



THAIS VARANDA

**AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA
FORMAÇÃO E TRATAMENTO *IN VITRO* DE LESÕES DE
CÁRIE SUB-SUPERFICIAIS EM DENTES DECÍDUOS**

Piracicaba

2014



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

THAIS VARANDA

**AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA
FORMAÇÃO E TRATAMENTO *IN VITRO* DE LESÕES
DE CÁRIE SUB-SUPERFICIAIS EM DENTES
DECÍDUOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Mestra em Odontologia –
Área de Odontopediatria.

Orientadora: Fernanda Miori Pascon

Co-orientadora: Regina Maria Puppini-Rontani

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida por Thais Varanda, orientada
pela Prof^ª Dr^ª Fernanda Miori Pascon e co-orientada
pela Prof^ª Dr^ª Regina Maria Puppini-Rontani.

Assinatura do orientador

Piracicaba

2014

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

V421a Varanda, Thais, 1978-
Avaliação qualitativa e quantitativa da formação e tratamento in vitro de lesões de cárie sub-superficiais em dentes decíduos / Thais Varanda. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Fernanda Miori Pascon.
Coorientador: Regina Maria Puppini Rontani.
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. Puppini-Rontani, Regina Maria, 1959-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Qualitative and quantitative evaluation of the formation and treatment of white spot lesions produced in vitro in teeth deciduous

Palavras-chave em inglês:

Tooth remineralization

Fluorine compounds

Dental caries

Área de concentração: Odontopediatria

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Fernanda Miori Pascon [Orientador]

Maria Beatriz Duarte Gavião

Ana Flávia Sanches Borges

Data de defesa: 16-06-2014

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 16 de Junho de 2014, considerou a candidata THAIS VARANDA aprovada.

Handwritten signature of Fernanda Miori Pascon in blue ink.

Profa. Dra. FERNANDA MIORI PASCON

Handwritten signature of Ana Flávia Sanches Borges in blue ink.

Profa. Dra. ANA FLÁVIA SANCHES BORGES

Handwritten signature of Maria Beatriz Duarte Gavião in blue ink.

Profa. Dra. MARIA BEATRIZ DUARTE GAVIÃO

RESUMO

Lesões de mancha branca são comumente observadas em dentes decíduos (DD) e quando diagnosticadas e tratadas precocemente com diversos materiais que liberam fluoretos, apresentam prognóstico favorável. Os objetivos desta dissertação foram: (1) avaliar quanti-qualitativamente dois tempos de formação de lesões de cárie sub-superficiais (LCSS) em DD; (2) avaliar quanti-qualitativamente o efeito de três vernizes fluoretados: Duraphat[®], MI Varnish[™], e Vanish[™] em LCSS de DD. Para o objetivo 1, utilizou-se 20 DD distribuídos em 2 grupos (n=10): 8 e 16h. Foram produzidas LCSS em blocos de esmalte utilizando-se solução desmineralizadora. Profundidade (análise quantitativa) e homogeneidade (análise qualitativa) das lesões foram avaliadas em microscopia de luz polarizada (MLP). Para a profundidade foram realizadas 3 medidas em cada lesão (em μm) e calculou-se a média. Para a homogeneidade as imagens foram classificadas em escores (0=ausência de homogeneidade; 1=homogeneidade). Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade, Shapiro-Wilk e uma vez que não obedeceram à distribuição normal dos dados, estes foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Quanto à profundidade não se observou diferença significativa entre 8 ($75,61 \pm 41,46$) e 16h ($104,53 \pm 90,00$) ($p=0,6272$). Para a homogeneidade, 8h promoveu formação de 50% de LCSS homogêneas comparada a 100% em 16h ($p=0,0149$). Para o objetivo 2, utilizou-se 36 DD (n=9). LCSS foram produzidas em blocos de esmalte por 16h. Os materiais foram aplicados e após 7 dias os espécimes foram seccionados e analisados quanto à profundidade das LCSS (em MLP), perda mineral (dureza *Knoop*) e quantidade de cálcio (Ca) e fósforo (P) (espectroscopia por energia dispersiva - EDS). A profundidade foi calculada conforme descrito anteriormente. Para a dureza *Knoop* realizou-se três fileiras de 12 impressões (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 μm) (25g/5s). Valores de dureza *Knoop* (KHN) foram obtidos e calculou-se a variação do KHN (ΔS). Para EDS os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura e a quantidade de cálcio (Ca) e fósforo (P) foi calculada nas regiões superficiais e sub-superficiais. As imagens obtidas em MLP foram submetidas à análise descritiva. Os dados quantitativos foram submetidos aos testes Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey como teste *post-hoc* ($\alpha=5\%$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à média das profundidades das LCSS analisadas em MLP.

Os grupos tratados apresentaram valores médios semelhantes ($39,73 \pm 14,20 \mu\text{m}$; $32,77 \pm 11,86 \mu\text{m}$; $38,13 \pm 9,17 \mu\text{m}$, para Duraphat[®], MI Varnish[™] e Vanish[™], respectivamente), diferente numericamente do grupo controle ($54,10 \pm 34,56 \mu\text{m}$). Para a dureza, observou-se que Duraphat[®] (2022 ± 1071) apresentou a menor perda mineral comparado aos grupos controle (5239 ± 2299), MI Varnish[™] (4505 ± 1098) e Vanish[™] (4431 ± 1512) ($p < 0,001$, $p = 0,0022$ e $p = 0,0036$, respectivamente). Para EDS tanto para Ca, quanto para P, observou-se ausência de interação entre os materiais e regiões estudadas, porém observou-se diferença significativa para a quantidade de Ca entre as regiões ($p < 0,05$). A região superficial apresentou menor quantidade de Ca que a região sub-superficial. Pode-se concluir que: dezesseis horas foi o tempo mais adequado para formação das LCSS em dentes decíduos; os vernizes fluoretados modificados não se mostraram efetivos em reduzir a perda mineral de LCSS em dentes decíduos; Duraphat[®] foi o material que apresentou maior efetividade em diminuir a perda mineral de LCSS em dentes decíduos.

Palavras-chave: Remineralização dentária, compostos de flúor, manchas brancas

ABSTRACT

White spot lesions are commonly observed in primary teeth (PT) and when early diagnosed and treated using with various materials that release fluoride, they have a favorable prognosis. The aims of this study were: (1) to evaluate quantitatively and qualitatively 2 formation times of subsurface carious lesions (SCL) in PT; (2) to evaluate quantitatively and qualitatively the effect of three fluoride varnishes: Duraphat[®], MI Varnish[™], Vanish[™] in SCL of PT. For the first aim, 20 PT were selected and divided into 2 groups (n = 10): 8 and 16h. SCL was produced in enamel blocks using demineralizing solution. Depth (quantitative analysis) and homogeneity (qualitative analysis) of the lesions were evaluated in polarized light microscopy (PLM). For depth lesion determination 3 measurements were performed in each lesion (μm) and the average was calculated. For homogeneity the images were classified into scores (0 = no homogeneity, 1 = homogeneity). Quantitative data were subjected to normality test, Shapiro-Wilk and once did not show normal data distribution; they were subjected to the Mann-Whitney test. Regarding lesion depth no significant difference was observed between 8h (75.61 ± 41.46) and 16h (104.53 ± 90.00) ($p=0.6831$). For homogeneity, 8h promoted formation of homogeneous SCL in 50% compared to 100% in 16h ($p<0.01$). For the second aim, 36 PT (n = 9) were selected. SCL were produced in enamel blocks for 16h. The materials were applied and after 7 days the specimens were sectioned and analyzed for the depth of the SCL (PLM), mineral loss (Knoop hardness) and calcium (Ca) and phosphorus (P) (energy dispersive spectroscopy - EDS). For PLM the lesion depth was calculated as described above. For microhardness, three rows with 12 impressions each were performed (10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 μm) (25g/5s). Knoop microhardness (KHN) was obtained and calculated the KHN variation (ΔS). For EDS specimens were observed in a scanning electron microscope and the amount of calcium (Ca) and phosphorus (P) was calculated in surface and sub-surface regions. The images obtained in PLM were subjected to descriptive analysis. Quantitative data were subjected to the Shapiro-Wilk test, ANOVA and Tukey's test as post-hoc ($\alpha = 5\%$). No significant differences were observed between groups in relation to the average depths of the SCL analyzed in PLM. The treated groups had similar mean values ($39.73\pm 14.20\mu\text{m}$; $32.77\pm 11.86\mu\text{m}$; $38.13\pm 9.17\mu\text{m}$ to Duraphat[®], MI Varnish[™] and Vanish[™], respectively), numerically different from the control group ($54.10\pm 34.56\mu\text{m}$). For the hardness, it was observed that Duraphat[®] (2022 ± 1071) had

the lowest mineral loss compared to the control (5239 ± 2299), MI Varnish™ (4505 ± 1098) and Vanish™ (4431 ± 1512) ($p<0.001$, $p=0.0022$ and $p=0.0036$, respectively). For EDS, both for Ca and P, there was no interaction between materials and regions studied, but there was a significant difference to the amount of Ca between regions ($p<0.05$). The surface region showed a lower content of Ca than the sub-surface region. It can be concluded that 16 hours was the most appropriate time for the formation of SCL in primary teeth; modified fluoride varnishes they were not effective in reducing SCL mineral loss of in primary teeth; Duraphat® was the material that showed effectiveness to reduce SCL mineral loss of in primary teeth.

Keywords: Remineralization, fluoride varnishes, white spots lesion

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------|------|
| DEDICATÓRIA | xiii |
| AGRADECIMENTOS | xv |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 16 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 5 RESULTADOS | 34 |
| 6 DISCUSSÃO | 45 |
| 7 CONCLUSÃO | 50 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXO | 60 |

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A Deus... Minha luz, minha força e meu guia.

Aos meus pais, Terencio e Luzia pelo amor, pelo esforço, apoio, paciência e educação, tão essenciais para que eu chegasse até aqui. Se hoje sou a pessoa que sou, devo tudo a vocês. Obrigada pelo exemplo de honestidade, integridade e amor maior. Nada disso teria o menor sentido hoje sem a presença de vocês em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais

Aos meus irmãos Denis e Carlos Eduardo pelo carinho e apoio em todos os momentos. Vocês são mais que especiais e necessários para minha vida.

Aos meus sobrinhos Carlos Eduardo e Maria Fernanda por iluminarem e colorirem meus dias. Amo.

À minha querida avó Maria Aparecida P. Curcelli por ser essa pessoa maravilhosa que é, por cuidar e acolher todos os filhos, netos e bisnetos com o mesmo amor e intensidade. Meu maior exemplo de fé e superação.

Aos meus tios Paulo, Emílio e Lara pela acolhida constante, carinho e amor a mim dispensados. Tio Guina (*in memoriam*), você estará para sempre no meu coração.

Aos meus primos Daniela, Felipe, Gabriela, Júlia, Emílio e Vitor pela linda infância que tivemos juntos. Essas lembranças ficarão eternamente gravadas. Dani, obrigada pelo Antonio.

Ao meu afilhado André pela criança linda e carinhosa que é. Você é o amor da madrinha.

Aos queridos Fran, Marilu, Mariana e Luis Guilherme Mezzena Gobatto pela acolhida carinhosa em Piracicaba. Jamais esquecerei o que fizeram por mim. Obrigada é muito pouco.

À todos os meus familiares que contribuíram de alguma forma para que esse sonho se tornasse realidade.

Muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos

À Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon pela orientação na execução deste trabalho, pela seriedade, paciência e dedicação. Obrigada por contribuir para o meu crescimento pessoal e também profissional.

Às Profas. Dras. do Departamento de Odontologia Infantil, área de Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), Regina Maria Puppini-Rontani, Marinês Nobre dos Santos Uchôa e Maria Beatriz Duarte Gavião pelos ensinamentos passados e transmissão do conhecimento tão brilhantemente adquiridos durante todos esses anos de ensino.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e Coordenador Geral da Universidade Prof. Dr. Edgar Salvadori De Decca.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Junior e do Diretor Associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

À Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia, coordenadora geral dos cursos de Pós-Graduação e à Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Às Profas. Dras. Fernanda Miori Pascon e Marinês Nobre dos Santos Uchôa e ao Prof. Dr. Érico Barbosa de Lima que contribuíram no exame de pré-qualificação, pelas sugestões para a realização desse trabalho.

Às Profas. Dras. Marinês Nobre dos Santos Uchôa e Fabiana Scarparo Naufel e ao Prof. Dr. Érico Barbosa de Lima pela importante contribuição no exame de qualificação para o aprimoramento dessa dissertação.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora, área de Dentística, por nos conceder a utilização do moinho para que essa pesquisa fosse realizada.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por conceder a bolsa de mestrado para a execução deste trabalho (2012/03036-3).

Ao técnico de laboratório da Odontopediatria, Marcelo Corrêa Maistro, por estar sempre disposto a ensinar metodologias e procedimentos analíticos para a realização dessa pesquisa.

Ao Adriano Luis Martins e à Eliene Orsini Romani, do Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/Unicamp), pela paciência e por sempre estarem à nossa disposição.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/Unicamp) por estarem sempre prontos a ajudar, em especial Ana Paula pela valiosa paciência e contribuição com os procedimentos burocráticos.

Às amigas do grupo Najas, Daniele de Cássia Picco, Darlle Santos Araújo, Lenita Marangoni Lopes, Micaela Cardoso e Natália Martins Joaquim pela amizade, pelas trocas de experiências, risadas frequentes, companheirismo e os bons momentos compartilhados. Minha estadia em Piracicaba foi muito mais feliz com a presença de vocês. O Najas jamais será esquecido.

Aos amigos da turma de mestrado Darlle Santos Araújo, Fabiana Furtado Freitas, Juliana Neide Amato, Lenita Marangoni Lopes, Luiz Felipe Barbosa Martins, Maribel Hilasaca Mamani, Micaela Cardoso e Natália Martins Joaquim, pela amizade e pelos bons momentos vividos.

À minha amiga Natália Martins Joaquim pela parceria e cumplicidade em todos os momentos. Nunca uma dupla deu tão certo. Obrigada pela paciência.

À minha amiga Micaela Cardoso por toda troca de experiência, pelos momentos de alegria, pelo companheirismo nas viagens, pelo seu alto astral e por ser essa pessoa

tão iluminada e feliz. Obrigada pela paciência e por ter me acolhido em sua casa. Não esquecerei.

À Darlle Santos Araújo pela ajuda nas impressões da dissertação enquanto estive fora, pela amizade e por todo o carinho a mim dispensados.

À Larissa Ferreira Pacheco pela disponibilidade em ajudar e paciência para explicar e ensinar as metodologias deste trabalho.

À Alexandra Shizue Iwamoto por sempre estar disponível em ajudar e ser uma pessoa tão prestativa. Obrigada por todas as dicas e artigos enviados.

Às amigas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Odontopediatria, Ana Bheatriz Marangoni Montes, Bruna Raquel Zancopé, Fabíola Diogo de Siqueira Frota, Larissa Ferreira Pacheco, Lívia Pagotto Rodrigues, Luciana Tiemi Inagaki, Maria Carolina Salomé Marquezin e Vanessa Benetello pela boa convivência e troca de experiências.

1 INTRODUÇÃO

As lesões de cárie iniciais, também chamadas de lesões de mancha ou sub-superficiais, quando diagnosticadas precocemente encontram-se em estágio reversível tornando o tratamento mais simples, menos invasivo e de menor custo (Couto *et al.*, 2005). Em pacientes com boa higiene bucal e exposição regular ao fluoreto essas lesões tendem a se remineralizar, proporcionando um esmalte mais resistente a futuras dissoluções. Entretanto, em pacientes com hábitos de higiene bucal inadequados, visita irregular ao dentista e baixa exposição ao fluoreto, as lesões de esmalte podem progredir para lesões cavitadas (Mejàre *et al.*, 1999; Kielbassa *et al.*, 2006).

Sabe-se que a desmineralização e remineralização do esmalte e da dentina são processos dinâmicos e a regulação do equilíbrio nesse processo é a chave para a prevenção da doença (Ehrlich *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). A remineralização do esmalte tem sido estudada há algum tempo e diversos agentes com capacidade remineralizadora foram avaliados (Zhou *et al.*, 2012). Entretanto, diferentes tipos de materiais dentários que liberam fluoretos e com novas tecnologias são disponibilizados no mercado a cada ano, incluindo selantes, cimento de ionômero de vidro e vernizes (Zhou *et al.*, 2012).

Os vernizes fluoretados são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de sensibilidade dentária, mas são também indicados para prevenção e tratamento da cárie dentária (Beltran-Aguillar *et al.*, 2000). Esse método é efetivo, seguro, de fácil aplicação e possui um bom custo-benefício (Beltran-Aguillar *et al.*, 2000). A escolha por esse material baseia-se em estudos *in vitro* e *in vivo* encontrados na literatura que demonstraram que os vernizes fluoretados são mais eficientes que a aplicação tópica de flúor gel no processo de remineralização dentária (Tewari *et al.*, 1991; Seppa *et al.*, 1995; Hazelrigg *et al.*, 2003; Castellano & Donly, 2004). Além disso, a facilidade da técnica, a aceitabilidade pelos pacientes, o contato prolongado com o esmalte desmineralizado e o baixo índice de intoxicação aguda em relação aos outros materiais utilizados em aplicações tópicas de flúor, justificam a sua aplicação em pacientes jovens (Carvalho *et al.*, 2010).

Uma vez que cálcio e fosfato são os constituintes primários dos dentes, quantidades adequadas desses íons devem estar presentes no meio bucal para que a remineralização possa ocorrer. Recentemente, vernizes fluoretados com adição de

cálcio e fosfato foram desenvolvidos para suplementar a quantidade desses íons na saliva e elevar a remineralização pelo fluoreto (Schemehorn *et al.*, 2011).

Assim, novas tecnologias e produtos com propriedades anti-cariogênicas que reverterem o processo de desmineralização já instalado no esmalte dentário estão sendo estudados e avaliados. Um desses sistemas desenvolvidos utiliza o fosfopeptídeo de caseína (CPP), uma proteína presente no leite, utilizada para estabilizar os íons cálcio e fosfato em altas concentrações de nanocomplexos amorfos designados por fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Reynolds, 1998). O CPP permite que altas concentrações dos íons cálcio e fosfato sejam estabilizados em soluções de uma forma que esteja biodisponível para a promoção da remineralização (Cochrane *et al.*, 2008). A associação CPP-ACP tem sido incorporada em produtos de higiene oral, tais como dentifrícios, gomas de mascar e enxaguatórios bucais (Iijima *et al.*, 2004; Tang & Millar, 2010), além de produtos para uso profissional, como vernizes fluoretados.

Outro tipo de substância recentemente adicionada em produtos voltados para a prevenção é o Tri-Cálcio Fosfato (TCP), que é uma forma cristalina do fosfato de cálcio, semelhante ao fosfato de cálcio do esmalte dentário. O TCP é um material que fornece íons cálcio e fosfato biodisponíveis para a estrutura dental, gerando remineralização mesmo quando usado em pequenas quantidades. Um estudo recente realizado em esmalte de molares comparou a quantidade e a taxa de fluoreto liberado pelos vernizes que continham TCP com vernizes fluoretados tradicionais. O resultado foi que os vernizes que continham o TCP apresentaram uma concentração maior de fluoreto liberado quando comparados aos vernizes tradicionais (Jablonowski, 2012).

A maioria dos estudos apresentados acima foi realizada em dentes permanentes, utilizando-se dentifrícios, e sabe-se que para pacientes infantis de alto risco a cárie e com lesões sub-superficiais ativas diagnosticadas clinicamente, há a necessidade de intervenção profissional, ainda que minimamente invasiva, com a aplicação de fluoretos (AAPD, 2011) seja este na forma de gel ou verniz, enfatizando assim a importância da realização de estudos conduzidos com esses materiais.

