a longitudinal study in Swedish children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2014;15(3):167-73.

Li J, Xie X, Wang Y, Yin W, Antoun JS, Farella M, Mei L. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *J Dent.* 2014;42(7):769-777.

Lo EC, Tenuta LM, Fox CH. Use of professionally administered topical fluorides in Asia. *Adv Dent Res.* 2012;24(1):11-5.

Manarelli MM, Delbem AC, Binhardi TD, Pessan JP. In situ remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):2141-6.

Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, De Souza-E-Silva CM, Peres RC, Rodrigues LK, Nobre-Dos-Santos M. Assessment of cavitated and active non-cavitated caries lesions 3- to 4-year-old preschool children: a field study. *Int J Paediatr Dent.* 2012;22(2):92-9.

Pithon MM, Dos Santos MJ, Andrade CS, Leão Filho JC, Braz AK, de Araujo RE, et al. Effectiveness of varnish with CPP-ACP in prevention of caries lesions around orthodontic brackets: an OCT evaluation. *Eur J Orthod.* 2014;4. DOI:10.1093/ejo/cju031.

Retief DH, Bradley EL, Holbrook M, Switzer P. Enamel fluoride uptake, distribution and retention from topical fluoride agents. *Caries Res.* 1983;17: 44-51.

Schemehorn BR, Wood GD, McHale W, Winston AE. Comparison of fluoride uptake into tooth enamel from two fluoride varnishes containing different calcium phosphate sources. *J Clin Dent*. 2011;22(2):51-4.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007 6;369(9555):51-9.

Sinhoreti, M. A. C., Vitti, R. P., Correr-Sobrinho, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2013;67(3):178-86.

ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:461-465.

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

ANEXOS

ANEXO 1 - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Efeito de vernizes fluoretados com diferentes formulações no tratamento in vitro de lesões de cárie sub-superficiais em dentes decíduos submetidas ao desafio cariogênico"**, protocolo nº 121/2014, dos pesquisadores Fernanda Miori Pascon, Aline Laignier Soares, Kamila Rosamília Kantovitz e Regina Maria Puppín Rontani, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 27/02/2015.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project **"Effect of fluoride varnish with different formulations in vitro treatment of caries in subsurface deciduous teeth submitted to cariogenic challenge"**, register number 121/2014, of Fernanda Miori Pascon, Aline Laignier Soares, Kamila Rosamília Kantovitz and Regina Maria Puppín Rontani, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Feb 27, 2015.

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2 - Declaração**Declaração**

As cópias dos documentos de minha autoria ou de minha coautoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado intitulada **“EFEITO DA APLICAÇÃO DE VERNIZES FLUORETADOS COM DIFERENTES FORMULAÇÕES NAS LESÕES INICIAIS DE CÁRIE ARTIFICIAIS EM DENTES DECÍDUOS”** não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba, 10/03/2016



