



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Larissa Daniela Orlando

**EFEITO DE SOLUÇÃO FLUORETADA TAMPONADA NA ATIVAÇÃO DA
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTAL**

Piracicaba-SP
2016

Larissa Daniela Orlando

**“EFEITO DE SOLUÇÃO FLUORETADA TAMPONADA NA ATIVAÇÃO DA
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE DENTAL.”**

Este exemplar corresponde à versão final do trabalho de conclusão de curso da aluna Larissa Daniela Orlando, orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Pereira Machado Tabchoury.

Aluno: Larissa Daniela Orlando

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Piracicaba-SP
2016

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

Or5e Orlando, Larissa Daniela, 1991-
Efeito de solução fluoretada tamponada na ativação da remineralização do esmalte dental / Larissa Daniela Orlando. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Cíntia Pereira Machado Tabchoury.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cárie dentária. 2. Esmalte dentário. 3. Flúor. 4. Remineralização dentária. I. Tabchoury, Cíntia Pereira Machado, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Dental caries

Dental enamel

Fluorine

Tooth remineralization

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 03-10-2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Renata Aparecida Carneluti Orlando e Donisete Daniel Orlando e ao meu irmão André Luiz Orlando, pela oportunidade que me deram de estar realizando meu sonho e por todo apoio e paciência que demonstraram durante todo meu trajeto.

AGRADECIMENTOS

A orientadora desse trabalho Prof^a. Dr^a. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, pelas oportunidades, aprendizagem e paciência.

Ao meu namorado Gabriel Felipe Marino Cerqueira, pelo apoio emocional e a ajuda no preparo deste trabalho.

A Dr^a. Dayse Andrade Romão e Mayara dos Santos Noronha, pelo convívio diário e colaboração ativa nesse trabalho.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, como instituição representada pelos funcionários, docentes e discentes.

Ao Laboratório de Bioquímica Oral, pelos bons momentos e lições.

À FAPESP pelo apoio financeiro,(nº do processo 2014/23783-3).

Aos docentes da FOP-UNICAMP, que me transformaram, com lições para uma vida toda, meu respeito e prestígio a todos, especialmente para Prof^a. Dr^a. Cíntia Pereira Machado Tabchoury e Prof^a. Dr^a. Vania Célia Vieira de Siqueira.

RESUMO

O papel do fluoreto (F) na prevenção e controle da cárie dentária é bem descrito, inibindo o processo de desmineralização e ativando a remineralização. Em relação à reatividade do F com o substrato dental, estudos mostram que existem fatores e substâncias que podem interferir neste processo. Um dos principais fatores é o pH, cuja diminuição leva a um aumento da reatividade do F. Entretanto, durante a reação de uma solução com o esmalte pode haver uma alteração no pH do meio, pois como há reação dos íons fosfato e hidroxilas com os prótons da solução, haveria um aumento do pH da solução, podendo influenciar a reatividade do F com o esmalte dental, diminuindo-a. Assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar, em um modelo de ciclagens de pH, a reatividade do F presente em uma solução tampão em pH ácido com o esmalte dental com lesão cariiosa artificial. Foram utilizados blocos de esmalte dental (4x4x2 mm), obtidos de incisivos bovinos e pré-selecionados quanto à dureza de superfície, nos quais foram induzidas lesões cariosas subsuperficiais. Os blocos dentais foram aleatorizados e submetidos ao seguinte ensaio de ciclagens de pH, que teve duração de 8 dias. Os blocos permaneceram na solução desmineralizante (tampão acetato 0,1 M pH 5,0, contendo 1,28 mM de Ca, 0,74 mM de Pi e 0,03 µg F/ml) durante 2 h e na solução remineralizante (tampão Tris 0,1 M pH 7,0 contendo 1,5 mM de Ca, 0,9 mM de Pi, 150 mM de KCl e 0,05 µg F/mL) por 22 h a 37°C (Queiroz et al., 2008). Os blocos dentais foram submetidos a 3 grupos de tratamento (n=20/grupo): I – solução contendo histidina 0,1 M pH 5,0 (controle negativo); II – solução contendo 226 µg F/mL pH 5,0; e III – solução contendo 226 µg F/mL e histidina 0,1 M pH 5,0. Os blocos de esmalte reagiram com as soluções de tratamento 3 vezes ao dia (9, 14 e 17 h) na proporção de 2 mL de solução/mm² de superfície de esmalte exposto em uma mesa agitadora à 100 rpm, a temperatura ambiente. A dureza de superfície foi novamente analisada nos blocos de esmalte ao final do ensaio de ciclagens de pH, sendo calculada a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS). Então, em metade dos blocos dentais foi determinada a dureza do esmalte dental seccionado longitudinalmente. Na outra metade dos blocos dentais, duas camadas consecutivas de esmalte foram removidas por ataque ácido e o fluoreto firmemente ligado presente nesse extrato ácido foi determinado por eletrodo específico para íon F. O grupo III (flúor + histidina) apresentou numericamente maior valor de %RDS que os grupos I e II, respectivamente, controle negativo e flúor, entretanto diferiu significativamente apenas no grupo I (controle negativo) e não diferiu estatisticamente do