Nesse contexto, apesar dos indícios de que a adição de CPP-ACP e TCP promovam remineralização do esmalte dentário, ainda não há estudos sobre o efeito quantitativo e qualitativo desses vernizes fluoretados em lesões de cárie sub-superficiais produzidas *in vitro*, em dentes decíduos, o que torna necessário a condução de estudos que viabilizem e comparem esses agentes promotores da remineralização e prevenção da cárie dentária.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Métodos de produção de lesões de cárie sub-superficiais (LCSS)

A lesão de cárie sub-superficial (LCSS) ou lesão de macha branca é considerada uma hipomineralização do esmalte de etiologia multifatorial. O cálcio da fase mineral da hidroxiapatita é dissolvido pelos ácidos orgânicos, produzindo microporosidades no tecido dentário (Hallsworth *et al.*, 1973). Essas lesões caracterizam-se clinicamente, por manchas brancas opacas e sem brilho, visíveis após limpeza e secagem dos elementos dentários. Geralmente estão localizadas na região cervical das faces vestibulares e não possuem cavitação. Histologicamente, as lesões de mancha branca possuem quatro zonas: (1) zona superficial; (2) corpo da lesão; (3) zona escura e (4) zona translúcida (Ferjerskov & Kidd, 2005).

Segundo Flaitz & Hicks (1996) a prevalência de lesões de mancha branca em crianças, adolescentes e adultos até 1996 era desconhecida. Audio-Gold & Tomar (2005) estudaram a prevalência de lesões de mancha branca em crianças de 5 anos de idade e verificaram que 71% delas apresentavam este tipo de lesão de cárie. Parisotto *et al.* (2012) realizaram um estudo transversal para verificar a prevalência da cárie precoce da infância e o perfil epidemiológico de 351 pré-escolares na faixa de 3 a 4 anos de idade e observaram que 68% dessa amostra estavam com lesões de cárie (cavidadas ou não) e que apenas 32% estavam livres de cárie.

Em virtude da necessidade de se estudar *in vitro*, estratégias para a prevenção e tratamento das lesões iniciais de cárie, diversos protocolos tem sido utilizados na produção artificial das mesmas. Esses métodos tem sido aplicados em dentes permanentes e decíduos humanos e bovinos e dentre eles estão a ciclagem de pH, a utilização de gel ácido, processos de desmineralização e remineralização (DES-RE) e o uso de soluções sub-saturadas de hidroxiapatita (Paes-Leme *et al.*, 2003; Tagliaferro *et al.*, 2007; Bar-Hillel *et al.* 2012).

Paes-Leme *et al.* (2003) com o objetivo de avaliar *in vitro* o efeito da combinação do dentífrico fluoretado e do flúor fosfato acidulado produziram artificialmente lesões sub-superficiais no esmalte de dentes bovinos. Estas foram produzidas suspendendo-se blocos de esmalte em solução desmineralizadora, sub-saturada para esmalte bovino, por 16 horas. Em dentes decíduos, Tagliaferro *et al.* (2007) com o objetivo de avaliar a eficácia do laser de CO₂ isolado ou combinado com

uma única aplicação tópica de flúor fosfato acidulado produziram LCSS de cárie em molares decíduos seguindo o protocolo de Paes-Leme *et al.* (2003).

Zhang *et al.* (2011) realizaram estudo *in vitro* para avaliar os efeitos do CPP-ACP em creme sobre a remineralização de LCSS de dentes decíduos e sua eficiência na prevenção da cárie. Para a formação das LCSS, blocos de esmalte foram seccionados e imersos em solução desmineralizadora contendo nitrato de cálcio, fosfato de potássio monobásico, NaF e ácido acético, por 48 horas, seguindo o modelo de Ten Cate & Duijsters (1982).

Bar-Hillel *et al.* (2012) também produziram lesões de cárie *in vitro* em dentes decíduos para avaliar o potencial de um produto em forma de creme (*Tooth Mousse - GC*) para aumentar a remineralização das LCSS produzidas artificialmente. Blocos de esmalte foram imersos em solução contendo ácido láctico, hidroxiapatita e ácido poliacrílico, por 4 dias. O processo de desmineralização no qual os blocos de esmalte foram submetidos resultou na produção de LCSS que se estendeu a cerca de 100µm em direção a junção amelo-dentinária.

Em 2012, Shabanian *et al.* avaliaram alterações na dureza de superfície do esmalte de dentes decíduos quando foram utilizadas várias suspensões de creme dental com ou sem flúor (*Crest 1100, Crest 500, Pooneh 500 e Pooneh without fluoride*). A solução de desmineralização continha fosfato de sódio, cloreto de cálcio e cloreto de potássio. Os blocos preparados para a remineralização foram imersos em solução de desmineralização por 72 horas. Os resultados mostram que as alterações da dureza para o creme dental *Crest 1100* foram significativamente maiores quando comparados aos demais produtos estudados.

O método químico de produção de LCSS, utilizando solução sub-saturada de hidroxiapatita possui a vantagem de induzir LCSS típicas de cárie de esmalte sem promover erosão do substrato (Moreno & Zahradnik, 1974). Além disso, a maioria dos estudos (Paes-Leme *et al.*, 2003; Tagliaferro *et al.*, 2007; Kantovitz *et al.*, 2013), nos quais foi utilizada solução sub-saturada de hidroxiapatita para a produção de LCSS, utilizou pó de esmalte de dentes permanentes ou bovinos como substrato para o preparo da solução desmineralizadora. Assim, justifica-se a avaliação da formação das LCSS em dentes decíduos utilizando-se como substrato o esmalte de dentes decíduos.

2.2 Métodos de avaliação da perda mineral do esmalte

Diversos métodos quantitativos e qualitativos podem ser empregados em estudos *in vitro* para se avaliar LCSS, sejam elas ativas ou remineralizadas. Dentre eles estão a microrradiografia, dureza (de superfície e longitudinal), Microscopia por Luz Polarizada (MLP), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).

Thaveesangpanich *et al.* (2005) determinaram se dez dias de ciclagem de pH utilizadas para dentes permanentes poderia ser utilizada também para avaliar os efeitos da desmineralização e remineralização, no esmalte de dentes decíduos. MLP e microrradiografia foram utilizadas para mostrar a profundidade, a área e o conteúdo mineral das lesões antes e após o tratamento com diferentes quantidades de creme dental. Os autores concluíram que dez dias de ciclagem de pH, em modelos *in vitro* usados para dentes permanentes foram tão agressivos quanto utilizado para dentes decíduos.

De Marsillac *et al.* (2010) avaliaram *in vitro* a profundidade e a estrutura do esmalte de molares permanentes humanos, após formação de lesão de mancha branca utilizando-se solução desmineralizadora. Os métodos de avaliação foram microdureza e MEV. Para isso, foram utilizados dez molares permanentes humanos os quais foram seccionados e janelas de exposição de 2,5mm x 1mm foram produzidas na área central do espécime. Em seguida, cada espécime foi individualmente exposto a 10,4ml de solução desmineralizadora (pH=5.0), durante 42 dias. Após esse período, os espécimes foram seccionados novamente no centro das lesões de manchas brancas produzidas anteriormente. Uma das metades obtidas foi analisada em MEV e a outra metade em microdurômetro para a determinação da dureza longitudinal. Os resultados obtidos a partir da análise em MEV demonstraram que, embora as lesões estivessem aparentemente intactas, erosão estava presente. Os pesquisadores concluíram que foi possível medir a profundidade da desmineralização utilizando-se desses métodos, porém a erosão do esmalte deve ser levada em consideração quando executada a técnica da dureza longitudinal.

Jabbarifar *et al.* (2011) avaliaram a dureza de superfície do esmalte de incisivos decíduos antes e após a ciclagem de pH. Esta foi conduzida durante 8 dias com padrão cíclico em solução desmineralizadora, a qual continha NaHPO₄, CaCl₂, e KCl e posteriormente, com solução remineralizadora usando suspensões de dentifrícios com diferentes concentrações de fluoreto (NaF 500ppm e 1100ppm). A dureza de

superfície (Vickers) foi medida utilizando-se carga de 100 gramas por 20 segundos em três pontos com distâncias de 500, 1000 e 1500µm. Analisando-se os dados obtidos, os pesquisadores concluíram que os dentifrícios com maiores teores de flúor promoveram maior dureza de superfície no esmalte após desmineralização e tratamento, quando comparados aos dentifrícios com baixo ou nenhum teor de flúor.

ALAmoudi *et al.* (2013) realizaram estudo semelhante aos anteriormente citados e compararam os efeitos da ciclagem de pH com solução desmineralizadora (CaCl_2 , NaH_2PO_4 e ácido acético; pH=4,5), por 3 horas, formando LCSS, seguidas de tratamento com solução remineralizadora (CaCl_2 , NaH_2PO_4 , KCl; pH=7.0), por 20 horas, na dureza do esmalte de dentes decíduos humanos tratados com vernizes convencionais contendo NaF a 5% e vernizes com adição de TCP. Essa dureza foi realizada utilizando-se carga estática de 25g durante 5 segundos e penetrador do tipo *Knoop*. Os resultados obtidos após a avaliação da dureza demonstraram que os vernizes com adição de TCP melhoram significativamente a capacidade protetora de dentes decíduos *in vitro*.

Outro método que pode ser utilizado para avaliação das LCSS é a EDS, a qual identifica e quantifica os elementos químicos, como cálcio e fósforo presentes nos espécimes. Oliveira *et al.* (2010) avaliaram e compararam *in vitro*, a composição mineral do esmalte de dentes decíduos e permanentes. Doze coroas de dentes decíduos e doze coroas de dentes permanentes hígidos foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em três grupos, de acordo com os métodos de análise para avaliação do substrato: microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração por RX (XRD) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS). As coroas dos dentes foram fixadas em resina acrílica e seccionadas longitudinalmente e os espécimes foram lixados, polidos e a espessura do esmalte foi medida na direção da junção esmalte-dentina usando um paquímetro digital. Em seguida, os espécimes foram imersos em glutaraldeído 3% em 0,05 M de tampão de cacodilato de sódio (pH=7,4), durante 24 horas a 4^oC. Após a fixação, os espécimes foram lavados com água destilada várias vezes por 1 hora. As superfícies do esmalte foram condicionadas com ácido fosfórico a 35% por 15 segundos e lavadas durante 15 segundos. Em seguida, os espécimes foram tratados com etanol e hexametildisililane por 10 minutos. Os espécimes foram secos num sistema de exaustão e após a secagem, inseridos em *stubs* de resina e pulverizados com uma fina camada de ouro para observação em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e EDS. As áreas analisadas para ambas as técnicas

foram: uma região perto da superfície externa e uma região perto da superfície interna, próxima a junção amelo-dentinária. Os resultados da análise por MEV mostram que os dentes decíduos possuem uma camada de esmalte mais fina que os dentes permanentes e que os resultados da análise por EDS mostram que a porcentagem de Ca e P foram mais altas nas duas regiões analisadas para o dente permanente quando comparado ao dente decíduo.

2.3 Vernizes fluoretados

Após a produção *in vitro* da LCSS, diversos estudos tem proposto tratamentos para essa manifestação da doença cárie (Arnold *et al.*, 2006; Zhou *et al.* 2012; Souchois & Vieira, 2012; Kantovitz *et al.*, 2013; Gelani *et al.*, 2014). Importante salientar que o tratamento das lesões não se baseia somente na utilização de materiais para a prevenção da evolução das manchas brancas, mas também na conscientização e educação dos pais e dos pacientes com relação à diminuição da transmissibilidade de bactérias cariogênicas, implementação de medidas de higiene oral, avaliações periódicas ao dentista e diminuição da exposição a sacarose. Entretanto para pacientes com moderado ou alto risco à cárie, é necessária também a utilização de medidas suplementares como o uso de fluoretos (AAPD, 2011).

Há algum tempo a remineralização do esmalte tem sido estudada e diversos agentes foram avaliados (Zhou *et al.*, 2012). Diferentes tipos de materiais dentários que liberam fluoretos e com novas tecnologias são disponibilizados no mercado a cada ano, incluindo selantes, cimento de ionômero de vidro, infiltrantes, dentifrícios e vernizes (Arnold *et al.*, 2006; Souchois & Vieira, 2012; Kantovitz *et al.*, 2013; Gelani *et al.*, 2014).

Em 1964, Schimidt desenvolveu o primeiro verniz fluoretado para prolongar o tempo de contato do fluoreto de sódio com a estrutura do dente, visto que o fluoreto é removido rapidamente da cavidade bucal, diminuindo, desse modo, a capacidade de interagir com os tecidos alvos (Lippert *et al.*, 2013).

Segundo Seppa (2004) os vernizes fluoretados devem ser aplicados na superfície dos dentes para prevenção da cárie e nos locais onde a cárie está se desenvolvendo. O verniz se adere à superfície e, portanto, deve-se evitar comer durante 2-4 horas após a aplicação. Além disso, recomenda-se não escovar os dentes durante o resto do dia. O autor sugeriu que o aumento na frequência das aplicações

umenta a eficácia dos vernizes, no entanto, não há evidências científicas que comprovem isso.

Hazelrigg *et al.* (2003) avaliaram três marcas de vernizes fluoretados (Duraphat[®], Durafloor[®] e CavityShield[®]) com os seguintes objetivos: 1) medir o gradiente de concentração do fluoreto em tubos de 10 ml de verniz de flúor com base na posição de repouso do tubo antes da utilização; 2) comparar e contrastar o gradiente de concentração dos fluoretos nos vernizes estudados; 3) comparar seus gradientes com a capacidade de inibir cáries artificiais e 4) determinar se a quantidade de luz fluorescente (QLF) poderia detectar diferentes desenvolvimentos das lesões artificiais quando expostas aos vernizes de flúor. Além disso, analisaram também os efeitos desses vernizes na remineralização de cáries incipientes em esmalte de pré-molares humanos. As LCSS foram produzidas nos dentes por meio de contato direto dente/solução desmineralizadora, por 72 horas. Os pesquisadores observaram que as três marcas foram capazes de promover *in vitro* a remineralização do esmalte da cárie incipiente, após os espécimes passarem por um processo de desmineralização e que QLF foi capaz de detectar as diferenças na desmineralização e remineralização de lesões incipientes.

Castellano & Donly (2004) avaliaram os efeitos da aplicação tópica de verniz fluoretado na remineralização do esmalte dentário, por meio da técnica de MLP. Para isso, LCSS foram produzidas *in vitro* em solução desmineralizadora (2.2 mM Ca⁺², 2.2 mM PO₄⁻³ e 50 µ de ácido acético) na superfície de 15 molares. Cada dente foi seccionado pela metade (mesiodistalmente) e cada metade foi isolada com uma camada de verniz ácido resistente, deixando uma janela de exposição de aproximadamente, 1 x 5 mm de esmalte hígido. As metades foram, então, suspensas em solução desmineralizadora para a produção das LCSS. Em seguida, as metades foram cortadas novamente no sentido oclusogengival e fotografadas pela MLP. Todas as superfícies de uma das metades do dente foram cobertas com verniz de flúor a 5% (Durafloor[®]). A outra metade, apenas o redor das LCSS foram cobertas pelo mesmo verniz. As amostras foram armazenadas separadamente em saliva artificial, durante 30 dias sob constante agitação. Após esse período, as amostras foram removidas da saliva artificial e fotografadas novamente em MLP. Os resultados desse estudo mostraram um percentual significativo de remineralização de 10,8% para o grupo cuja LCSS foi totalmente coberta pelo verniz de flúor e 9,5% para o grupo cujo verniz foi aplicado apenas ao redor da LCSS. Esses dados indicaram que nas duas técnicas

aplicadas houve efeitos remineralizadores das LCSS e que não houve diferenças estatísticas significantes entre os métodos de aplicação.

Weintraub *et al.* (2006) apresentaram evidências da redução de cárie em crianças jovens (abaixo de 5 anos de idade) após aplicação de verniz de flúor (Duraphat[®]). Esse estudo foi realizado em 376 crianças livres de cárie e de baixa renda. Todas as famílias receberam aconselhamento odontológico e as crianças foram randomizadas em diferentes grupos: nenhuma aplicação de verniz, uma aplicação de verniz fluoretado ao ano e duas aplicações de verniz fluoretado ao ano. Foram realizados exames clínicos bucais, sem radiografias, por três vezes: no início do estudo (antes da intervenção), um e dois anos após a intervenção. Duraphat[®] foi aplicado em ambas as arcadas (0,1ml ou uma gota). Os critérios diagnósticos para avaliação da cárie dentária foram baseados no NIDCR (USDHHS, 1991). Em dois anos, 18% dessas crianças acompanhadas ainda manifestaram novas lesões de cárie, após 2 aplicações de verniz fluoretado e 42% manifestaram as lesões sem aplicações de flúor. Isso demonstra, que indivíduos de alto risco à cárie, mesmo tendo contato com qualquer outra fonte de fluoretos, ainda podem apresentar progressão das lesões de cárie.

Carvalho *et al.* (2010) realizaram revisão sistemática com o objetivo de avaliar se existem evidências conclusivas de que a aplicação de verniz fluoretado diminui a incidência de cárie dentária em pré-escolares. Para a pesquisa da literatura, utilizaram-se as bases de dados eletrônicas BBO, LILACS, MEDLINE e Cochrane para identificar ensaios clínicos controlados que tivessem avaliado o desenvolvimento de lesões de cárie cavitadas em crianças até os seis anos de idade. Dois pesquisadores realizaram uma avaliação crítica dos estudos selecionados para inclusão na revisão (tipo de estudo, tipo de população, tipo de intervenção, resultados na incidência de cárie e incidência de lesões cavitadas em dentes decíduos e idioma em que foi conduzido o estudo). Foram encontrados 513 artigos, mas apenas 8 se encaixaram nos critérios de inclusão da revisão sistemática. A maioria desses artigos era de baixa qualidade metodológica e foram heterogêneos em relação à experiência prévia de cárie, tipo de intervenção administrada pelo grupo controle, exposição das crianças à outras fontes de flúor e intervalo de aplicação dos vernizes. A incidência de cárie nos grupos controle e teste variaram de 0,3 a 1,64 e as medidas preventivas variaram de 5 a 63%. Os autores concluíram que os vernizes de flúor podem ser efetivos para diminuir a incidência de cárie dentária em pré-escolares, entretanto mais estudos clínicos randomizados e com qualidades metodológicas melhores são necessárias para

fornecer evidências conclusivas com relação à aplicação tópica de vernizes fluoretados.

Alguns estudos foram conduzidos com o intuito de avaliar os efeitos de diferentes tipos e aplicações de materiais que liberam flúor na remineralização de LCSS. Em 2010, Lee *et al.*, compararam os efeitos de três tratamentos de flúor tópico (solução de NaF a 2%, gel de fluoreto fosfato acidulado 1,23% e verniz de NaF 5%) através da dureza de superfície, da liberação de flúor e fluorescência da LCSS. As lesões foram produzidas artificialmente em dentes bovinos utilizando-se solução desmineralizadora contendo 0,2% de carbopol, 0,1mol de ácido láctico saturada com fosfato de cálcio. Os autores concluíram que todos os materiais utilizados, aplicados de diferentes maneiras (aplicação de solução de NaF a 2% por 4 minutos, aplicação de gel de fluoreto fosfato acidulado a 1,23% também por 4 minutos e aplicação de verniz de flúor por 12 horas), não mostraram diferenças na dureza, entretanto a aplicação do verniz mostrou melhores efeitos em termos de liberação de flúor.

Gugwad *et al.* (2011) avaliaram a eficácia da prevenção de cárie com aplicação intensiva (3 aplicações, uma por semana, uma vez por ano) de verniz de NaF (CavityShield[®]) em molares hígidos de 250 crianças entre 6 e 7 anos, identificadas com alto risco à cárie, e analisaram clínica e radiograficamente a condição dos dentes antes e após um ano da aplicação do verniz. Ao final de um ano, 27,7% do grupo tratado com o verniz, apresentaram reversão da cárie em dentes decíduos com diferenças significativas entre os grupos. Porém para os dentes permanentes, embora também tenha havido diminuição do incremento de cárie, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Os resultados levaram os pesquisadores a concluir que a aplicação intensiva de fluoreto de sódio, tanto em dentes decíduos, como em dentes permanentes, está associada com substancial redução do incremento de cárie nessas crianças. Importante salientar que no estudo conduzido por Gugwad *et al.* (2011), os molares se encontravam hígidos e os pacientes eram de alto risco à cárie.