Aline Laignier Soares

RG: 15664488

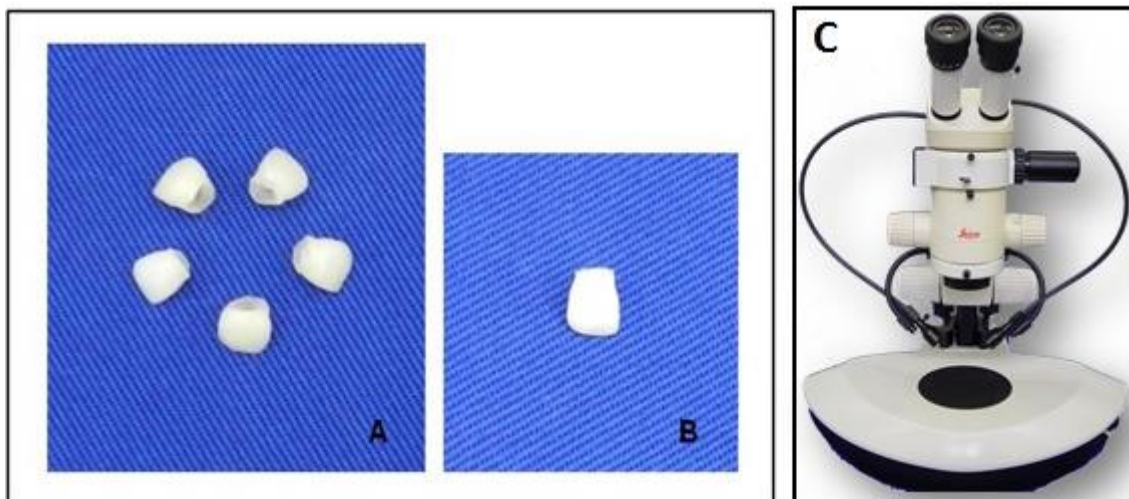


Fernanda Miori Pascon

RG: 28 269 901-6

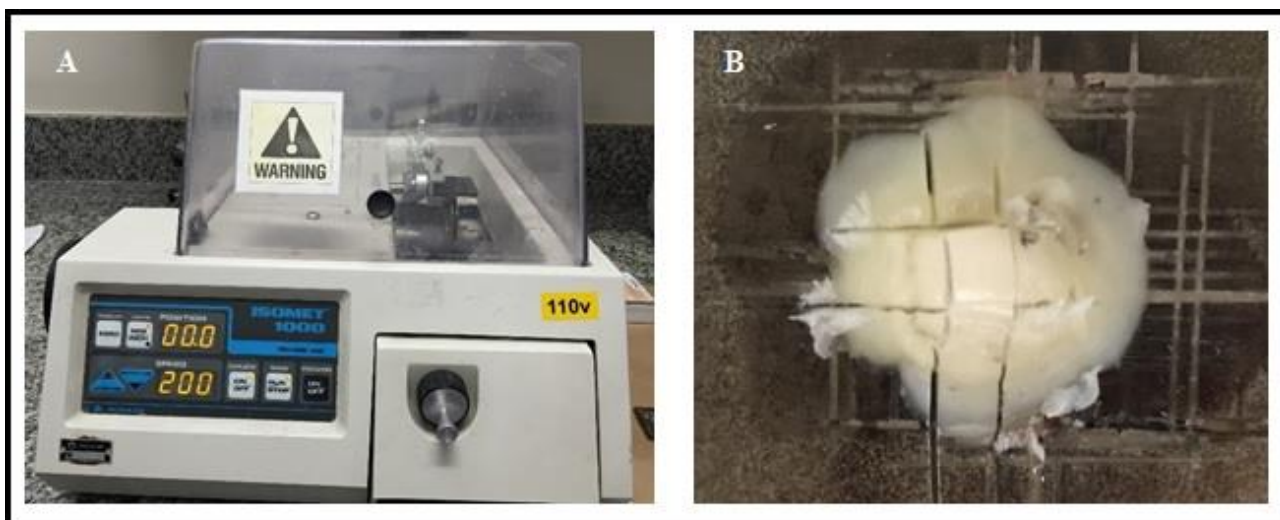
APÊNDICE 1 - Figuras ilustrativas com a descrição da metodologia empregada no estudo

Figura 1 - Ilustração da seleção das coroas dos dentes decíduos



- A- Coroas de dentes decíduos humanos obtidos e selecionados;
- B- Vista aproximada de um dente anterior decíduo selecionado;
- C- Lupa estereoscópica (Leica MZ6, Alemanha), usada em aumento de 20x para seleção das coroas.

Figura 2 - Passos para a obtenção dos blocos de esmalte



- A- Cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) usada para a obtenção dos blocos de esmalte;
- B- Coroa fixada no stub de resina com cera pegajosa e obtenção dos blocos de esmalte (4x4mm).

Figura 3 - Esquema representando a divisão dos blocos de esmalte. Controle hígido em vermelho, representado pela aplicação de duas camadas de verniz resistente ao ácido ((RISQUÉ®, São Paulo, Brasil), aplicados em 1x4 mm da superfície de cada bloco, antes da formação da lesão de cárie.

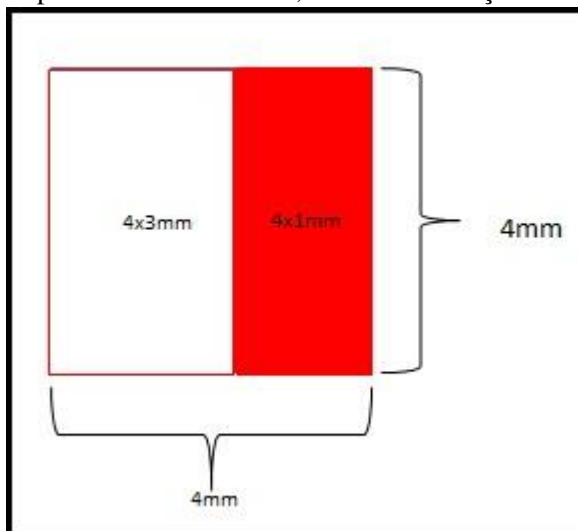
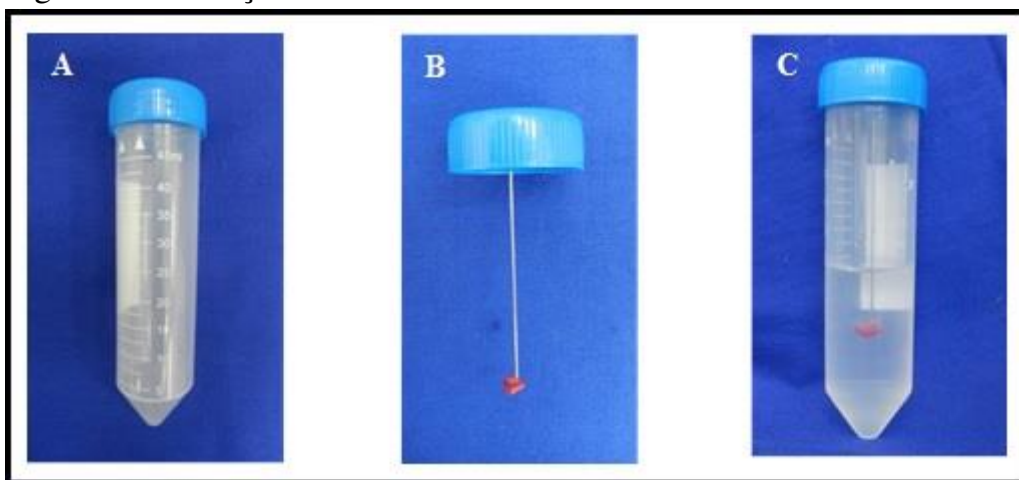