grupo II (flúor). Os blocos tratados com solução de histidina (grupo I; controle negativo) apresentaram maior área de lesão cariiosa entre os grupos do presente estudo e este diferiu significativamente dos 2 grupos com flúor, com ou sem tampão. O grupo I (controle negativo) apresentou numericamente a menor concentração de flúor fortemente ligado do que os grupos II e III, respectivamente, flúor e flúor+histidina, que obtiveram praticamente o mesmo resultado. Dentro das limitações e nas condições do presente estudo in vitro, os dados obtidos sugerem que o tamponamento de uma solução fluoretada não aumenta a remineralização do esmalte dental com lesão cariiosa.

Palavras-chave: cárie dental, esmalte dental, estudo in vitro, Flúor, Remineralização

ABSTRACT

The role of fluoride (F) in the prevention and control of dental caries is well described by inhibiting the process of demineralization and remineralization activating. Regarding the reactivity of F with the dental substrate, studies show that there are factors and substances that can interfere with this process. One of the main factors is the pH decrease, which leads to an increased reactivity of F. However, during the reaction of a solution with dental enamel a change in pH of the medium may happen, because the reaction of phosphate ions with hydroxyl and protons of the solution would increase the pH of the solution and may influence the reactivity of F with dental enamel, thus reducing it. The objective of this project was to evaluate, in a model of pH cycling, the reactivity of F present in a buffer solution at acid pH with dental enamel with artificial carious lesion. Enamel blocks (4x4x2 mm), obtained from bovine incisors, were used and pre-selected according to surface hardness, in which sub-surface carious lesions were induced. Randomized enamel blocks were submitted to the following pH cycling model, which lasted 8 days. The blocks remained in the demineralizing solution (0,1 M acetate buffer pH 5,0, containing 1,28 mM Ca, 0,74 mM Pi and 0,03 µg F/mL) for 2 h and in the remineralizing solution (Tris buffer 0,1 M pH 7,0 containing 1,5mM Ca, 0.9 mM Pi, 150 mM KCl and 0,05 µg F/mL) for 22 h at 37°C (Queiroz et al., 2008). The dental blocks were submitted to 3 treatment groups (n = 20 / group): I - histidine solution containing 0,1 M pH 5,0 (negative control); II - solution containing 226 µg F/mL pH 5,0; and III - solution containing 226 µg F/mL and histidine 0,1 M pH 5,0. The enamel slabs reacted 3 times daily with the treatment solutions (9, 14 and 17 h) in a 2 ml solution/mm² enamel surface exposed on a shaking table at 100 rpm at room temperature. The surface hardness was again analyzed in enamel blocks at the end of the pH cycling test, and the percentage of surface hardness recovery (%RDS) was calculated. Then, in 15 blocks of each group, hardness of the enamel sectioned longitudinally was analysed. In 5 dental blocks of each group, two consecutive layers of enamel were removed by etching and firmly bound fluoride present in this extract acid was determined by ion specific electrode F. Group III (fluoride + histidine) showed numerically higher %RDS than the groups I and II, respectively, negative control and fluoride, however it differed significantly only from group I (negative control) and did not differ statistically from group II (fluoride). The blocks treated with histidine solution (group I; negative control) showed higher carious lesion area among the groups of this study and differed significantly from the 2 fluoride groups, with or without

buffer. Group I (negative control) had lower concentration of firmly bound fluoride than Groups II and III, respectively, fluoride and fluoride + histidine, which obtained almost the same result. Within the limitations and conditions of this in vitro study, the data suggest that the buffered fluoridated solution does not increase the remineralization of dental enamel with caries lesions.

Keywords: dental caries, dental enamel, in vitro study, fluoride, remineralization

Sumário

1. Introdução	10
2. Objetivo	13
3. Material e Métodos	13
3.1 Delineamento experimental	13
3.2 Obtenção dos blocos	14
3.3 Seleção inicial dos blocos	14
3.4 Indução da lesão cariosa artificial	15
3.5 Seleção dos blocos dentais após indução da lesão cariosa	15
3.6 Preparo das soluções de tratamento	16
3.7 Ciclagem de pH	16
4. Análises Laboratoriais	17
5. Análise Estatísticas	18
6. Resultados	18
7. Discussão	21
8. Conclusão	22
9. Referências Bibliográficas	23