Stafford (2011) realizou um estudo clínico randomizado em que aplicou verniz fluoretado ou solução salina, no caso do grupo controle, sobre as superfícies dos dentes de 96 voluntários que utilizavam aparelho ortodôntico e possuíam lesões de manchas brancas, detectadas com DIAGNOdent e os aconselhou a não escovarem por 4 horas. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos em três e seis meses após a aplicação do verniz fluoretado. Concluiu-se que a aplicação tópica de verniz mostrou ser um bom método para tratar lesões de manchas

brancas e deve ser tomada como uma medida de rotina, principalmente durante tratamento ortodôntico, para prevenir ou remineralizar as lesões de cárie ativas.

Souchois & Vieira (2012), em experimento *in vitro* realizado na face oclusal de molares permanentes humanos verificaram a dureza longitudinal de LCSS ativas e tratadas uma única vez com cimento de ionômero de vidro (Ketac Molar[®], 3M/ESPE) e verniz fluoretado (Duraphat[®]). As lesões foram produzidas artificialmente utilizando-se solução desmineralizadora (2,0 mM de cálcio, 2,0 mM de fosfato, 0,03 ppm F em 75 mM tampão acetato, pH=4.3) por 42 dias. Em seguida, as LCSS foram submetidas ao desafio cariogênico por 5 dias (ciclagem de pH), tratadas e submetidas novamente ao desafio ácido. Os pesquisadores concluíram que o uso do cimento de ionômero de vidro utilizado sobre a lesão de mancha branca ativa e exposta ao desafio cariogênico tende a expressar algum efeito no aumento dos valores da dureza de superfície do esmalte quando comparado a uma única aplicação de verniz.

Kantovitz *et al.* (2013) em estudo realizado em dentes permanentes humanos, avaliaram o efeito de selantes com e sem flúor no aumento da dureza e adaptação marginal de substratos de esmalte após desafio cariogênico. Foram utilizados blocos de esmalte provenientes da oclusal de terceiros molares inclusos, os quais foram submetidos à formação de LCSS utilizando-se solução sub-saturada de hidroxiapatita, de acordo com o protocolo descrito por Paes-Leme *et al.* (2003). Em seguida, os espécimes foram submetidos à remineralização com uma aplicação de verniz de NaF a 5% (Duraphat[®]) e mantidos em saliva artificial por uma semana (Halzerigg *et al.*, 2003) e após a remineralização foram selados (FluroShield ou Helioseal) ou não, conforme os grupos em estudo. Os pesquisadores concluíram que a adaptação marginal não foi afetada pelo tipo de selante ou condição do substrato (hígido, com LCSS, com LCSS + verniz, LCSS + selante), enquanto que o aumento da dureza foi favorecido pelo selante com flúor.

Em 2013, Maas *et al.* avaliaram *in vitro* a formação de fluoreto de cálcio no esmalte de dentes bovinos e os efeitos anti-cárie de sete vernizes resinosos, dentre eles Duraphat[®], Bifluoride 12[®], Biophat[®], Duofluorid XII[®], Fluorniz[®], Duraflur[®] e Fluorphat[®], após desafio cariogênico. Blocos de esmalte foram submetidos à ciclagem de pH, por 7 dias e foram mantidos em solução remineralizadora por 2 dias. Para as amostras tratadas com os vernizes foram realizadas apenas uma única aplicação. Os resultados mostraram que o efeito anti-cárie dos materiais não teve maior correlação

quando comparados a quantidade de flúor, tipo da resina presente nos materiais e fontes de flúor.

Recentemente, vernizes fluoretados com adição de cálcio e fosfato tem sido desenvolvidos para suplementar a quantidade desses íons na saliva e elevar a remineralização pelo fluoreto (Schemehorn *et al.*, 2011). Assim, novas tecnologias e produtos com propriedades anti-cariogênicas que reverterem o processo de desmineralização já instalado no esmalte dentário estão sendo estudados e avaliados. Um desses sistemas desenvolvidos utiliza o fosfopeptídeo de caseína (CPP), uma proteína presente no leite, utilizada para estabilizar os íons cálcio e fosfato em altas concentrações de nanocomplexos amorfo designados por fosfato de cálcio amorfo (ACP) (Reynolds, 1998). O CPP permite que altas concentrações dos íons cálcio e fosfato sejam estabilizados em soluções de uma forma que esteja biodisponível para a promoção da remineralização (Cochrane *et al.*, 2008). A associação CPP-ACP tem sido incorporada em produtos de higiene bucal, tais como dentifrícios, gomas de mascar e enxaguatórios bucais (Iijima *et al.*, 2004; Tang & Millar, 2010), além de produtos para uso profissional, como vernizes fluoretados. Dessa maneira, a remineralização do esmalte em lesões sub-superficiais utilizando-se esses produtos tem sido avaliada em estudos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* (Cai *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2006; Oshiro *et al.*, 2007).

Oshiro *et al.* (2007) avaliaram o efeito da pasta de CPP-ACP por meio da observação ultra-estrutural da superfície dos dentes bovinos utilizando-se da microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizados blocos de esmalte e dentina obtidos a partir de dentes bovinos. Alguns espécimes foram armazenados em solução tampão de 0,1M de ácido láctico por 10 minutos e colocados em saliva artificial (controle negativo). Os demais espécimes foram armazenados por 10 minutos em solução de pasta diluída de CPP-ACP ou uma pasta placebo sem CPP-ACP por 10 minutos seguidos pela imersão, por mais 10 minutos, em solução desmineralizadora duas vezes ao dia, antes de serem armazenados em saliva artificial. Os resultados observados em microscopia eletrônica de varredura revelaram diferentes estruturas morfológicas devido às várias condições de armazenagem. A pasta com CPP-ACP foi efetiva na prevenção da desmineralização do esmalte e dentina quando comparadas às pastas sem CPP-ACP.

Outro tipo de substância recentemente adicionada em produtos voltados para a prevenção é o Tri-Cálcio Fosfato (TCP), que é uma forma cristalina do fosfato de

cálcio, semelhante ao fosfato de cálcio do esmalte dentário. O TCP é um material que fornece íons cálcio e fosfato biodisponíveis para a estrutura dental, favorecendo remineralização mesmo quando usado em pequenas quantidades. Um estudo recente (Jablonowski *et al.*, 2012) realizado em esmalte de molares comparou a quantidade e a taxa de fluoreto liberado pelos vernizes que continham TCP com vernizes fluoretados tradicionais. Para isso, foram utilizados 25 terceiros molares extraídos por razões alheios a esta pesquisa. Esses dentes foram seccionados em blocos e divididos em 5 grupos (sem aplicação de verniz ou controle negativo; Enamel Pro, Duraphat, Vanish e Vanish XT). A porção de dentina exposta na secção dos dentes foi coberta por verniz ácido-resistente para que apenas o esmalte ficasse exposto. Os vernizes foram aplicados nos dentes seccionados, secos e mantidos no mesmo lugar por 24 horas. Após esse período, as amostras foram armazenadas em saliva artificial. A concentração de fluoreto em partes por milhão foi medida após os primeiros 30 minutos, diariamente para a primeira semana e semanalmente até o nível ficar abaixo da limite de detecção do flúor. Enamel Pro teve a maior liberação de flúor e não houve diferenças significantes entre Duraphat e Vanish. Os autores concluíram que os vernizes que continham o TCP apresentaram uma liberação maior de fluoreto liberado quando comparados aos vernizes tradicionais.

Schemehorn *et al.* (2011) compararam dois tipos de vernizes fluoretados: Omni Vanish White Varnish® (3M Espe Omini) e Enamel Pro ACP Fórmula® (Premier Dental Co.), cada um contendo diferentes fontes de cálcio e fosfato (TCP e ACP) e avaliaram a capacidade de liberação de flúor no esmalte de dentes bovinos após o processo de produção de LCSS por meio de solução desmineralizadora. Seis grupos de 12 espécimes de esmalte de dente bovino foram montados em hastes de acrílico e as superfícies expostas foram polidas. As LCSS foram produzidas na superfície de 3 grupos. O verniz de flúor contendo TCP foi aplicado em um grupo com o esmalte sadio e num segundo grupo foi aplicado o verniz de flúor contendo ACP. O terceiro grupo foi tratado com água. Os espécimes foram imersos em saliva artificial por 24h a 37⁰C. A liberação de fluoreto foi medida por um eletrodo íon-sensitivo. A quantidade de cálcio extraída foi determinada por espectroscopia de absorção atômica. Os resultados desse estudo indicam que as diferenças entre o verniz contendo ACP, TCP e os tratamentos realizados com água foram estatisticamente significantes. Os autores concluíram que o verniz contendo ACP em sua formulação liberou significativamente mais flúor para o

esmalte sadio e também para o esmalte desmineralizado, quando comparado ao verniz contendo em sua formulação o TCP.

Lippert *et al.* (2013) estudaram a eficácia anti-cárie de cinco vernizes fluoretados comercialmente vendidos (CavityShield[®], Enamel Pro[®], MI Varnish[™], Prevident[®] e Vanish[®]) para determinar a capacidade de remineralização e liberação de flúor em lesões de cárie incipientes, quando aplicadas diretamente ou nas proximidades da lesão. LCSS foram produzidas em 80 dentes bovinos por meio de solução desmineralizadora por 24 horas. Os espécimes foram distribuídos em 5 grupos de acordo com os vernizes. Os vernizes fluoretados foram aplicados em 8 espécimes por grupo de verniz (apenas uma aplicação direta dos vernizes nos espécimes de acordo com as instruções dos fabricantes). Os 8 espécimes restantes, não receberam verniz de flúor, mas depois foram expostos ao flúor liberado dos espécimes que foram tratados com aplicação do verniz (aplicação indireta). Os espécimes foram pareados e colocados em recipientes separados contendo saliva artificial e armazenados em estufa a 37⁰C por 27 horas. Em seguida, os vernizes de flúor foram cuidadosamente removidos usando clorofórmio e novamente imersos em solução de saliva artificial por 67 horas a 37⁰C. A incorporação de flúor no esmalte foi determinada pela técnica do ataque ácido. O presente estudo *in vitro* demonstrou que os vernizes avaliados foram capazes de remineralizar e liberar flúor para a prevenção de cáries, porém em diferentes proporções. Quando comparados pela dureza e aplicação nas lesões, a eficácia dos vernizes de flúor foi em ordem decrescente: Prevident[®], Vanish[®], CavityShield[®], Enamel Pro[®], MI Varnish[™]. Resultados diferentes foram obtidos para aplicação nas proximidades da lesão: MI Varnish[™], Enamel Pro[®], Prevident[®], CavityShield[®], Vanish[™]. Entretanto, diferenças consideráveis foram encontradas entre os vernizes quando aplicados sobre ou nas proximidades das lesões. O verniz que mais liberou flúor na aplicação direta sobre a lesão foi Prevident[®], enquanto que na aplicação indireta a maior liberação de flúor ocorreu com o verniz Enamel Pro[®].

ALAmoudi *et al.* (2013) compararam *in vitro* o efeito da ciclagem de pH na microdureza do esmalte de incisivos decíduos tratados com vernizes fluoretados convencionais (NaF a 5%), marrons e brancos, e vernizes de flúor contendo TCP, após desmineralização. Os dentes foram submetidos a produção de lesões artificiais de cárie por ciclagem de pH durante dez dias, mantendo-os em solução desmineralizante por três horas e em solução remineralizante por 20 horas. Após esses dez dias de ciclagem de pH, a dureza de superfície das amostras foi medida. A dureza do verniz

fluoretado com TCP foi maior que os vernizes sem formulação modificada. Os resultados desse estudo sugerem que o uso de aditivos como o TCP em vernizes fluoretados melhorou consideravelmente a capacidade de proteção dos dentes decíduos.

Estudo realizado por Karlinsey *et al.* (2014) analisaram, em dentes bovinos, *in vitro*, o efeito da remineralização sem meio de contato direto de um verniz comercial de NaF a 5% (Vanish[®]) acrescido de TCP nas lesões de manchas brancas por meio das técnicas da microdureza longitudinal e microscopia eletrônica de varredura (SEM). Núcleos de esmalte de 3 mm de diâmetro foram extraídos de dentes bovinos montados em hastes de acrílico e desmineralizados para produção de LCSS. Os espécimes foram avaliados pela dureza de superfície e divididos em dois grupos (grupo controle: água e grupo de verniz de fluoreto de sódio a 5% com TCP aplicado sem contato direto nas LCSS na qual uma dose única de 0,5ml foi aplicada nas hastes de acrílico ao invés da aplicação direta sobre as LCSS). Os grupos passaram por um regime de ciclagem por três dias consistindo de duas rodadas de tratamentos de uma hora e uma hora imersos estaticamente em solução desmineralizadora. Entre esses eventos, as LCSS foram imersas em saliva artificial. A remineralização foi avaliada por meio da microdureza longitudinal e microscopia eletrônica de varredura. O estudo revelou que a aplicação sem contato desse verniz reduziu as lesões de manchas brancas e produziu significativa resistência ácida na remineralização das lesões de mancha branca.

A maioria desses estudos citados acima foi realizada em dentes permanentes (Halzerigg *et al.*, 2003; Castellano & Donly, 2004; Gugwad *et al.*, 2004; Stafford, 2011; Souchois & Vieira, 2012; ALAmoudi *et al.*, 2013, Kantovitz *et al.*, 2013). Por isso, é importante a realização de pesquisas, destacando-se o uso de materiais que apresentam fluoretos em sua formulação ou com formulações modificadas e os efeitos remineralizadores em lesões de cárie sub-superficiais de dentes decíduos.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Proposição Geral

Avaliar quantitativamente e qualitativamente a formação e tratamento *in vitro* de LCSS em dentes decíduos.

3.2 Proposições Específicas

3.2.1 Avaliar quantitativamente e qualitativamente dois tempos de formação de LCSS em dentes decíduos;

3.2.2 Avaliar o efeito remineralizador de três vernizes de fluoreto de sódio a 5%, sendo dois deles com formulação modificada (RECALDENT™ - CPP-ACP e Tri-Cálcio Fosfato – TCP), em LCSS em dentes decíduos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (protocolo 101/2013) (Anexo 1).

De acordo com os objetivos específicos propostos, esta pesquisa foi dividida em dois estudos.

4.1 Delineamento Experimental – Estudo 1

Para alcançar o objetivo específico 3.2.1, ou seja, avaliar quantitativamente e qualitativamente 2 tempos de formação de LCSS em dentes decíduos, foram utilizados 20 dentes, sendo o fator em estudo os tempos para a formação da LCSS (8 e 16 horas). Para esse objetivo específico a variável de resposta foi profundidade da LCSS formada artificialmente, avaliada por meio da MLP.

4.2 Seleção dos dentes

Para a formação das LCSS de cárie de esmalte foram utilizadas coroas de incisivos centrais e laterais decíduos (Figura 1). Os dentes, após extração, foram armazenados em solução de Timol a 0,1% (Tagliaferro *et al.*, 2007) e foram avaliados visualmente com auxílio de lupa estereoscópica em aumento de 20x (Leica MZ6, Alemanha). Foram selecionados somente os dentes que se enquadravam nos critérios de inclusão, ou seja, aqueles sem lesões de cárie, defeitos de esmalte causados pela extração dentária e/ou deformidades de formação do esmalte (Figura 2).

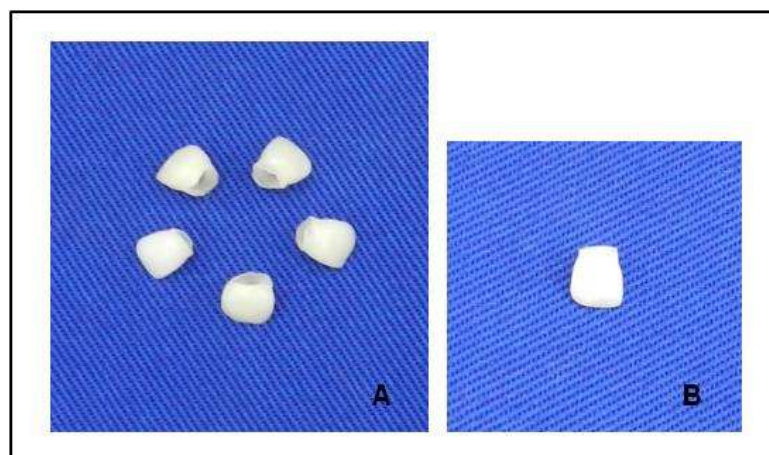


Figura 1. (A) Coroas de dentes decíduos humanos obtidos e selecionados; (B) Vista aproximada de um dente anterior decíduo selecionado.

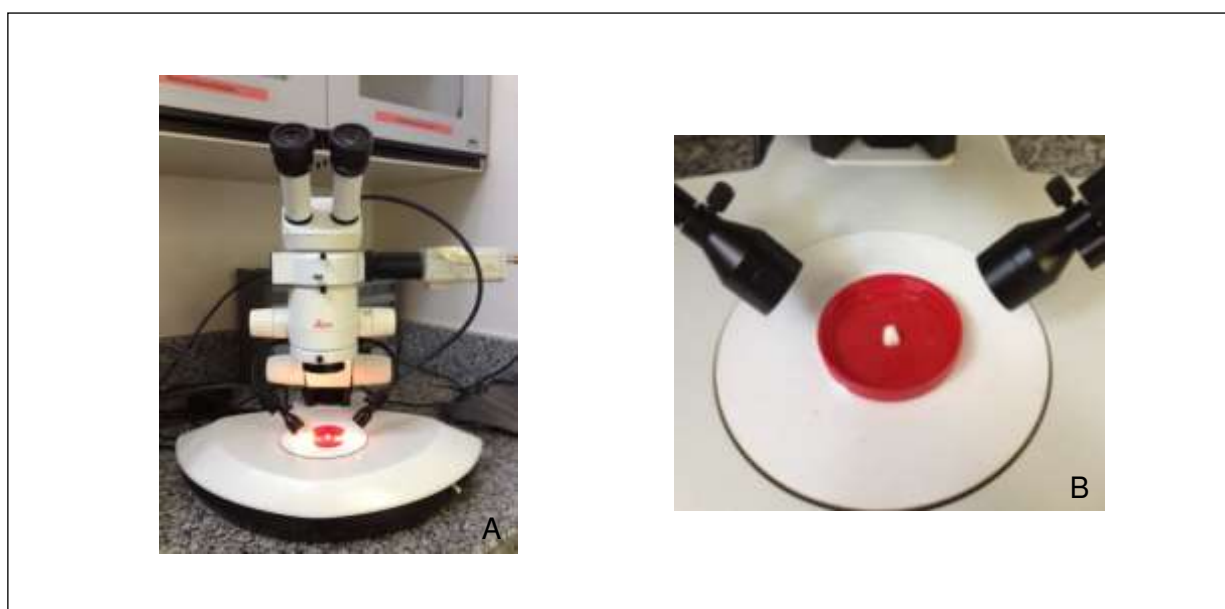


Figura 2. (A) Dente decíduo anterior sendo avaliado pela lupa estereoscópica em aumento de 20x (Leica MZ6, Alemanha); (B) Vista aproximada de um dente anterior decíduo sendo avaliado.