Figura 4 - Formação das lesões iniciais de cárie em esmalte



- A- Modelo de tubo falcon de 45 ml utilizado para que os blocos fossem submersos em solução subsaturada de hidroxiapatita armazenados em estufa a 37 °C por 16 h;
- B- Bloco de esmalte fixado individualmente em haste de fio ortodôntico acoplado em tubo falcon;
- C- Bloco de esmalte submerso em solução para a formação da lesão de cárie.

Figura 5: Esquema representando o bloco de esmalte com as divisões após a formação da lesão inicial de cárie em esmalte. Controle pré-tratamento demonstrado em azul: duas camadas de verniz resistente ao ácido (RISQUÉ®, São Paulo, Brasil) foram aplicadas com cuidado em 1x4 mm da superfície de cada bloco.

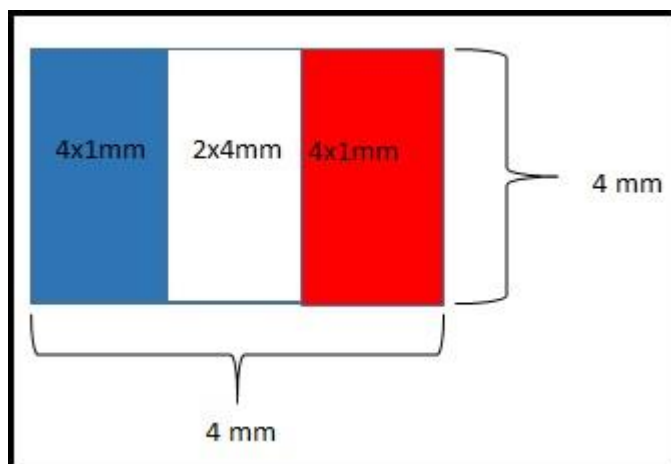
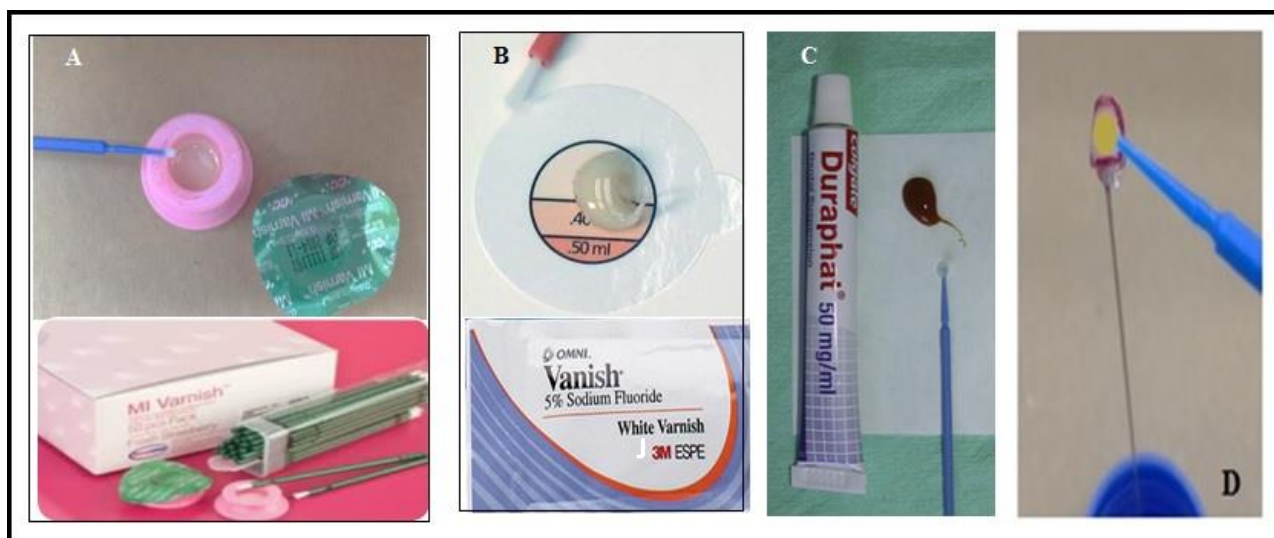
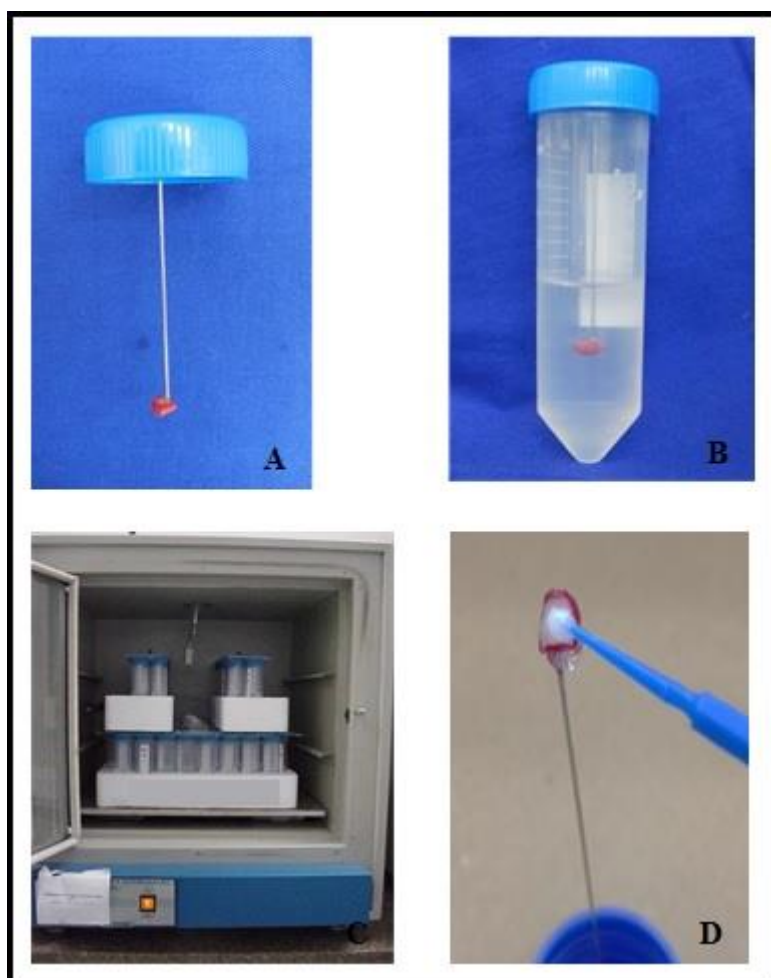


Figura 6: Vernizes utilizados na pesquisa



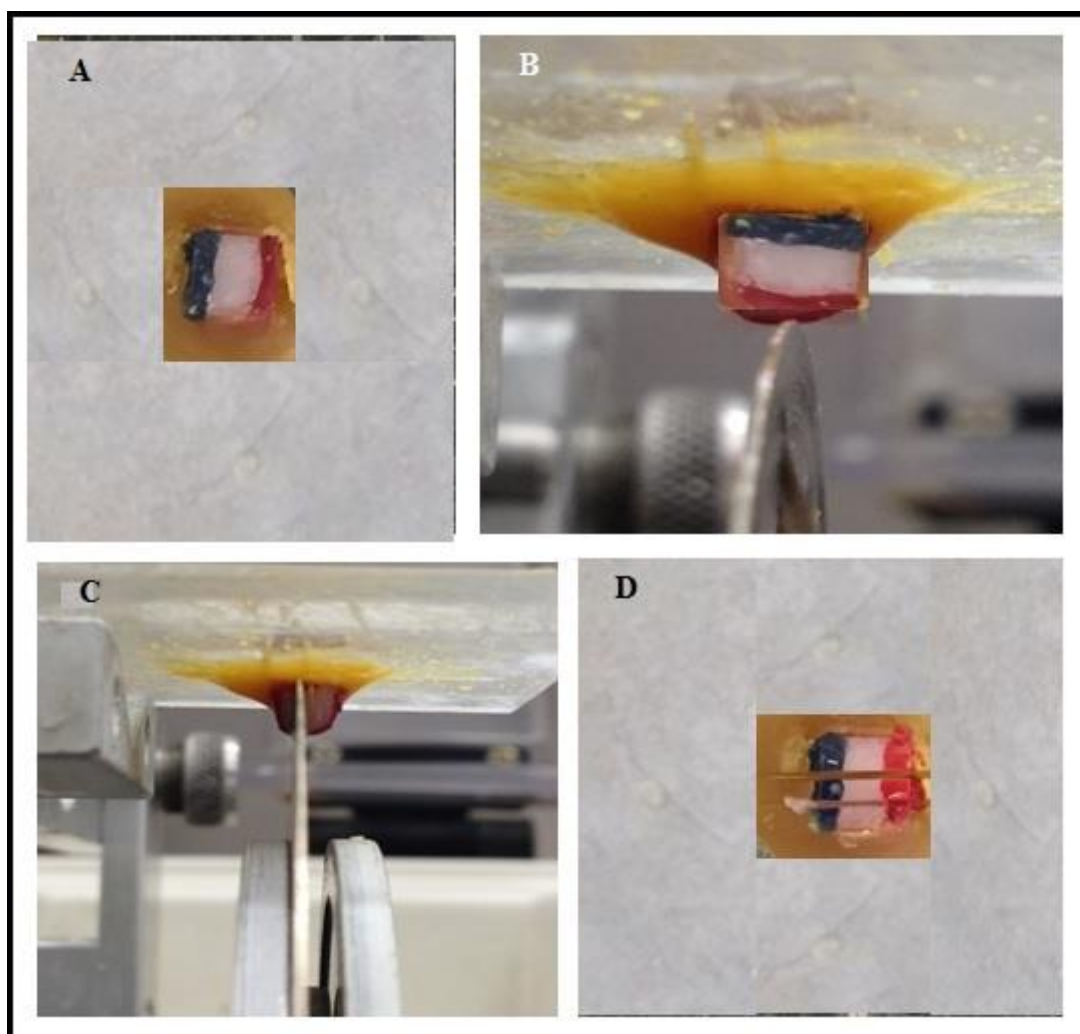
- A- Verniz MI Varnish[™]
- B- Verniz Vanish[™]
- C- Verniz Duraphat[®]
- D- Aplicação do verniz fluoretado no bloco de esmalte