4.3 Preparo dos espécimes

Blocos de esmalte (5x5mm) de dentes decíduos foram fixados em cera pegajosa e em *stubs* de resina acrílica, planificados e polidos, com lixas de granulação 600 e 1200, por 30 segundos cada uma delas em 240 rpm e disco de feltro com pasta diamantada de 1 μm por 1 minuto na mesma velocidade (Figura 3). A dureza de superfície de cada espécime foi verificada por meio de teste de dureza *Knoop* (Microdurômetro HMV – 2 Shimadzu, Japão) no intuito de padronizar a amostra utilizada (Kantovitz *et al.*, 2013). Para esta análise uma carga estática de 50g foi aplicada por 5s em pontos distintos, com distâncias padronizadas. Uma fileira de 3 impressões foi executada com intervalos de aproximadamente 100 μm entre elas (Figura 4). Para a seleção dos blocos de esmalte e subsequente distribuição nos grupos experimentais foi utilizada a seguinte metodologia e sequência: (1) Obtenção da Média e o Desvio Padrão das 3 impressões realizadas em cada bloco de esmalte; (2) Obtenção da Média e o Desvio Padrão geral da microdureza de superfície do esmalte; (3) Exclusão dos blocos de esmalte com valores de média 10% maior e menor que o valor da média geral.

Em seguida, os blocos de esmalte impermeabilizados com duas camadas de verniz ácido resistente deixando uma janela de exposição de 4x4 mm na face planificada (Figura 5).

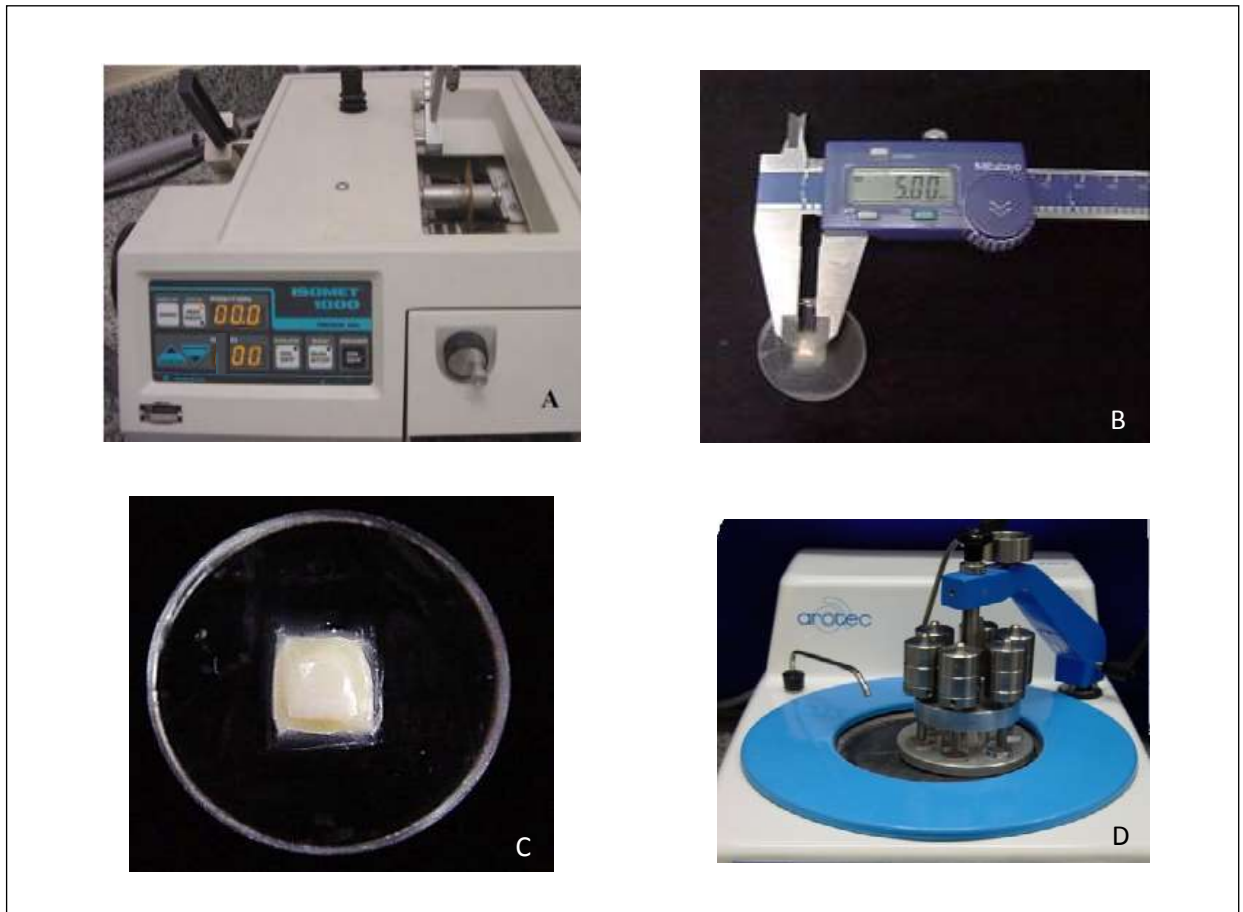


Figura 3. Fotografias ilustrativas da secção e polimento dos blocos de esmalte: (A) Cortadeira Isomet 1000, (B) e (C) blocos de esmalte com 5 x 5 mm e (D) politriz Arotec para polimento e planificação dos blocos de esmalte.

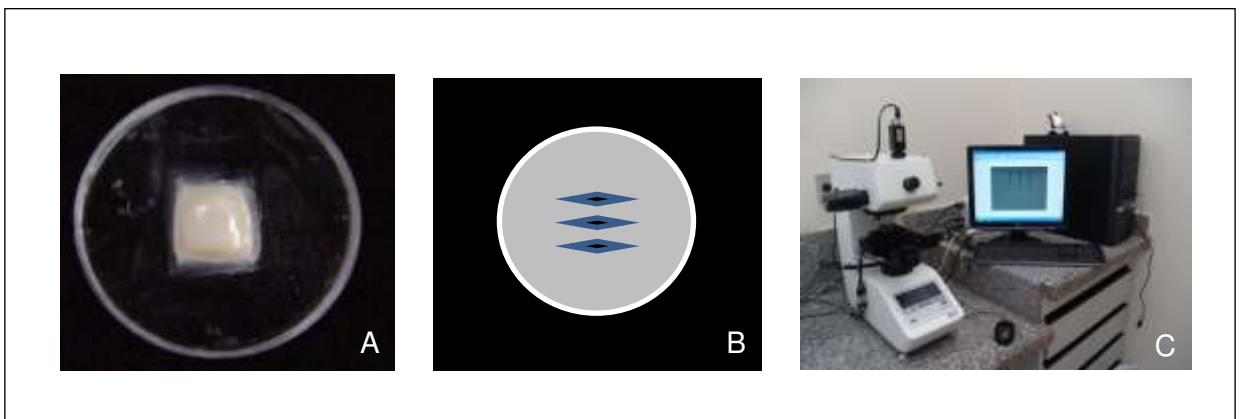


Figura 4. Fotografias ilustrativas do teste de microdureza *Knoop*: (A) Bloco de esmalte 5 x 5 mm polido e planificado, (B) Ilustração das impressões que foram realizadas nos blocos de esmalte e (C) Microdurômetro (Future – Tech Corp., Tokyo, Japan) com penetrador do tipo *Knoop*.

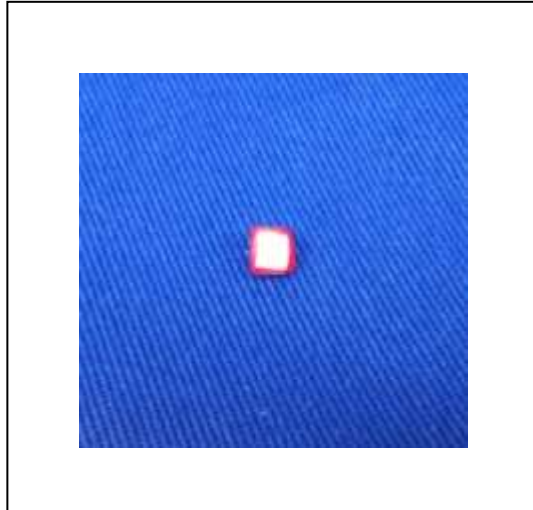


Figura 5. Bloco de dente decíduo com janela de exposição 4x4 mm produzida com camada de verniz ácido resistente.

4.4 Formação da LCSS

Foi preparada a solução desmineralizadora obtida a partir dos reagentes: solução de ácido acético a 1M, hidróxido de sódio p.a., pó de esmalte de dentes decíduos, timol e água mili-Q. Após o preparo, a solução foi mantida em estufa 37⁰C sob agitação constante por 96 horas. Posteriormente, a solução foi filtrada e o pH ajustado em 5,0 (Paes-Leme *et al.*, 2003; Kantovitz *et al.*, 2013) (Figuras 6 e 7).

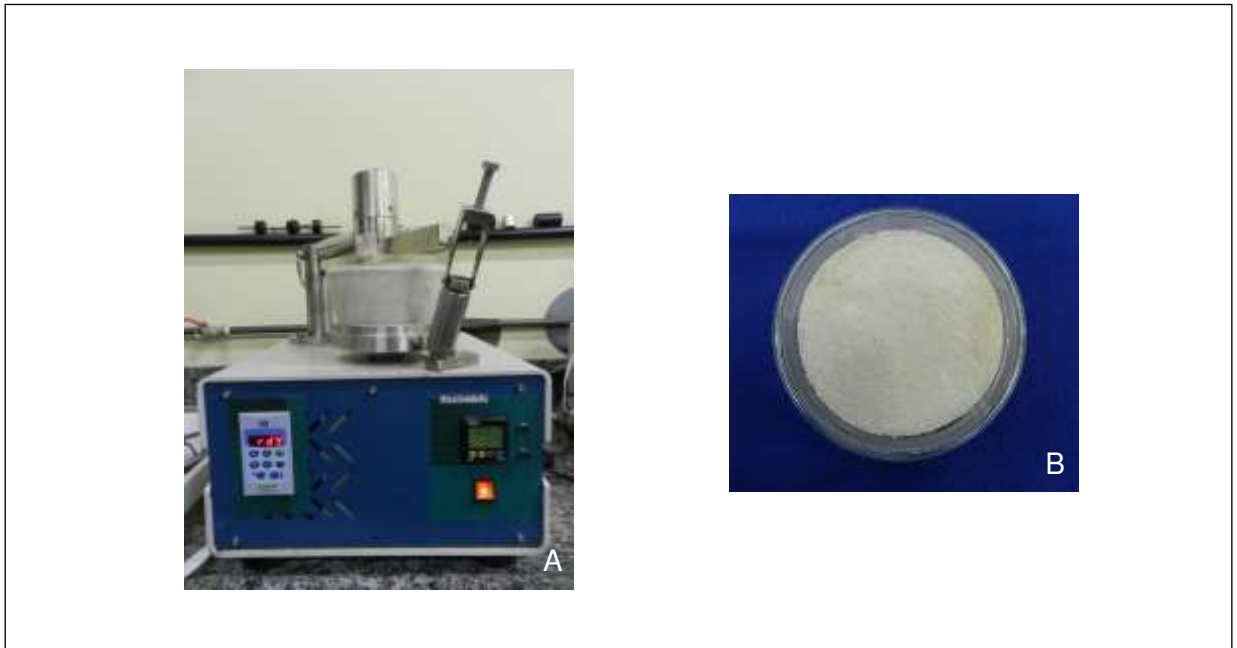


Figura 6. Preparo de pó de esmalte de dentes decíduos para a solução de cárie. (A) Moinho para moagem dos dentes decíduos; (B) Pó de esmalte de dentes decíduos após a moagem.



Figura 7. Preparo da solução desmineralizadora. (A) Separação dos líquidos com diferentes densidades; (B) Ajuste do pH da solução

Os espécimes selecionados foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (n=10), de acordo com os tempos de formação da LCSS na superfície de esmalte sadio (8 e 16 horas). As LCSS foram produzidas emergindo cada bloco de esmalte em

solução (proporção de 2 ml/mm²), totalizando 32 ml de solução para cada bloco de esmalte (Figura 8) e mantidos em estufa à 37⁰C. A presença da LCSS foi avaliada por meio de MLP.

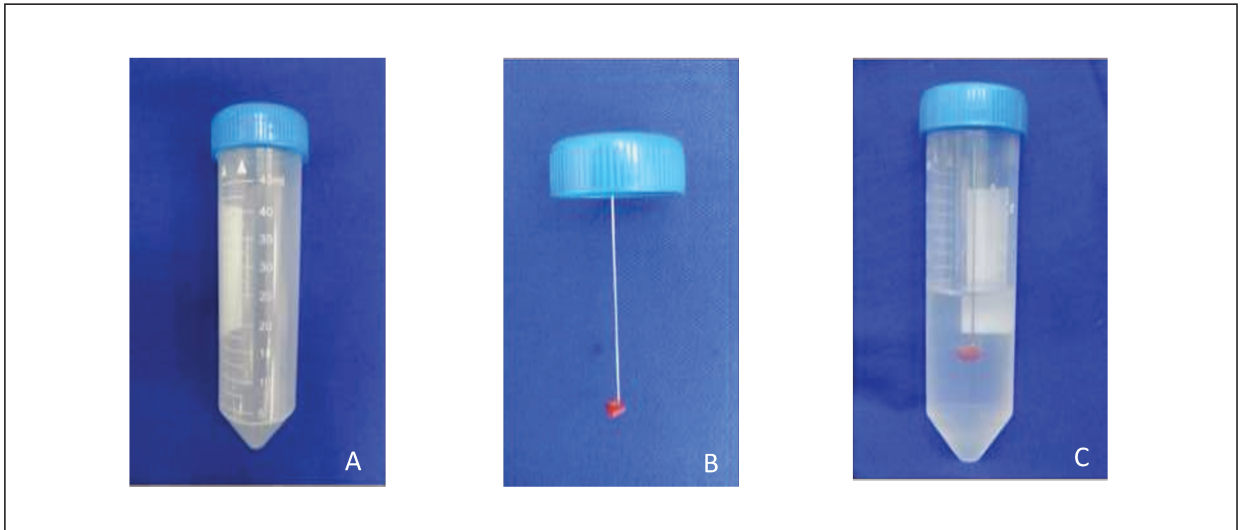


Figura 8. (A) Tubo Falcon de 45ml; (B) Espécime acoplado ao fio ortodôntico número 9; (C) Tubo Falcon com 32 ml de solução de cárie e espécime em imersão.

Os espécimes foram preparados para a leitura em MLP, da seguinte maneira: os mesmos foram embutidos em placas de acrílico com cera pegajosa e seccionados com auxílio de disco de corte em cortadeira metalográfica. Em seguida, as seções foram lixadas com lixas de carvão de silício acopladas em politriz mecânica sob constante irrigação em água, para maior redução da espessura, seguidos de desgaste manual até a espessura final de $0,10 \pm 0,02$ mm (Grossman & Matejka, 1999) conferindo-se com paquímetro digital (Figura 9). Após esse preparo, os espécimes prontos para avaliação em MLP foram dispostos sobre lâminas de vidro para visualização em microscópio com câmera acoplada.

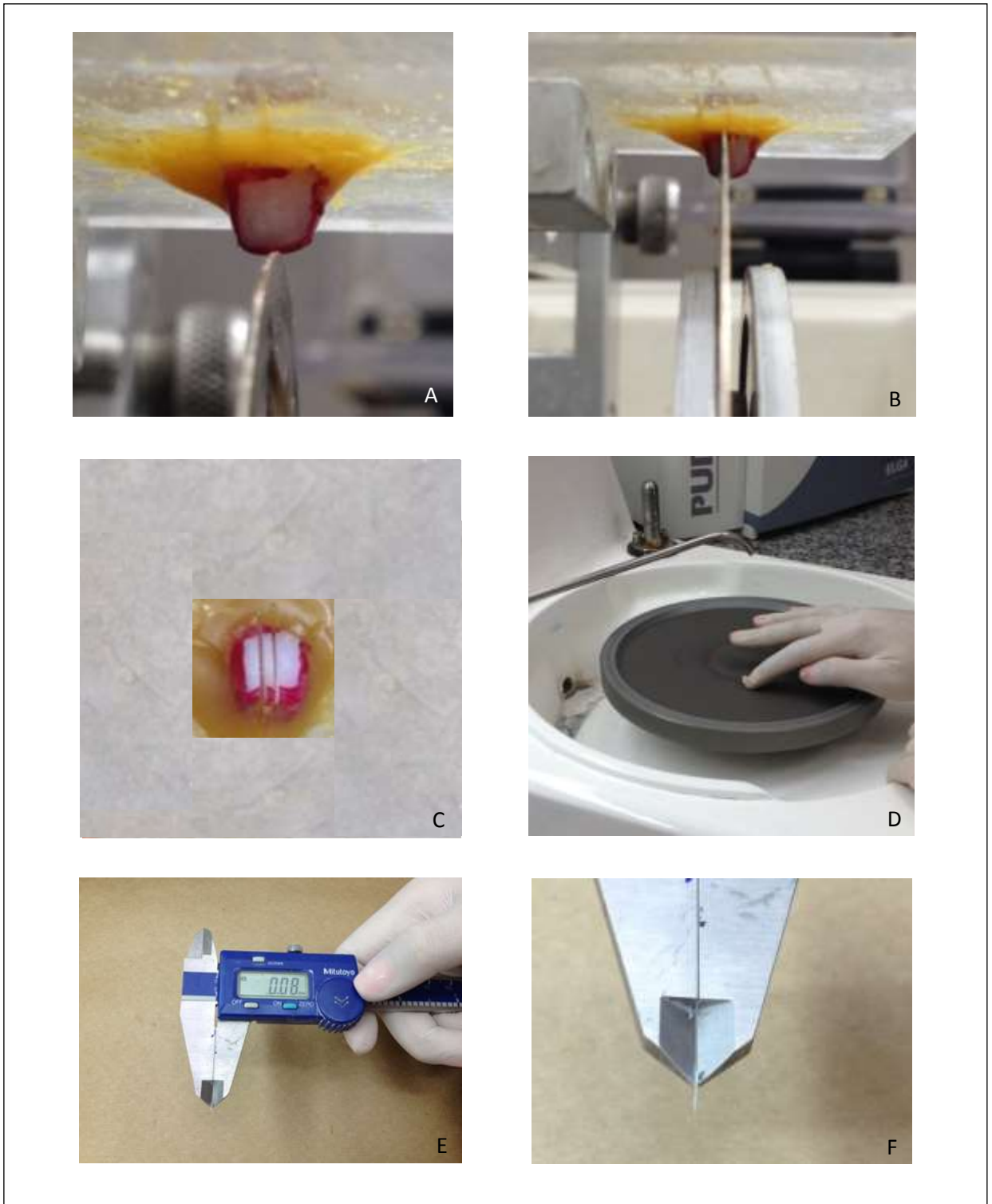


Figura 9. (A) e (B) Foto ilustrativa da secção das amostras fixadas em cera pegajosa; (C) Amostra seccionada no sentido cérvico/incisal próximo à porção central de dente; (D) Desgaste manual; (E) e (F) Espécimes prontos com espessura aproximada de 100 μ m para leitura em MLP.

As imagens foram captadas por lentes em aumento de 5x e foram transferidas para um monitor de computador, por meio do *software* LAS (Leica Application Suite, version 2.8.1, Leica microsystems, Alemanha). Para a análise quantitativa, utilizou-se uma ferramenta de distância linear do próprio *software* (Figura 10) e foram realizadas 3 medidas em cada profundidade da LCSS, no centro da lesão, mantendo-se uma distância de 200 μ m entre elas, por três vezes em cada posição, e a média dos dados obtidos foi calculada. Para a análise qualitativa, as imagens obtidas nos diferentes tempos de formação da lesão, foram classificadas com escores definidos em estudo piloto de acordo com uma escala ordinal, com respeito à homogeneidade da profundidade da LCSS, ou seja: 0 – ausência de homogeneidade e 1 – homogeneidade. Essa classificação para homogeneidade pôde ser observada de acordo as variações em profundidade de cada LCSS e da continuidade da lesão, ou seja, quanto mais contínuas e com menores variações em profundidade, mais homogêneas.



Figura 10. (A) Microscópio de Luz Polarizada e software LAS, (B) Espécime em lamínula para análise em MLP.