Figura 7: Sequência do tratamento dos blocos de esmalte



- A- Colocação individualmente dos blocos de esmalte em hastes de fio ortodôntico e fixação nas tampas de tubos falcons;
- B- Blocos submersos em solução em saliva artificial por 12 horas;
- C- Tubos falcons com os blocos em estufa a 37 °C;
- D- Remoção do verniz fluoretado.

Figura 8: Sequência do preparo para obtenção das secções dos blocos



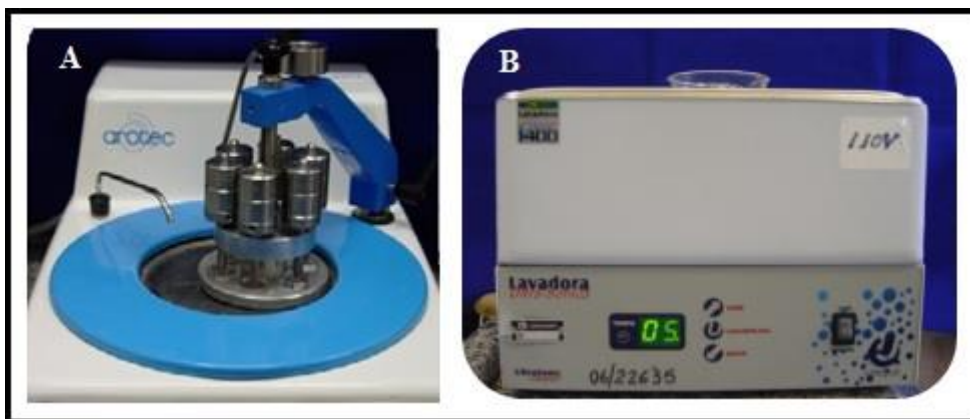
- A- Bloco de esmalte fixado em placa de acrílico com cera pegajosa;
- B- Posicionamento do bloco de esmalte na cortadeira com disco diamantado dupla face;
- C- Corte do bloco com disco diamantado dupla face;
- D- Bloco seccionado duas vezes resultando em três secções de aproximadamente 1 mm.

Figura 9: Para a realização da análise da microdureza longitudinal uma secção de cada bloco foi embutida na embutidora



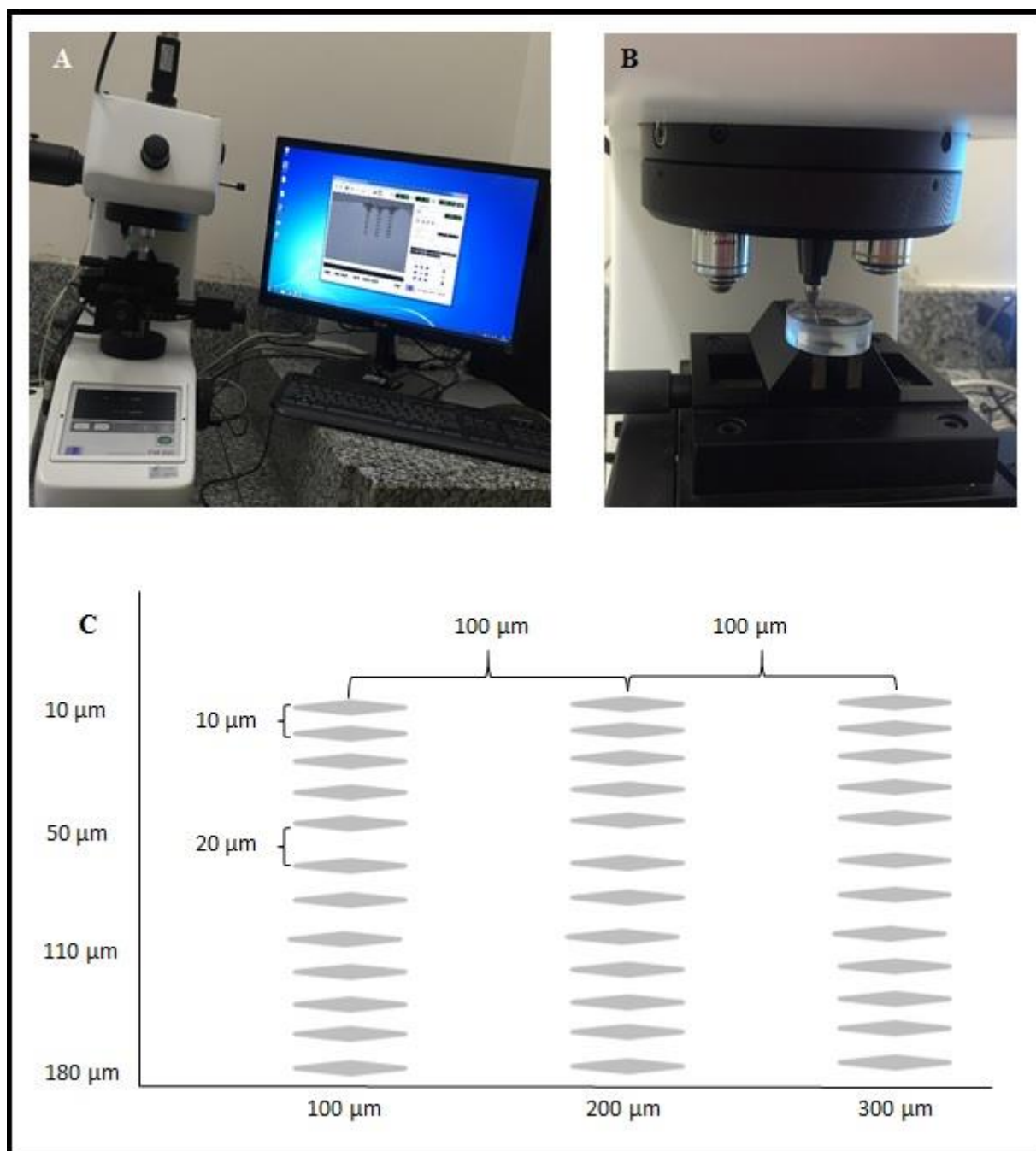
- A- Posicionamento das secções na embutidora;
 B- Embutidora PRE 30 Mi (Arotec, São Paulo, Brasil) usada no estudo.

Figura 10: Placas de acrílico com as secções dos blocos de esmalte que foram polidos e levados em ultrassom.



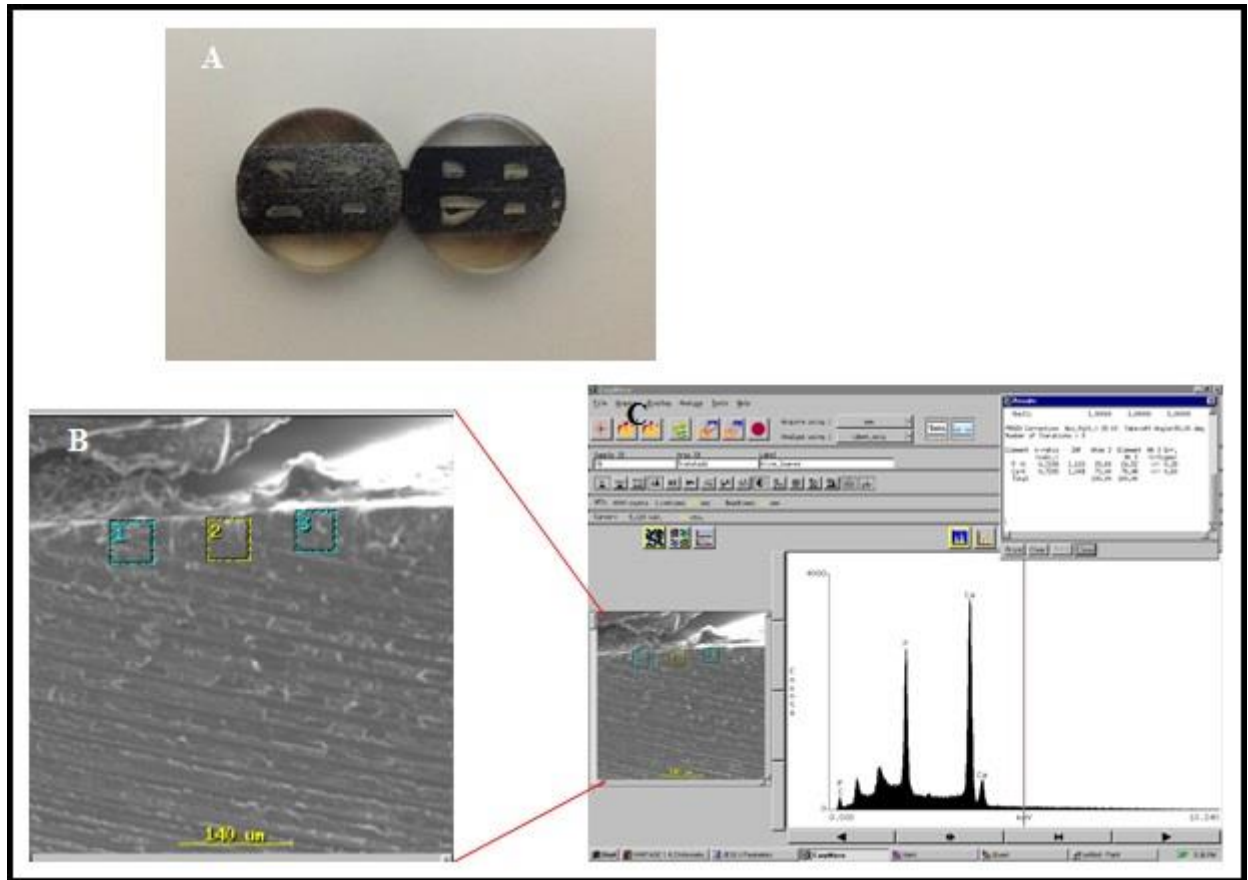
- A- Polimento das placas de acrílico em politiz (Metaserv 2000) com lixas abrasivas de óxido de alumínio refrigeradas a água e de granulação 400, 600, 1200, sendo finalizado com discos de feltro e pastas diamantadas (Buehler) de 6 μ m e 3 μ m e suspensão de diamante de 1 μ m (Buehler);
 B- Aparelho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner, Santo Amaro, SP, Brasil).