Para a determinação do nível de coincidência intra-examinador para os dados quantitativos, as leituras foram realizadas por um único examinador, cego e calibrado, em 20% da amostra, por duas vezes consecutivas com intervalo de uma semana entre as avaliações. Os resultados foram submetidos aos testes de correlação de Spermán com nível de significância de 5%. O padrão ouro utilizado para esse

estudo foi um pesquisador previamente calibrado e experiente nessa metodologia de análise.

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade, Shapiro-Wilk e uma vez que não obedeceram à distribuição normal dos dados, estes foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Os dados qualitativos foram submetidos ao teste t, ambos com significância de 5%. Os dados foram analisados por meio do programa BioEstat 5.0 (Mamirauá, Belém, PA, Brasil).

4.5 Delineamento Experimental – Estudo 2

Para alcançar o objetivo específico 3.2.2, ou seja, avaliar o efeito de três vernizes de fluoreto de sódio a 5% em LCSS, utilizou-se 36 dentes decíduos, sendo o fator em estudo os diferentes vernizes fluoretados e para análise em EDS, as regiões superficial e sub-superficial das lesões. Para esses objetivos específicos, as variáveis de resposta foram: (1) profundidade de perda mineral, ou seja, a profundidade da LCSS avaliada por meio da MLP; (2) porcentagem mineral, avaliada indiretamente por meio do teste de dureza *Knoop*; (3) quantidade de cálcio e fósforo, avaliada por meio da EDS.

4.5.1 Seleção dos dentes e preparo dos espécimes

A seleção dos dentes para a realização do Estudo 2 foi realizada da mesma forma descrita nos itens 4.2. e 4.3.

4.5.2 Formação das lesões de cárie sub-superficiais (LCSS)

De acordo com os resultados obtidos no Estudo 1, os quais estão descritos no item Resultados, optou-se pela utilização do tempo de 16 horas para a formação das LCSS. Os procedimentos para a formação das lesões foram descritos anteriormente no item 4.4.

4.5.3 Tratamento das LCSS

Para a realização do tratamento das LCSS previamente formadas foram utilizados 36 dentes decíduos divididos, aleatoriamente em 4 grupos (n=9): 1) Água deionizada (controle negativo); 2) Duraphat[®] - verniz de fluoreto de sódio a 5% - Colgate (controle positivo); 3) MI Varnish[™] - verniz de fluoreto de sódio a 5% com

RECALDENT™ (CPP-ACP) - GC America Inc; e 4) Vanish™ - verniz de fluoreto de sódio a 5% com Tri-Cálcio Fosfato (TCP) - 3M ESPE.

Os tratamentos foram realizados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Para todos, não é necessária profilaxia, apenas limpeza superficial das janelas de esmalte expostas. Os espécimes do grupo controle negativo foram tratados com água deionizada e armazenados separadamente em 20 ml de saliva artificial (1.5 mM de cálcio, 0,9 mM de fosfato, 150 mM de KCl em 0,1 M de tampão Tris e 0,05 ug F/ml, pH = 7), na proporção de 1,25 ml por mm², a 37⁰C por 7 dias (Featherstone *et al.*, 1986; Kantovitz *et al.*, 2013). Após esse período, os espécimes foram removidos da saliva e lavados com água deionizada. Para os grupos tratados com os vernizes Duraphat® (controle positivo), MI Varnish™ e Vanish™ uma fina e uniforme camada de verniz foi aplicada sobre a LCSS com o auxílio de *microbrush*. As janelas de esmalte expostas foram recobertas totalmente pelo verniz e os espécimes foram armazenados separadamente em 20 ml de saliva artificial por 7 dias a 37⁰C (Kantovitz *et al.*, 2013) (Figura 11). Após esse período, os espécimes foram retirados da saliva e lavados com água deionizada.



Figura 11. (A) Verniz fluoretado MI Vanish®; (B) Camada de verniz aplicada sobre a lesão sub-superficial, com o auxílio de *microbrush*; (C) Espécimes armazenados em saliva artificial; (D) Estufa para armazenamento dos espécimes.

Após o período de tratamento, os espécimes foram fixados em blocos de acrílico e seccionados ao meio longitudinalmente no sentido vestibulo-lingual, utilizando-se disco diamantado (Buehler Lake Bluff, IL, USA), montado em cortadeira metalográfica (Isomet 1000). Para cada espécime, uma metade, selecionada aleatoriamente foi submetida à análise em MLP e a outra foi submetida às análises de dureza *Knoop* e EDS.

4.5.4 Avaliações dos tratamentos das LCSS

4.5.4.1 Análise da profundidade das LCSS por meio da Microscopia por Luz Polarizada (MLP)

As LCSS foram avaliadas por meio de MLP, conforme técnica já descrita.

Os dados obtidos a partir da mensuração da profundidade das LCSS foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e como os dados não apresentaram distribuição normal, estes foram transformados e submetidos à ANOVA, com nível de significância de 5%.

4.5.4.2 Análise da perda mineral por meio da dureza *Knoop*

Para cada espécime, uma das metades selecionadas aleatoriamente, foi embutida na embutidora PRE 30 Mi (Arotec, São Paulo, Brasil) (Figura 12). Em seguida, foram submetidas ao acabamento e polimento realizados em politriz elétrica rotativa (Metaserv 2000) em alta velocidade. Para o polimento, lixas abrasivas de óxido de alumínio refrigeradas a água e de granulação 400, 600, 1200 foram utilizadas por 20, 30 segundos e 1 minuto, respectivamente, sendo finalizado com discos de feltro e pastas diamantadas (Buehler) de 6 μm e 3 μm durante 20 segundos cada, e suspensão de diamante de 1 μm (Buehler) por 1 minuto. Entre a troca das lixas todos os espécimes foram submetidos a banho de ultra-som (Unique) com água destilada e deionizada, durante 3 minutos e entre as pastas/suspensão com detergente líquido comum diluído em água, durante 5 minutos. Em seguida foram lavados abundantemente em água destilada e deionizada corrente e armazenados em ambiente úmido, fechado e sob refrigeração (Figura 13).



Figura 12. (A) Espécimes sendo embutidas para leitura da dureza *Knoop*; (B) Embutidora PRE 30 Mi (Arotec, São Paulo, Brasil).

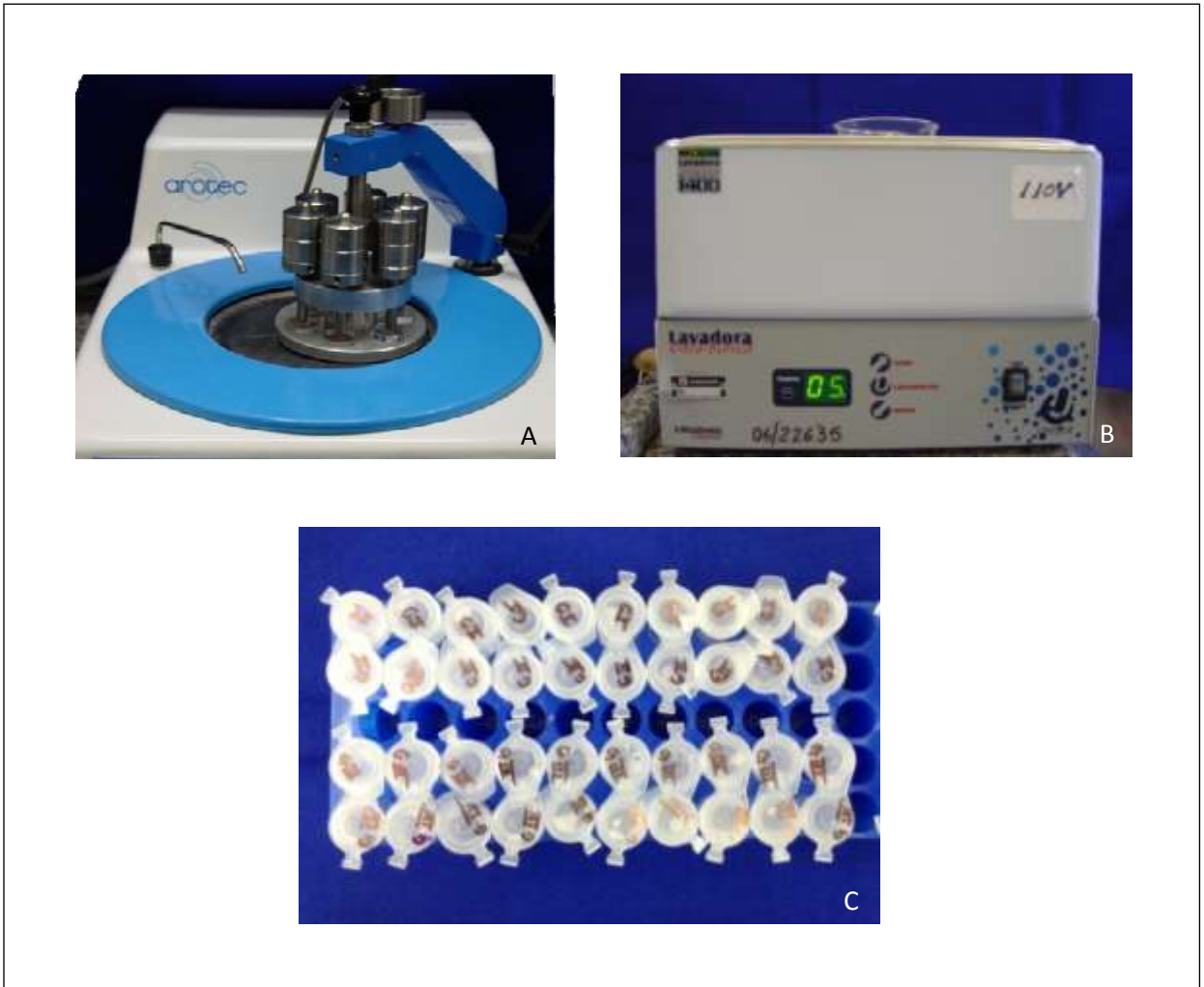


Figura 13. (A) Politriz elétrica rotativa (Arotec, São Paulo, Brasil); (B) Espécimes submetidos à sonicação (ultra-som Unique) com água destilada e deionizada; (C) Espécimes armazenados em ambiente úmido e sob refrigeração.

Para verificar os efeitos dos tratamentos sobre as LCSS, todos os espécimes foram submetidos ao teste de dureza em corte longitudinal, utilizando-se do microdurômetro (HMV – 2 Shimadzu, Japão) com penetrador do tipo *Knoop*. As impressões foram realizadas mantendo o longo eixo do diamante do penetrador paralelo à superfície externa do esmalte com uma carga estática de 25 gramas, durante 5 segundos, em pontos distintos, porém com distâncias padronizadas. Três fileiras de 12 impressões foram executadas a partir de 10 μm da superfície do esmalte, seguindo até a profundidade de 180 μm , com intervalos de 10 μm entre as 5 primeiras impressões e de 20 μm entre as restantes. As distâncias entre as fileiras foram de 100 μm (Figura 14). Em seguida, foi obtida a média dos valores de microdureza (KHN - *Knoop Hardness Number*) para cada profundidade e calculou-se a variação do KHN

(ΔS), que é a diferença entre as áreas cariadas e híginas no mesmo espécime (Souza *et al.*, 2009; Kantovitz *et al.*, 2013). Os dados relativos aos valores de ΔS foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, como os dados apresentaram distribuição normal, estes foram submetidos à ANOVA e o teste de Tukey foi aplicado para a comparação entre os grupos, ao nível de significância de 5%.

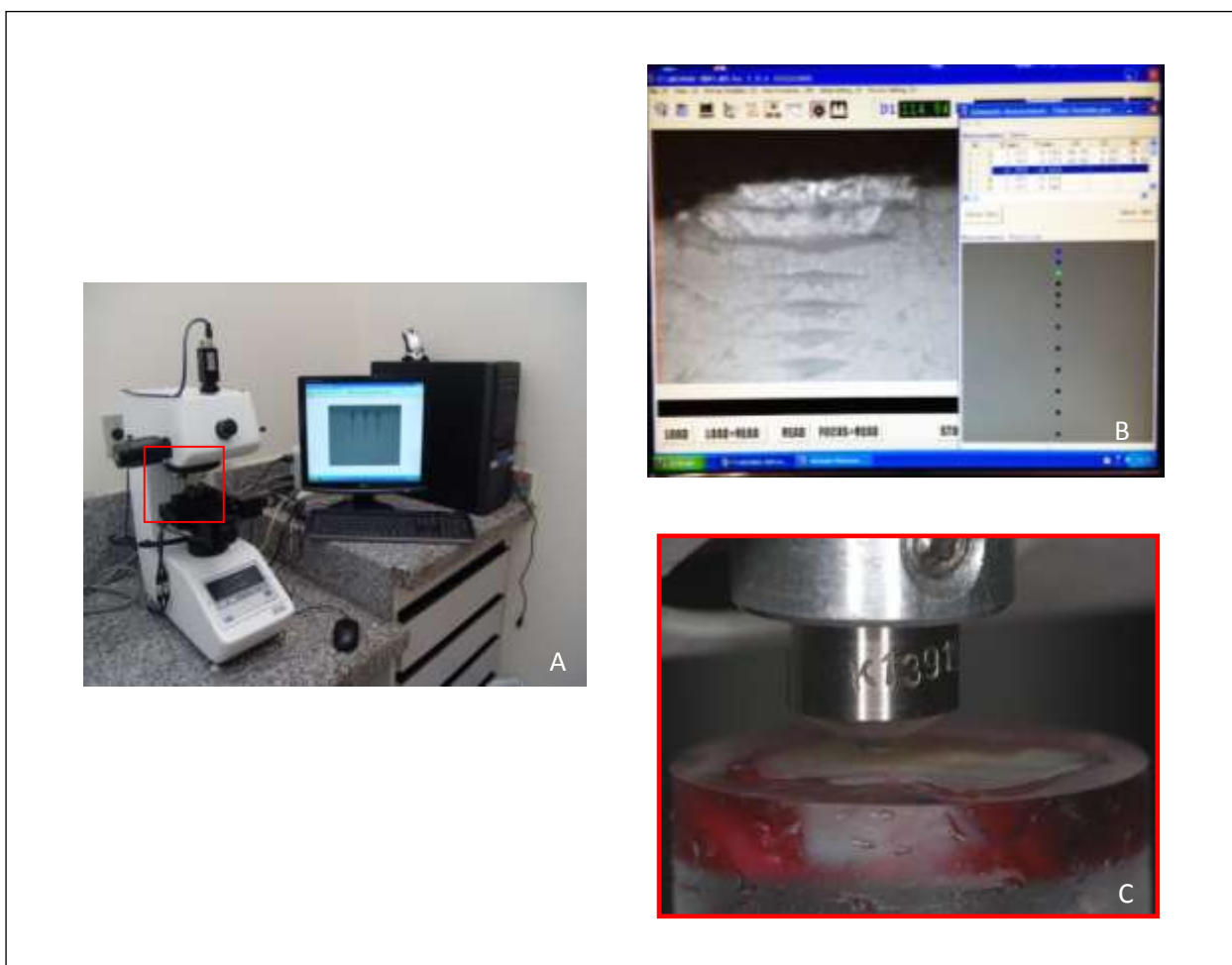


Figura 14. (A) e (C) Microdurômetro (HMV – 2 Shimadzu, Japão) com penetrador do tipo *Knoop*; (B) Impressões realizadas nos espécimes.

4.5.4.3 Análise do conteúdo de Cálcio e Fósforo por meio da Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Para a análise por meio da EDS, os espécimes tanto do grupo controle, quanto os tratados foram fixados em *stubs* de resina utilizando-se fita de carbono dupla-face, foram cobertos por uma fina camada de carbono (Denton Vacuum) e observados em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, JSM – 5600 LV, Scanning

Electron Microscope, Tokyo, Japan), em aumento de 50x. Os elementos químicos (Ca e P) das LCSS foram identificados e quantificados por meio do *software* disponível no Microscópio Eletrônico de Varredura. Para isso, a leitura foi realizada em duas regiões distintas, sendo uma superficial e uma sub-superficial. Dentro de cada uma dessas regiões, foram realizados dois espectros em três diferentes áreas (1,5 x 1,5 mm), totalizando 6 espectros (Figura 15).

Os dados obtidos a partir da análise semi-quantitativa realizada por meio da EDS foram submetidos à ANOVA dois fatores (área de análise x material) e o teste Tukey foi aplicado para a comparação entre os grupos, com nível de significância de 5%.

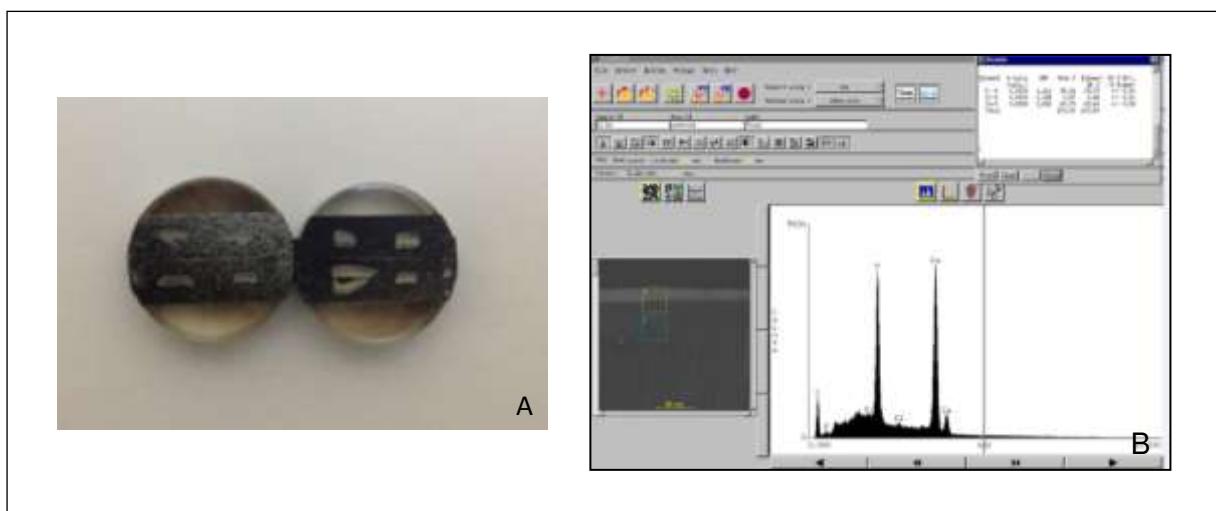


Figura 15. (A) Espécimes fixados em *stubs* de resina após fina camada de carbono; (B) Espectros de 1,5 x 1,5 mm e os elementos químicos (Ca e P) identificados e quantificados por meio do *software* disponível no Microscópio Eletrônico de Varredura.

5 RESULTADOS

5.1 Formação da LCSS de acordo com os tempos 8 e 16 horas

O nível de coincidência intra-examinador avaliado por meio do teste de correlação de Spermán foi de $r=0,8143$ ($p=0,0002$) para as amostras que ficaram 8 horas em solução de cárie e de $r=0,9321$ ($p<0,001$) para as amostras que ficaram 16 horas, o que resultou num bom nível de concordância entre as duas avaliações realizadas.

De acordo com a análise estatística realizada para as profundidades obtidas nos dois tempos de estudo, não houve diferença entre 8 e 16 horas ($p=0,6272$). Para os resultados qualitativos, pode-se observar que o tempo de 8 horas promoveu a formação de 50% de LCSS consideradas homogêneas (Figuras 16 e 17), enquanto que para 16 horas 100% das lesões se apresentaram homogêneas (Figura 18). Ainda, pode-se observar diferença significativa entre os tempos ($p=0,0149$) para a profundidade da lesão (Tabela1).

Tabela 1. Médias, desvios padrão da profundidade (μm) e homogeneidade encontradas para as lesões de cárie sub-superficiais formadas nos tempos 8 e 16 horas.

| PROFUNDIDADE (μm) | TEMPOS | |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| | 8 horas | 16 horas |
| | 75,61 \pm 41,46 | 104,53 \pm 90,00 |
| HOMOGENEIDADE | 50%* | 100% |

* Diferença significativa ($p=0,0149$).