Figura 11: Análise de microdureza longitudinal



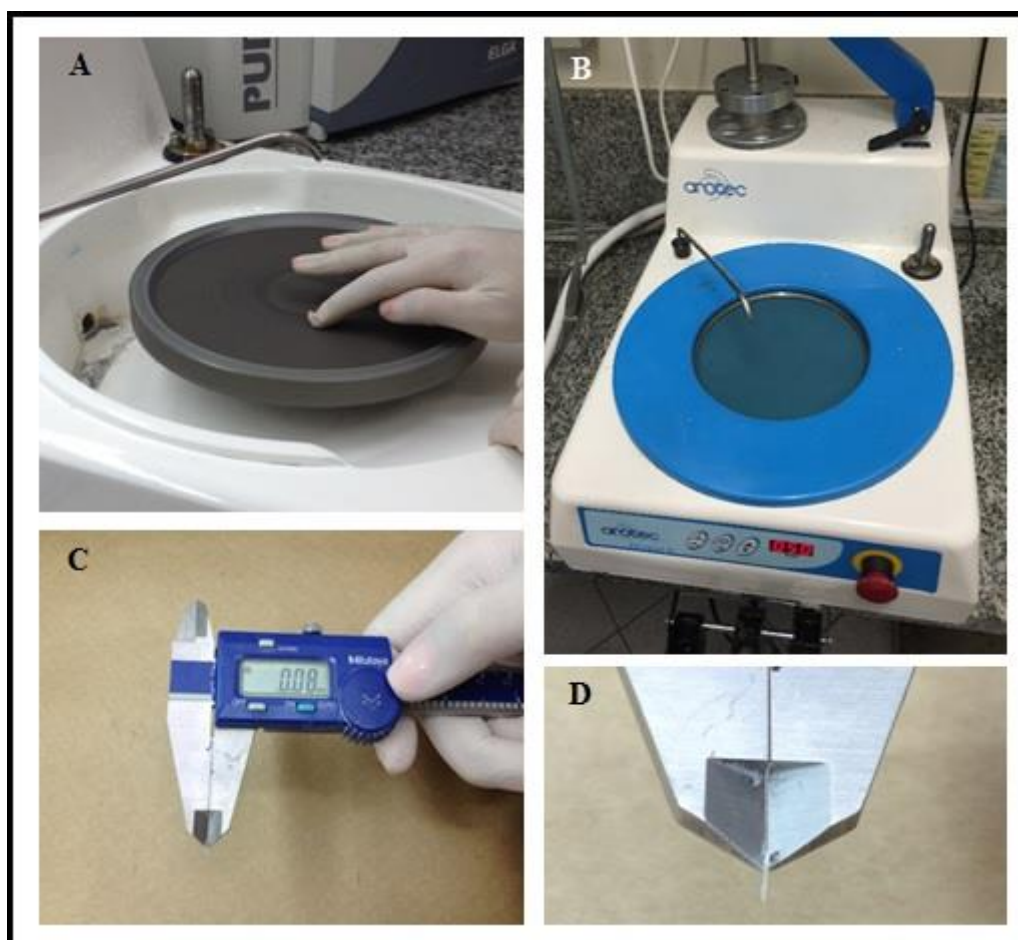
- A- Microdurômetro (HMV – 2 Shimadzu, Japão) utilizado com penetrador do tipo *Knoop*;
 B- Penetrador do tipo *Knoop*;
 C- Esquema representando como foi realizada a microdureza longitudinal, com carga 25g/5 segundos, no qual foram feitas 3 fileiras de 12 impressões cada iniciando a 10 μm da superfície do esmalte até 180 μm.