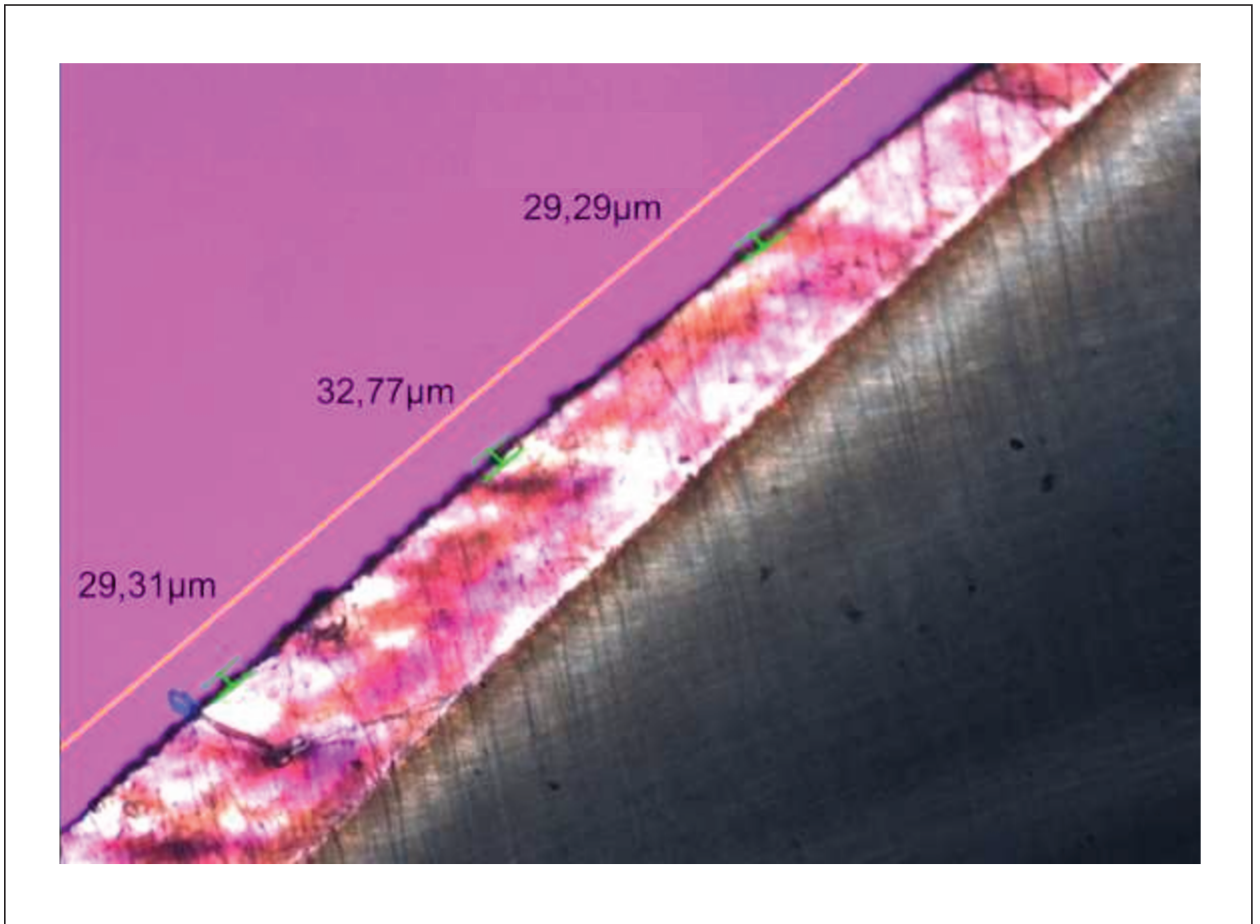


Figura 16. Imagem representativa e ilustrativa de lesão homogênea obtida por meio da MLP (5X) e respectivas medidas da profundidade da lesão de cárie formada no tempo de 8 horas.

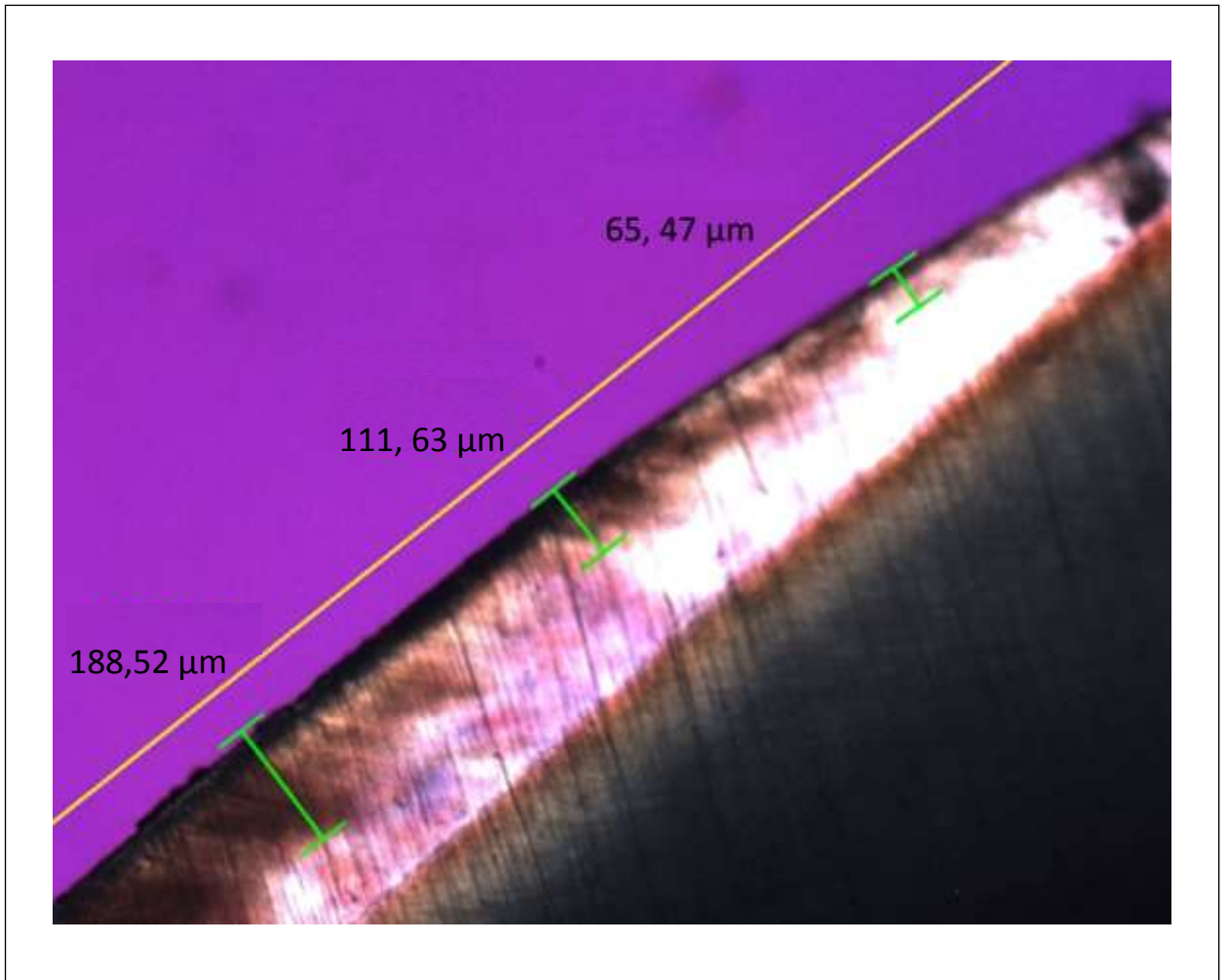


Figura 17. Imagem representativa e ilustrativa de lesão não homogênea obtida por meio da MLP (5X) e respectivas medidas da profundidade da lesão de cárie formada no tempo de 8 horas.

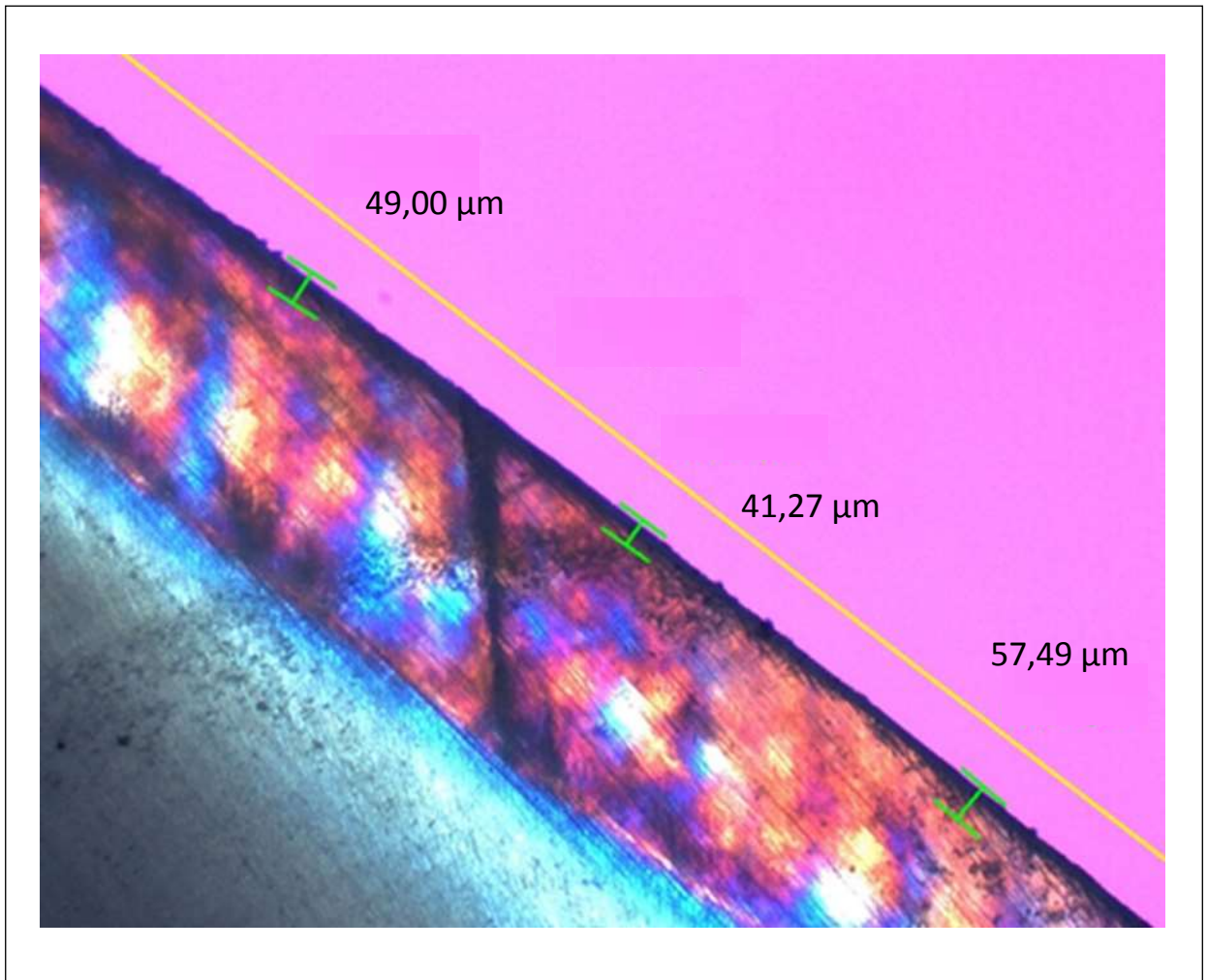


Figura 18. Imagem representativa e ilustrativa obtida por meio da MLP (5X) e respectivas medidas da profundidade da lesão de cárie formada no tempo de 16 horas. Observar homogeneidade da lesão.

5.2 Análise da profundidade das LCSS por meio da Microscopia por Luz Polarizada (MLP)

De acordo com a análise estatística realizada, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à média das profundidades das LCSS analisadas em MLP ($p > 0,05$) (Figura 19).

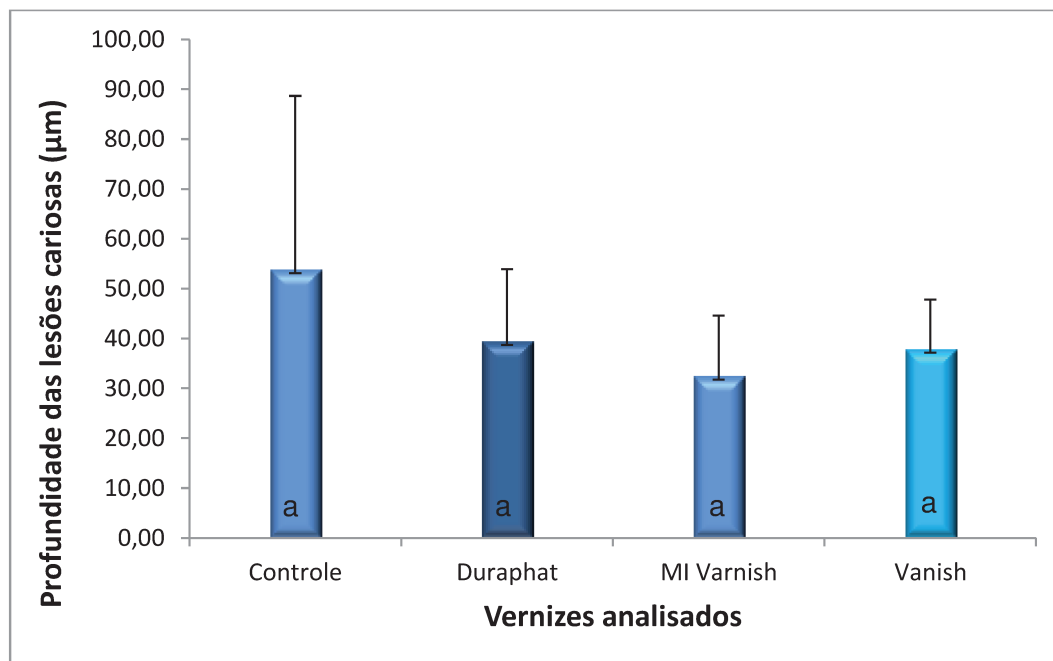


Figura 19. Valores da média e desvio padrão das medidas realizadas pela MLP no diferentes vernizes analisados

As imagens representativas obtidas em MLP demonstraram homogeneidade em relação à profundidade das LCSS produzidas *in vitro* e tratadas de acordo com os grupos experimentais descritos anteriormente. Além disso, observou-se numericamente que os grupos tratados com os diferentes vernizes fluoretados apresentaram valores médios semelhantes ($39,73 \pm 14,20 \mu\text{m}$; $32,77 \pm 11,86 \mu\text{m}$; $38,13 \pm 9,17 \mu\text{m}$, para Duraphat[®], MI Varnish[™] e Vanish[™], respectivamente), diferente do grupo controle ($54,10 \pm 34,56 \mu\text{m}$) (Figuras 20 a 23).

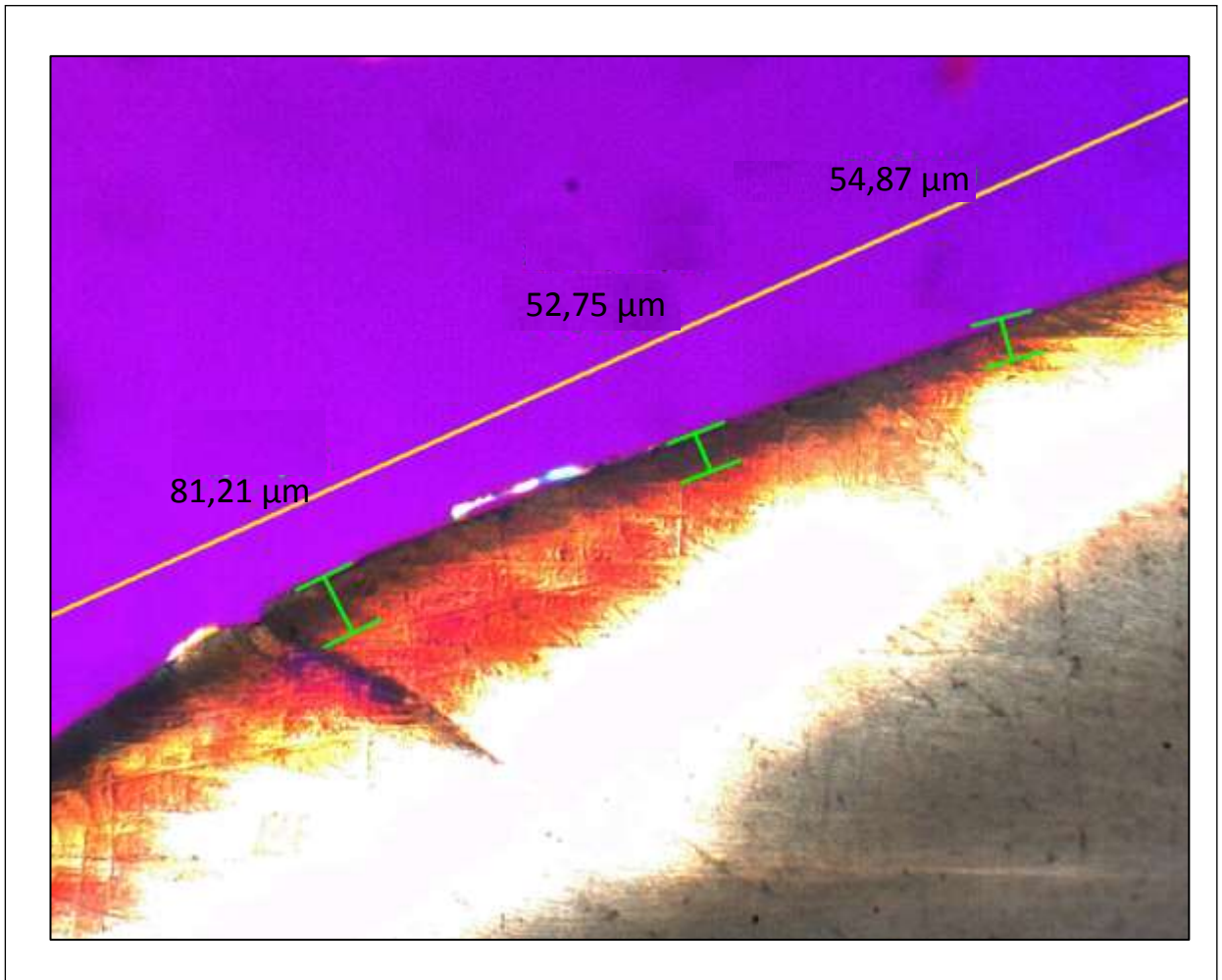


Figura 20. Imagem representativa obtida em MLP (5X), para as profundidades (em μm) das LCSS para o grupo controle.

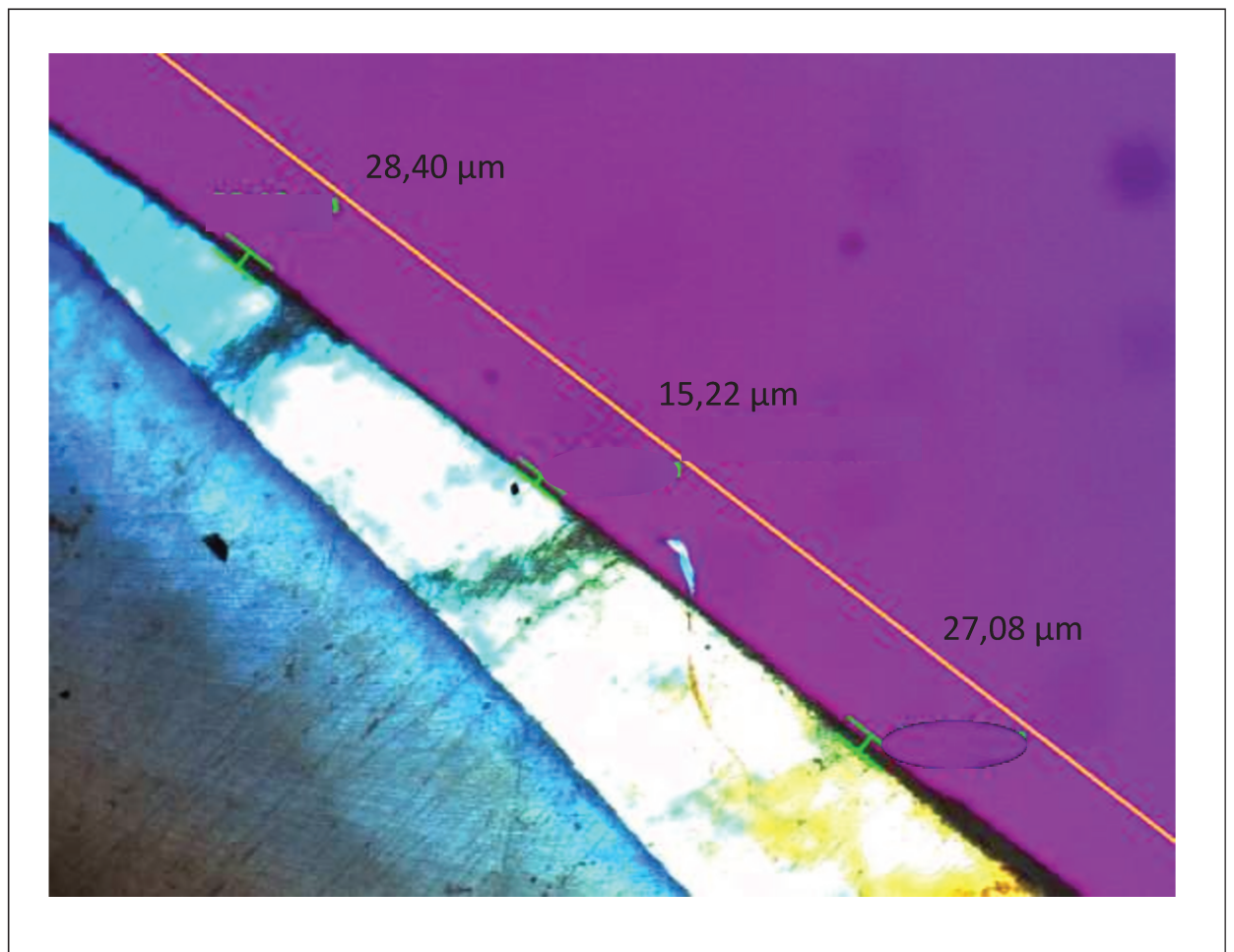


Figura 21. Imagem representativa obtida em MLP (5X), para as profundidades (em μm) das LCSS para o grupo Duraphat[®].

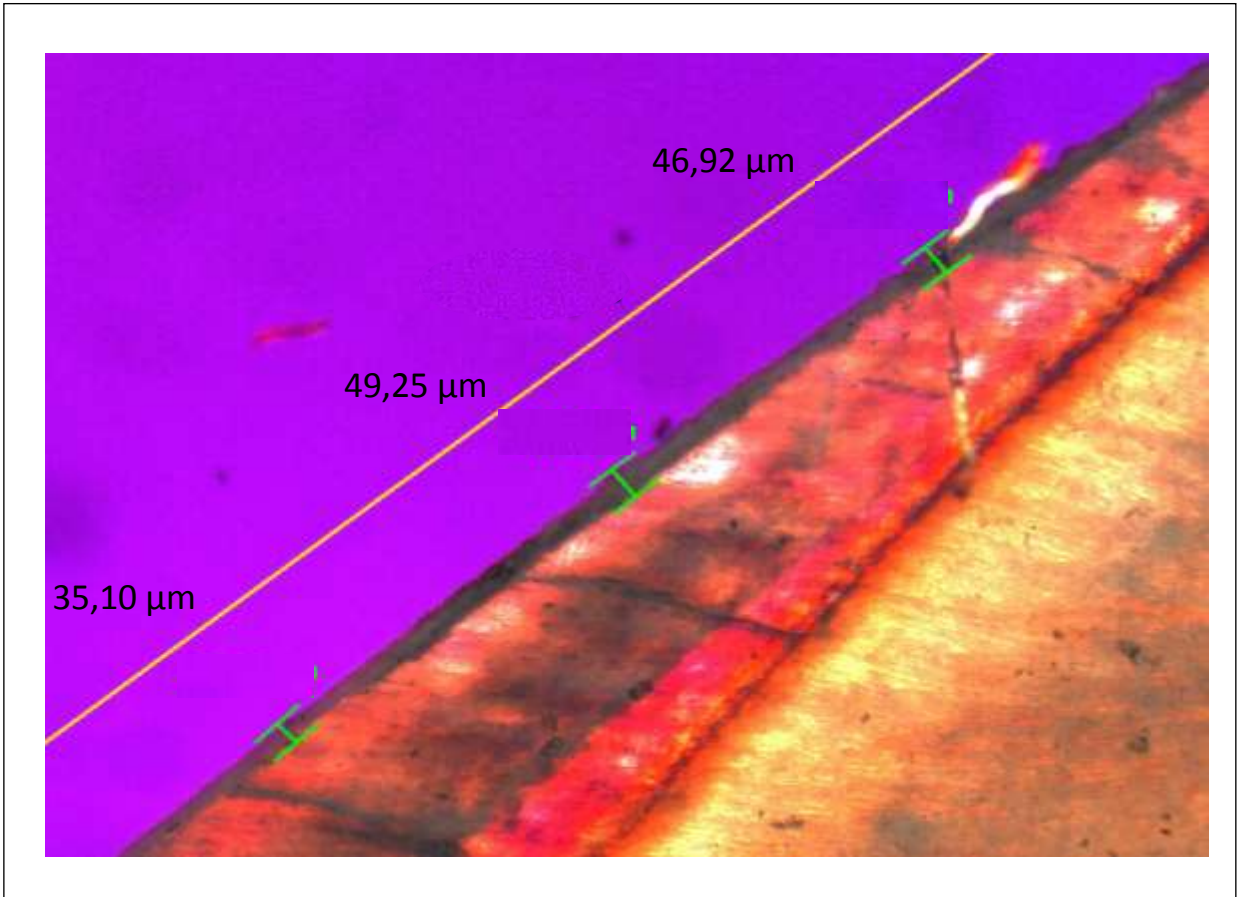


Figura 22. Imagem representativa obtida em MLP (5X), para as profundidades (em μm) das LCSS para o grupo MI Varnish™.

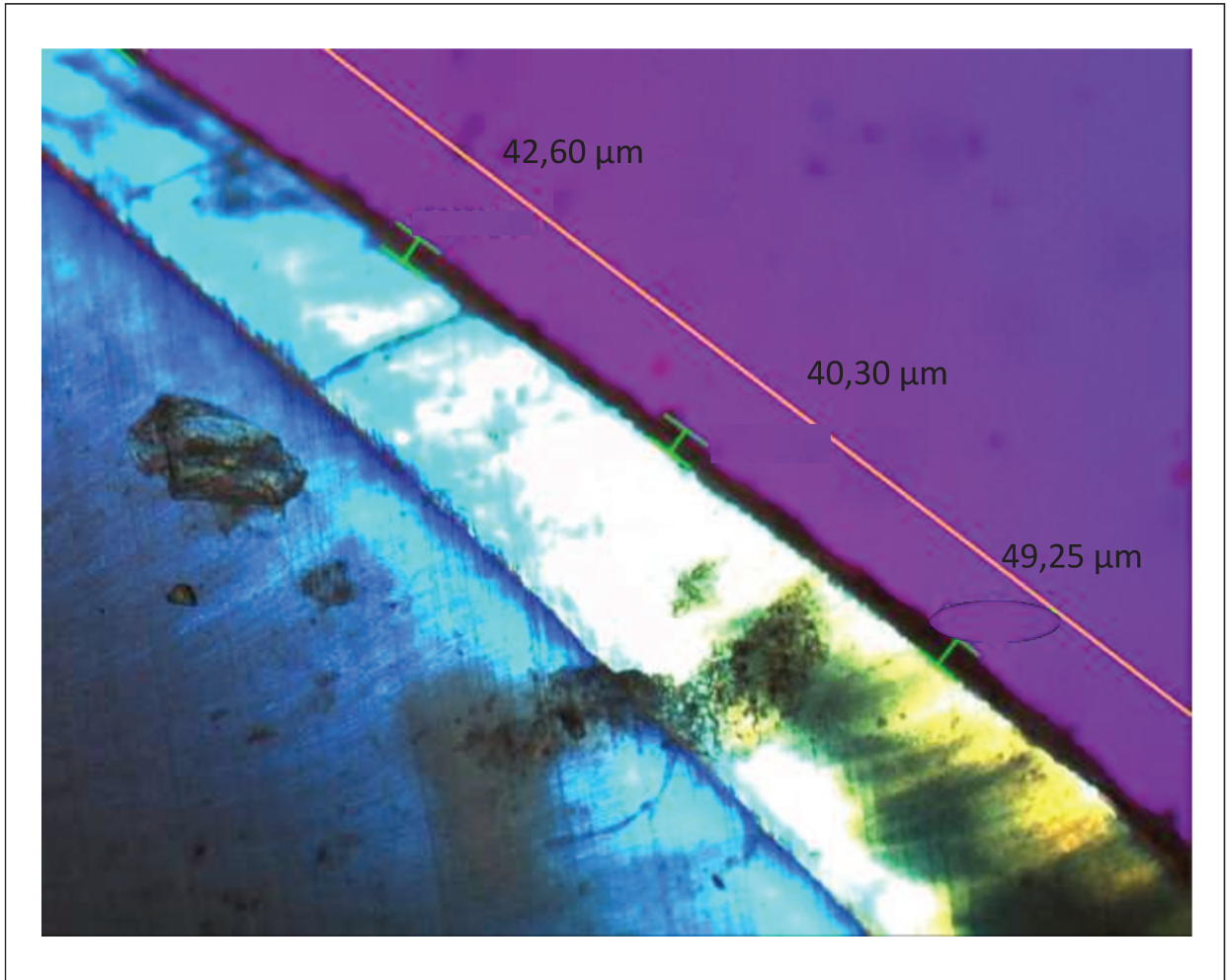


Figura 23. Imagem representativa obtida em MLP (5X), para as profundidades (em μm) das LCSS para o grupo VanishTM.

5.3 Análise da perda mineral por meio da dureza Knoop

Após a análise estatística dos resultados, observou-se que os grupos controle, MI VarnishTM e VanishTM apresentaram perda mineral sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$) e com diferença significativa, comparados ao Duraphat[®] ($p < 0,001$, $p = 0,0022$ e $p = 0,0036$, respectivamente) (Figura 24).

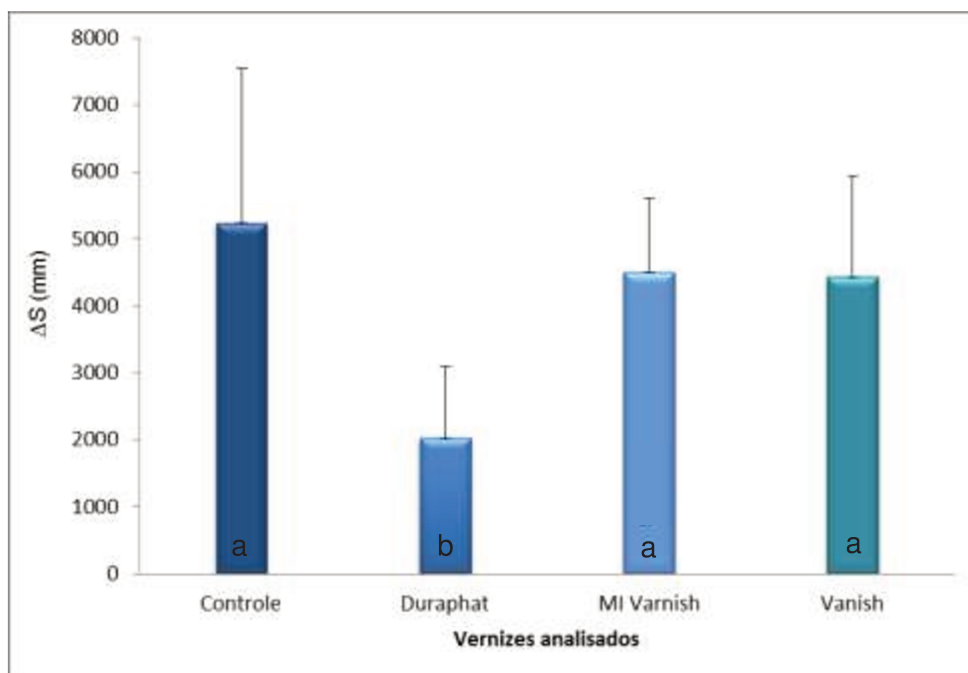


Figura 24. Gráfico ilustrativo da variação dos valores da Microdureza (ΔS) e desvio padrão para os 4 grupos estudados.

5.4 Análise do conteúdo de Cálcio e Fósforo por meio da Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS)

Para a EDS, tanto para o elemento químico Ca, quanto para o P, observou-se ausência de interação entre os fatores em estudo ($p > 0,05$), entretanto para Ca, observou-se diferença significativa entre as regiões superficial e sub-superficial ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvio padrão das quantidades de cálcio e fósforo observados para as LCSS formadas *in vitro*.

| Grupos | Cálcio | | Fósforo | |
|-------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| | Região Superficial* | Região Sub-Superficial | Região Superficial | Região Sub-Superficial |
| Controle | 70,33± 0,41 | 70,93±1,41 | 29,00±0,68 | 29,56±1,02 |
| Duraphat [®] | 69,91±0,47 | 70,12±0,72 | 29,02±0,26 | 28,88±0,30 |
| MI Varnish [™] | 69,88±0,34 | 70,68±0,31 | 28,76±0,16 | 28,71±0,41 |
| Vanish [™] | 69,33±0,89 | 70,80±0,25 | 28,98±0,29 | 28,44±0,15 |

* Diferença significativa entre as regiões superficiais e sub-superficiais, para o elemento químico Ca ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

As LCSS artificiais são comumente usadas em estudos *in vitro* para simular as lesões de cárie naturais e investigar o potencial remineralizador de materiais utilizados no controle e prevenção da cárie dentária (Paes Leme *et al.*, 2003; Griffin *et al.*, 2008; Kantovitz *et al.*, 2013). Entretanto, a formação da cárie artificial difere da natural, uma vez que as naturais são produzidas por períodos prolongados e intermitentes de desmineralização. Contudo, a presença de flúor e de outras substâncias na cavidade oral durante a formação da cárie natural, bem como, a deposição de material orgânico nos microespaços porosos podem contribuir para uma resistência ácida maior em comparação ao esmalte sadio (Iijima & Takagi, 2000). Muitos protocolos tem sido utilizados para a formação de LCSS, tais como soluções desmineralizadoras, ciclos de desmineralização e remineralização e uso de soluções sub-saturadas de hidroxiapatita, entretanto, a maioria dos estudos foram desenvolvidos utilizando-se esmalte humano de dentes permanentes e de dentes bovinos (Paes Leme *et al.*, 2003; Hegde & Moany, 2012; Kantovitz *et al.*, 2013).

O primeiro estudo da presente dissertação teve por objetivo produzir artificialmente LCSS em dentes decíduos humanos, utilizando para isso, dois tempos para a formação das lesões (8 e 16 horas) pelo método químico estático de produção, utilizando solução sub-saturada de hidroxiapatita que induziria a uma típica LCSS, sem promover erosão do substrato (Moreno & Zahradnik, 1974). Após a análise quantitativa da formação das lesões observou-se que a profundidade das lesões não variou nos tempos de 8 e 16 horas, entretanto, para a análise qualitativa, o tempo de 16 horas apresentou LCSS homogêneas com relação à profundidade e continuidade das lesões, em 100% dos espécimes. Estudos encontrados na literatura também produziram LCSS com o tempo de 16 horas em esmalte bovino e humano, mas em dentes permanentes (Paes Leme *et al.*, 2003; Kantovitz *et al.*, 2013), o que demonstra a viabilidade da utilização do protocolo proposto também para a formação das LCSS em esmalte de dentes decíduos.

As LCSS em esmalte, também chamadas de lesões de mancha branca, necessitam de tratamento não invasivo para que não progridam, uma vez que a sub-superfície do esmalte acometida pela lesão é mais porosa que o esmalte sadio (Silverstone, 1973).

A eficácia da aplicação de vernizes fluoretados para a redução da cárie tem sido documentada (Birkeland *et al.*, 1981; Clark *et al.*, 1987; AlAmoudi *et al.*, 2013).

Desde o advento dos primeiros vernizes, os pesquisadores vem realizando estudos a fim de aprimorar a eficácia e liberação de fluoreto desses materiais (Jacobsen & Young, 2003; AlAmoudi *et al.*, 2013; Karlinsey *et al.*, 2014). Dentre os tipos de materiais que contém fluoretos: gel, *mousse*, soluções e vernizes, estes últimos são preferidos pelos cirurgiões-dentistas devido à facilidade de aplicação e menor risco de ingestão (Hawkins *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2012; AlAmoudi *et al.*, 2013). Acerca dos estudos realizados, de uma forma geral, os pesquisadores concordam que os vernizes fluoretados não só previnem a formação das lesões de cárie, como também previnem que as já existentes evoluam (Vaikuntam *et al.*, 2000; Xhemnica *et al.*, 2008; Amaechi *et al.*, 2012; AlAmoudi *et al.*, 2013).

Atualmente há disponíveis no mercado diversos materiais utilizados para a prevenção e tratamento minimamente invasivo de LCSS, com diferentes constituintes que auxiliam no tratamento das mesmas. Recentemente, vernizes fluoretados modificados com adição de cálcio e fosfato, como o CPP-ACP e TCP, tem sido desenvolvidos para suplementar a quantidade desses íons na saliva e elevar a remineralização pelo fluoreto, resultando no aumento da eficácia anti-cáries (Schemehorn *et al.*, 2011).

O presente estudo avaliou 3 vernizes contendo NaF a 5%, sendo dois deles com composição modificada: um deles apresenta CPP-ACP e outro TCP em suas composições, na redução da profundidade de perda mineral de LCSS em dentes decíduos. Os resultados obtidos após a realização do teste de dureza longitudinal demonstraram que menor perda mineral foi observada para as LCSS tratadas com Durapaht® e significativamente maiores perdas minerais foram observadas para os grupos controle, MI Varnish™ e Vanish™. O teste de dureza longitudinal é um método de análise muito utilizado, adequado e sensível para avaliar indiretamente a perda mineral e a progressão natural ou artificial de lesões de cárie, existindo uma correlação entre a porcentagem de volume mineral presente e a dureza do esmalte humano desmineralizado e remineralizado (White, 1992). Assim, a mensuração da dureza pode ser usada para estabelecer indiretamente, o grau de mineralização do esmalte, permitindo avaliar quantitativamente a desmineralização e remineralização, baseado na porcentagem de volume mineral do esmalte (Featherstone, 1983). Ainda, de acordo com White & Featherstone (1987) a mensuração da dureza é uma importante ferramenta de medida para estudos de remineralização de lesões e esse método fornece informações úteis da remineralização das lesões em áreas de progressão.

No presente estudo, os grupos controle, MI Varnish™ e Vanish™ apresentaram padrão mineral semelhante. Embora alguns estudos tenham demonstrado que os vernizes que contém CPP-ACP e TCP (Reynolds, 1997; Lee *et al.*, 2010; Schemehorn *et al.*, 2011; Lippert *et al.*, 2013; ALAmoudi *et al.*, 2013) promovam a remineralização de LCSS e que o flúor liberado de compostos que contém NaF seja a chave para o sucesso das terapias utilizando-se esses materiais (ALAmoudi *et al.*, 2013), esse padrão não foi observado no presente estudo. Uma provável explicação para os resultados desse estudo seria que todos os espécimes (controle e tratados) foram armazenados em saliva artificial por um período de 7 dias, o que promoveu ganho mineral para o grupo controle, pois essa solução possui em sua composição cálcio e fósforo, além de pequena quantidade de flúor. Ainda, tem se relatado que os vernizes que contem CPP-ACP ou TCP promovem maior remineralização na presença de flúor (Hegde & Moany, 2012; ALAmoudi *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013) e as fontes de fluoreto liberado podem ser fluorapatita ou fluoreto de cálcio formado no esmalte e no biofilme, após a aplicação tópica de flúor. Ferreira *et al.* (2009) compararam vernizes de fluoreto de cálcio modificados com os contendo apenas 5% de NaF e mostraram que ambas formulações produziram efeitos clínicos similares na redução e controle da cárie dentária.