Figura 12: Análise da Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)



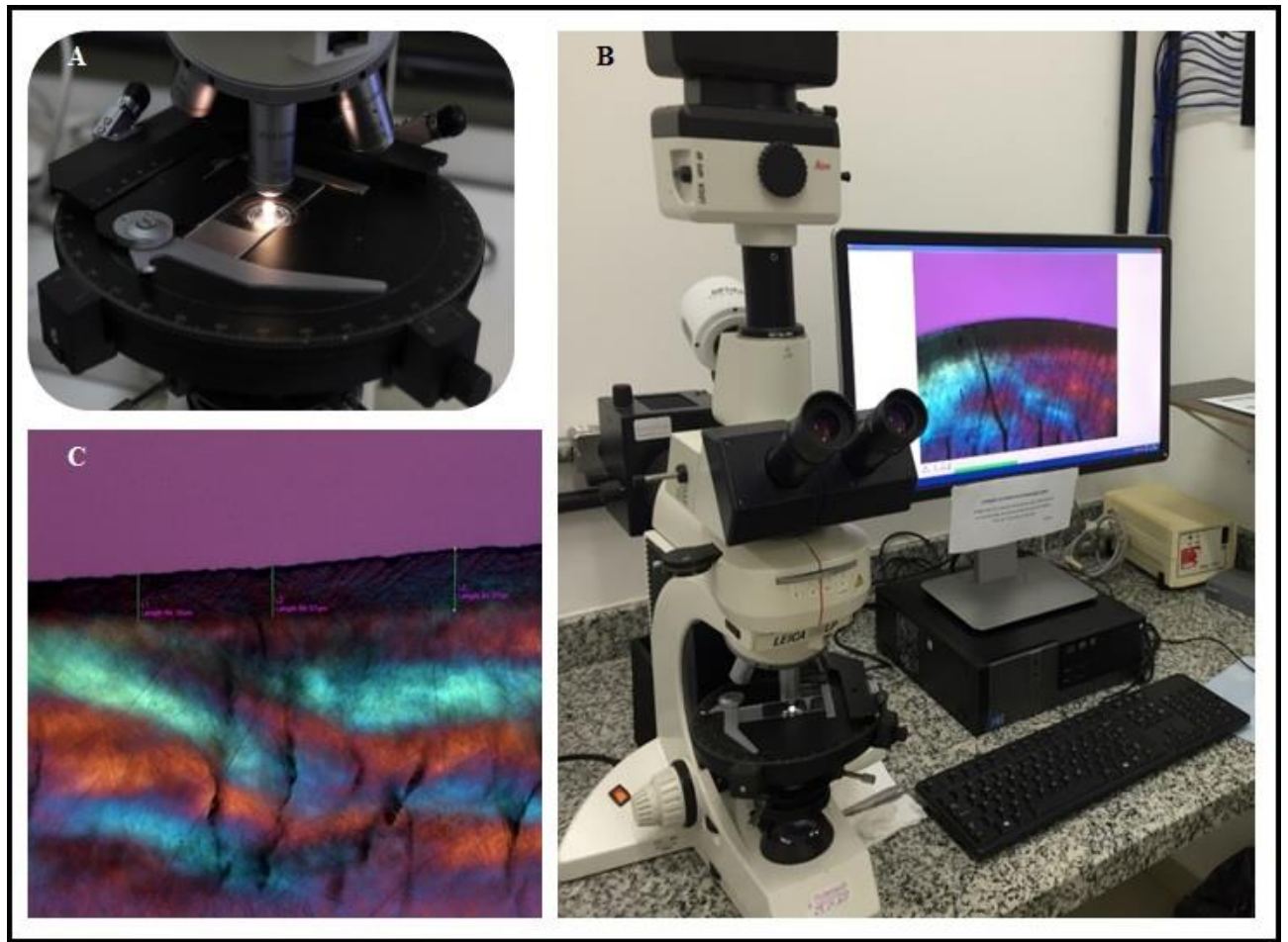
- A- Secções dos blocos de esmalte fixados com fita dupla face de carbono e cobertos por uma fina camada de carbono;
- B- Análise do conteúdo de Cálcio e Fósforo por meio da Espectroscopia por EDS. Leitura realizada em três regiões distintas superficiais
- C- Cálcio e Fósforo identificados e quantificados por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 13: Preparo dos espécimes para a análise de microscopia de luz polarizada (MLP)



- A- Uma das secções foi aplainada e polida com lixas carbeto de silício (400, 600 e 1200);
- B- Seguido por polimento com pastas abrasivas de diamante (3 μm);
- C- Ao final deste processo a espessura obtida foi de aproximadamente 100 μm ;
- D- Verificação da espessura dos espécimes, utilizando-se paquímetro digital (Mitutoyo, Série 500).

Figura 14: Análise da Microscopia de Luz Polarizada (MLP)



- A- Espécime em lamínula para análise em MLP.
- B- Microscópio de Luz Polarizada e software LAS
- C- Imagem representativa e ilustrativa de lesão obtida por meio da MLP (10X) e respectivas medidas da profundidade da lesão de cárie