Apesar da pequena quantidade de flúor na saliva artificial, essa solução é composta de cálcio e fosfato entre outros componentes, o que também pode ter contribuído a ausência de diferença estatística para o conteúdo de Ca e P entre os grupos, quando analisados por meio da EDS. Entretanto, foi observada diferença significativa para o cálcio entre as duas regiões de análise (superficial x sub-superficial). A região sub-superficial apresentou maior quantidade de Ca comparada à região superficial. Uma provável explicação seria o fato da região sub-superficial ser mais porosa (Silverstone, 1973), o que pode ter contribuído para a deposição de cálcio após os tratamentos e armazenamento na saliva artificial.

Além do teste de dureza longitudinal, os espécimes foram avaliados quantitativamente e qualitativamente, por meio da MLP. Os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram valores médios de profundidade de LCSS similares. Isso poderia ser explicado, pois o efeito do flúor é também dependente da profundidade da lesão e a perda mineral é inversamente correlacionada com a concentração de flúor (Naumova *et al.*, 2012). Se fizermos uma comparação paralela entre os resultados observados no estudo 1 e no estudo 2 desta dissertação, podemos observar valores

médios de 104,53 μm de profundidade das LCSS quando as lesões foram produzidas em 16 horas e valores médios de 54,10 μm , 39,73 μm , 32,77 μm , 38,13 μm para os grupos controle, Duraphat[®], MI Varnish[™] e Vanish[™], respectivamente. Para o grupo controle representa uma diminuição em profundidade de 50,43 μm , para o Duraphat[®] 64,80 μm , para o MI Varnish[™] de 71,76 μm e para o Vanish[®] de 66,40 μm .

Estudo realizado por Santos *et al.* (2009), o qual avaliou diferentes produtos contendo flúor, em relação à profundidade da lesão, após processos de desmineralização e remineralização, demonstrou que todos os grupos tratados com algum produto contendo flúor conseguiram diminuir a profundidade das lesões, porém nenhum foi capaz de prevenir completamente a formação da mesma. Entretanto, o verniz Duraphat[®] foi o que apresentou maior potencial cariostático, quando comparado aos outros grupos. Considerando que o fluoreto de cálcio é o principal produto resultante de um método de aplicação tópica de flúor, pode-se considerar que a superioridade do Duraphat[®] sobre outros produtos fluoretados foi devido à maior formação de fluoreto de cálcio depositado na superfície (Chow *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2009).

Lippert *et al.* (2013) relataram que o fluoreto pode ser incorporado de várias formas no esmalte, formas essas divididas em fracamente ou estruturalmente ligadas a esse íon. O primeiro é o modo principal de incorporação de flúor pelo esmalte, atuando como reservatório instável de íons fluoreto e pode servir como uma fonte de flúor mais tardiamente (Ogaard *et al.*, 1994). A aplicação de fluoreto em altas concentrações, como os vernizes, seria a forma não estequiométrica primária de fluoreto de cálcio, que é considerado mais estável *in situ* que em condições laboratoriais devido à proteção de película protéica (White, 1987). Assim, é provável que investigações *in vitro* subestimem a eficácia anti-cáries dos vernizes fluoretados quando comparados a outras formas de liberação de fluoreto, o que pode explicar os resultados de alguns estudos prévios (Maia *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2012). A proposta de se adicionar ingredientes aos vernizes fluoretados pode ser questionada em função da aplicação e modo de ação dos vernizes fluoretados (ALAmoudi *et al.*, 2013). Diferenças inerentes à formulação podem superar quaisquer potenciais benefícios, a menos que um ingrediente possa aumentar a liberação de flúor nos tecidos duros, a sua adição é questionável (ALAmoudi *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos encontrados na literatura foi realizada em dentes humanos permanentes ou em dentes bovinos (Reynolds, 1997; Cochrane *et al.*, 2008;

Hegde & Moany, 2012; Zhou *et al.*, 2012; Mehta *et al.*, 2013), o que dificulta a comparação dos resultados, uma vez que o presente estudo utilizou dentes decíduos. Sabe-se que o esmalte dos dentes decíduos apresenta baixo conteúdo mineral (carbonato) e alto conteúdo orgânico e que a camada de esmalte nestes dentes também é menor comparado aos dentes permanentes, o que o torna mais vulnerável ao desenvolvimento da cárie (Oliveira *et al.*, 2010). Além disso, devido à rápida formação do esmalte nos decíduos, os cristais de hidroxiapatita podem conter mais imperfeições quando comparados aos permanentes (Thaveesangpanich *et al.*, 2005). Essas variações estruturais podem influenciar na susceptibilidade à cárie e resultar em menores valores de dureza (Horowitz & Ismail, 1996; Attin *et al.*, 2005) e também podem ter influenciado nos resultados obtidos no presente estudo.

O presente estudo apresenta limitações inerentes a estudos *in vitro*, particularmente relacionadas às aplicações dos vernizes fluoretados as quais não mimetizam exatamente os mecanismos de ação desses materiais no ambiente bucal. Sendo assim, futuros estudos *in vitro* e *in situ* devem ser conduzidos para comprovar e evidência clínica do efeito dos vernizes fluoretados modificados contendo CPP-ACP e TCP sob LCSS em dentes decíduos.

7 CONCLUSÃO

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

- Dezesesseis horas foi o tempo mais adequado para formação das LCSS em dentes decíduos;
- Os vernizes fluoretados modificados não se mostraram efetivos em reduzir a perda mineral de LCSS em dentes decíduos;
- Duraphat[®] foi o material que apresentou maior efetividade para diminuir a perda mineral de LCSS em dentes decíduos.

REFERÊNCIAS

1. 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*. 2013;2013:486358. doi: 10.1155/2013/486358. [Epub 2013 May 28].
2. Amaechi BT, Ramalingam K, Mensinkai PK, Chedjieu I. *In situ* remineralization of early caries by a new high-fluoride dentifrice. *Gen Dent*. 2012; 60(4):e186-9.
3. American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD). Guideline on caries-risk assessment and management for infants, children, and adolescents. Reference manual *Pediatr Dent*. 2013;35(5):E157-64.
4. Arnold WH, Dorow A, Langenhorst S, Gintner Z, Bánóczy J, Gaengler P. Effect of fluoride toothpastes on enamel demineralization. *BMC Oral Health* 2006; 15:6-8.
5. Audio-Gold JT, Tomar SL. Prevalence of noncavitated and cavitated carious lesions in 5-year-old head start schoolchildren in Alachua County, Florida. *Pediatr Dent*. 2005; 27(1):54-60.
6. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E. Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol*. 1997; 42(3):243-50.
7. Bar-Hillel R, Feuerstein O, Tickotsky N, Shapira J, Moskovitz M. Effects of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides on enamel de- and remineralization in primary teeth: an in vitro study. *J Dent Child (Chic)*. 2012; 79(1):9-14.
8. Beltran-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA. Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc* 2000; 131(5):589-96.
9. Birkeland JM. Trials - results - conclusions. Duraphat - Fluor Protector. *Nor Tannlaegeforen Tid*. 1981; 91(10):368-9.

10. Cai F, Shen P, Morgan MV, Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions *in situ* by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Aust Dent J.* 2003; 48(4): 240-3.
11. Carvalho DM, Salazar M, Oliveira BH, Coutinho ES. Fluoride varnishes and decrease in caries incidence in preschool children: a systematic review. *Rev Bras Epidemiol.* 2010; 13(1):139-49.
12. Castellano JB, Donly KJ. Potential remineralization of demineralized enamel after application of fluoride varnish. *Am J Dent* 2004; 17(6):462-4.
13. Chow LC, Takagi S, Frukhtbeyn S, Sieck BA, Parry EE, Liao NS, Schumacher GE, Markovic M. Remineralization effect of a low-concentration fluoride rinse in an intraoral model. *Caries Res.* 2002; 36(2):136-41.
14. Clark DC, Stamm JW, Tessier C, Robert G. The final results of the Sherbrooke-Lac Mégantic fluoride varnish study. *J Can Dent Assoc.* 1987; 53(12):919-22.
15. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. Enamel subsurface lesion remineralisation with casein phosphopeptide stabilized solutions of calcium, phosphate and fluoride. *Caries Res* 2008; 42(2): 88-97.
16. Couto GBL, Vasconcelos MMVB, Melo MMC, Camelo CAC, Valença PAM. Prevalência de cárie, mancha branca e placa visível em crianças de 0 a 36 meses, assistidas pelo Programa de Saúde da Família na Cidade de Camaragibe – PE. *Odontol Clín-Cient* 2005; 4: 19-27.
17. De Marsillac MDE W, Vieira RDE S. Assesment of artificial caries lesions through scanning electron microscopy and cross-sectional microhardness test. *Indian J Dent Res.* 2010; 24(2):249-54.

18. Ehrlich H, Koutsoukos PG, Demadis KD, Pokrovsky OS. Principles of demineralization: modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part I. Common definitions and history. *Micron* 2008; 39(8):1062-91.
19. Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arens J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Research* 1983; 17(5):385–91.
20. Featherstone JDB, O'Reilly NA, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. S. A. Leach, ED. Oxford: IRL Press. 1986.
21. Fejerskov O, Kidd AME. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Ed. Santos, 2005.
22. Ferreira JMS, Aragão AKR, Rosa ADB, Sampaio FC, Menezes VA. Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions: a randomized clinical trial. *Brazilian Oral Research* 2009; 23(4):446-451.
23. Flaitz CM, Hicks MJ. Remineralization of caries like lesions of enamel with acidulated calcifying fluids: a polarized light microscopic study. *Pediatr Dent* 1996; 18(3):205-209.
24. Gelani R, Zandona A, Lippert F, Kamocka M, Eckert G. *In Vitro* Progression of Artificial White Spot Lesions Sealed With an Infiltrant Resin. *Oper Dent*. 2014; 19:39-3.
25. Griffin SO, Oong E, Kohn W, Vidakovic B, Gooch BF. The effectiveness of sealants in managing caries lesions. *J. Dent Res*. 2008; 87(2):169–74.
26. Grossman ES, Matejka JM. Reliability of outer lesion secondary caries as a predictor of wall lesions. *Am J Dent*. 1999; 12(1): 31-6.
27. Gugwad SC, Shah P, Lodaya R, Bhat C, Tandon P, Choudhari S, Patil S. Caries prevention effect of intensive application of sodium fluoride varnish in molars in children between age 6 and 7 years. *J Contemp Dent Pract* 2011; 12(6):408-13.

28. Hallsworth AS, Weatherell JA, Robinson C. Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. *Caries Res* 1973; 7(4): 345-8.
29. 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.
30. Hazelrigg CO, Dean JA, Fontana M. Fluoride varnish concentration gradient and its effect on enamel demineralization. *Pediatr Dent* 2003; 25(2):119-26.
31. Hegde MN, Moany A. Remineralization of enamel subsurface lesions with casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: A quantitative energy dispersive X-ray analysis using scanning electron microscopy: An *in vitro* study. *Journal of Conservative Dentistry* 2012; 15(1):61-68.
32. Horowitz HS, Ismail AI. Topical fluorides in caries prevention: in Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. *Fluoride in dentistry.* Copenhagen, Munksgaard, 1996. p. 311-23.
33. Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res* 2004; 38(6):551-6.
34. Iijima Y, Takagi O. *In situ* acid resistance of *in vivo* formed white spot lesions. *Caries Res* 2000; 34(5):388–94.
35. Jabbarifar SE, Salavati S, Akhavan A, Khosravi K, Tavakoli N, Nilchian F. Effect of fluoridated dentifrices on surface microhardness of the enamel of deciduous teeth. *Dent Res J (Isfahan).* 2011;8(3):113-7.
36. Jablonowski BL, Bartoloni JA, Hensley DM, Vandewalle KS. Fluoride release from newly marketed fluoride varnishes. *Quintessence Int* 2012; 43(3):221-8.
37. Jacobsen P, Young D. The use of topical fluoride to prevent or reverse dental caries. *Spec Care Dentist.* 2003; 23(5):177-9.

38. 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(1):42-50.
39. Karlinsey RL, Mackey AC, Dodge LE, Schwandt CS. Noncontact remineralization of incipient lesions treated with a 5% sodium fluoride varnish *in vitro*. J Dent Child. 2014; 81(1):7-13.
40. Kielbassa AM, Paris S, Lussi A, Meyer-Lueckel H. Evaluation of cavitations in proximal caries lesions at various magnification levels *in vitro*. J Dent. 2006; 34(10): 817-22.
41. Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB. Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. J Dent. 2010; 38(2):166-71.
42. Lippert F, Hara AT, Martinez-Mier EA, Zero DT. *In vitro* caries lesion rehardening and enamel fluoride uptake from fluoride varnishes as a function of application mode. Am J Dent. 2013; 26(2):81-5.
43. Lo EC, Tenuta LM, Fox CH. Use of professionally administered topical fluorides in Asia. Adv Dent Res. 2012; 24(1):11-5.
44. Maas JR, Junior IM, Lodi CS, Delbem AC. Differences in loosely bound fluoride formation and anticaries effect of resin-based fluoride varnishes. Int J Paediatr Dent. 2013; 23(3):166-72.
45. Maia LC, de Souza IPR, Cury JA. Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake *in vitro*. Eur J Oral Sci 2003; 111(1):68-72.
46. Mehta R, Nandlal B, Prashanth S. Comparative evaluation of remineralization potential of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and casein

phosphopeptide-amorphous calcium phosphate fluoride on artificial enamel white spot lesion: An *in vitro* light fluorescence study. Indian J Dent Res. 2013; 24(6): 681-9.

47. Mejàre I, Källest I C, Stenlund H. Incidence and progression of approximal caries from 11 to 22 years of age in Sweden: A prospective radiographic study. Caries Res. 1999; 33(2): 93-100.

48. Moreno HC, Zahradnik RT. Chemistry of enamel subsurface demineralization *in vitro*. J Dent Res. 1974; 53(2): 226-235.

49. Naumova EA, Niemann N, Aretz L, Arnold WH. Effects of different amine fluoride concentrations on enamel remineralization. J Dent. 2012; 40(9): 750-5.

50. Ogaard B, Seppa L, Rolla G. Professional topical fluoride applications. Clinical efficacy and mechanism of action. Adv Dent Res 1994; 8(2): 190-201.

51. Oliveira MAHM, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti, MA, Menezes, FCH, Palma-Dibb, Borsatto, MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. Microscopy Research and Technique 2010; 73(5): 572-577.

52. 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 2007; 49(2): 115-20.

53. Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. Am J Dent 2003; 16(2): 91-5.

54. 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 in 3- to 4-year-old preschool children: a field study. Int J Paediatr Dent 2012; 22(2): 92-9.

55. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* 1997; 76(9):1587-95.
56. Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist* 1998; 18(1):8-16.
57. Santos LDE 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(3):296-301.
58. 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.
59. Schimidth HFM. A new varnish with extremely long lasting fluoridation effect. *Stma* 1964; 17:14-20.
60. Shabanian M, Jabarifar SE, Salavati S, Khosravi K, Tavakoli N, Akhavan A. Effect of fluoride dentifrices on the microhardness of deciduous enamel surfaces. *Oral Health Prev Dent.* 2012; 10(1):59-64.
61. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev* 1973; 3:100-60.
62. Souchois MW, Vieira RS. Effect of a glass ionomer cement and a fluoride varnish on cross-sectional microhardness values of artificial occlusal caries: in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2012; 23(6):732-7.
63. Seppä L, Leppanen T, Hausen H. Fluoride varnish versus acidulated phosphate fluoride gel: a 3-year clinical trial. *Caries Res* 1995; 29(5):327-30.
64. Seppä L. Fluoride varnishes in caries prevention. *Med Princ Pract.* 2004; 13(6):307-11.

65. Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrão HC. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *Int. J. Dent.* 2009; 37(1):44–51.
66. Stafford GL. Fluoride varnish may improve white spot lesions. *Evid Based Dent* 2011; 12(4): 104-5.
67. Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Nobre Dos Santos M, Soares LE, Martin AA. Combined effects of carbon dioxide laser and fluoride on demineralized primary enamel: an *in vitro* study. *Caries Res.* 2007; 41(1):74-6.
68. Tang B, Millar BJ. Effect of chewing gum on tooth sensitivity following whitening. *Br Dent J* 2010; 208(12):571-7.
69. Ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res.* 1982; 16(3):201-10.
70. Tewari A, Chawla HS, Utreja A. Comparative evaluation of the role of NaF, APF & Duraphat topical fluoride applications in the prevention of dental caries- a 2 1/2 years study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 1991; 8(1):28-35.
71. Thaveesangpanich P, Itthagaran A, King NM, Wefel JS, Tay FR. *In vitro* model for evaluating the effect of child formula toothpastes on artificial caries in primary dentition enamel. *Am J Dent.* 2005; 18(3):212-6.
72. USDHHS, PHS, NIH, NIDR (1991). Oral health surveys of the National Institute of Dental Research: diagnostic criteria and procedures. NIH Publication No. 91-2870. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services, NIH.
73. Vaikuntam J. Fluoride varnishes: should we be using them? *Pediatr Dent.* 2000; 22(6):513-6.

74. Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Jue B, Shain S, Hoover CI, Featherstone JD, Gansky SA. Fluoride varnish efficacy in preventing early childhood caries. *J Dent Res* 2006; 85(2):172–6.
75. White DJ. Use the synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation. *Caries Res* 1987; 21(3):228-242.
76. White DJ, Featherstone JD. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. *Caries Res.* 1987; 21(6):502-12.
77. White DJ. The comparative sensitivity of intra-oral, in vitro, and animal models in the 'profile' evaluation of topical fluorides. *J Dent Res.* 1992; 71:884-94.
78. Xhemnica L, Sulo D, Rroço R, Hysi D. Fluoride varnish application: a new prophylactic method in Albania. Effect on enamel carious lesions in permanent dentition. *Eur J Paediatr Dent.* 2008; 9(2):93-6.
79. Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK. Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent* 2006; 34(3):230-6.
80. Zhang Q, Zhou J, Yang R, Zhou X. Remineralization effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate crème on artificial early enamel lesions of primary teeth. *Int J Paediatr Dent* 2011; 21(5):374-81.
81. Zhou SL, Zhou J, Watanabe S, Watanabe K, Wen LY, Xuan K. *In vitro* study of the effects of fluoride-releasing dental materials on remineralization in an enamel erosion model. *J Dent* 2012; 40(3):255-263.

ANEXO

| | | |
|---|---|--|
| | COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS | |
| CERTIFICADO | | |
| <p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa *Avaliação qualitativa e quantitativa do potencial remineralizador de diferentes vernizes fluoretados em lesões de cárie sub-superficiais produzidas in vitro em esmalte de dentes decíduos*, protocolo nº 101/2013, dos pesquisadores Fernanda Miori Pascon e Thais Varanda, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 09/10/2013.</p> | | |
| <p>The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project *Qualitative and quantitative evaluation of the remineralizing potential of different fluoride varnishes in white spot lesions produced in vitro in primary teeth enamel*, register number 101/2013, of Fernanda Miori Pascon and Thais Varanda, 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 Oct 09, 2013.</p> | | |
| | | |
| Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado Secretário CEP/FOP/UNICAMP | Profa. Dra. Livia Maria Andakó Tenuta Coordenadora CEP/FOP/UNICAMP | |
| <p><small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Nota: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p> | | |