1. Introdução

A cárie dental é uma doença biofilme e açúcar-dependente (Fejerskov, 2004), que ocorre devido a um desequilíbrio na perda e ganho de minerais entre as estruturas dentárias e o fluido do biofilme, sendo um processo dinâmico resultante de alterações ultraestruturais que, ao longo do tempo, se não forem controladas, podem levar à formação de uma lesão ou cavitação (Kidd, 2004). Para o controle da cárie dentária, as estratégias utilizadas devem se direcionar aos fatores etiológicos da doença e, embora haja evidência que o aconselhamento dietético colabora com a redução da cárie precoce em crianças (Feldens et al., 2007; Feldens et al., 2010), o sucesso do controle do biofilme dental como estratégia a nível populacional tem sido limitado (Nyvad, 2008), reforçando a utilização do fluoreto (F) como método mais indicado para controlar a cárie (Cury & Tenuta, 2008).

Assim, embora o F não possa interferir com os fatores responsáveis pela doença, se estiver presente constantemente na cavidade bucal, poderá interferir de forma positiva no seu desenvolvimento e progressão (Tenuta & Cury, 2010). Está bem descrito na literatura o mecanismo de ação do F no controle da cárie dental, reduzindo a desmineralização e ativando a remineralização do substrato dental (ten Cate, 1999). Em acréscimo, um declínio na prevalência e incidência da cárie dental tem sido observado em países desenvolvidos a partir da década de 80 (Bratthall et al., 1996) e nos países em desenvolvimento a partir da década de 90 (Cury et al., 2004).

Em relação à reatividade do F com o substrato dental, estudos mostram que existem fatores e substâncias que podem interferir neste processo, aumentando ou diminuindo esta reatividade (Friberger, 1975; Barkvoll et al., 1988; Barkvoll, 1991; Franco & Cury, 1993, 1994). Um dos principais fatores é o pH, cuja diminuição leva a um aumento da reatividade do F (Friberger, 1975; Delbem & Cury, 2002). Comparando-se soluções fluoretadas de pH variando de 4,5 a 7,1, verificou-se um aumento de 5 vezes na formação de flúorapatita no esmalte hígido que reagiu com a solução de menor pH (Friberger, 1975).

Durante a reação de uma solução fluoretada com o esmalte dental pode haver uma alteração no pH da mesma. Os íons fosfato e hidroxilas podem reagir com os prótons da solução, como mostra a reação abaixo, levando a um aumento do pH da

solução, devido à diminuição dos prótons livres pela ligação com os íons fosfato e hidroxila.

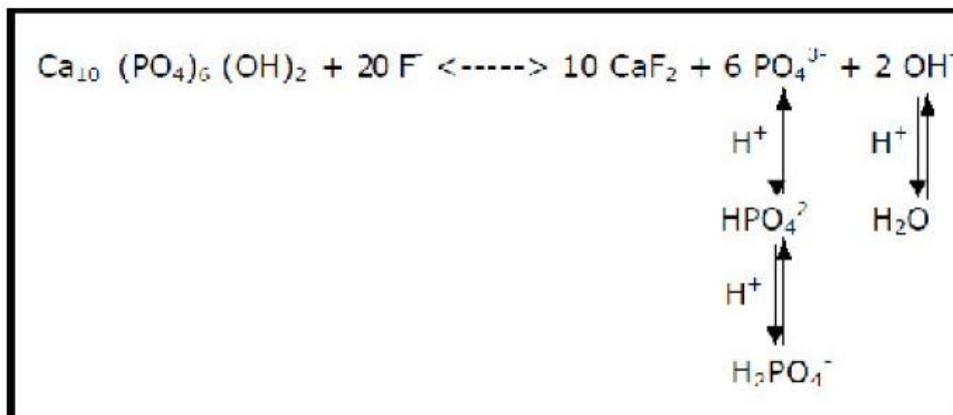


Figura 1. Reação de equilíbrio da hidroxiapatita e sua associação com a presença de prótons do meio.

Esta reação pode levar a um aumento do pH da solução, o qual é dependente da quantidade de prótons livres, como observado no estudo de Arthur et al. (2007), e assim diminuir a reatividade do F com o esmalte dental. Assim, se o F estiver presente em uma solução tampão, este aumento do pH será menor ou praticamente não ocorrerá, mantendo o pH da solução mais baixo durante todo o tempo da reação, o que aumenta a reatividade do F com o esmalte dental, como observado no estudo de Vieira Júnior et al. (2010). No estudo de Vieira Júnior et al (2010), a concentração de F fracamente ligado formado no esmalte dental com lesão cariada artificial foi significativamente menor em pH 5 do que em todos os outros pHs testados (5,5, 6 e 6,5), além de ter sido 3 vezes maior na presença de tampão do que na sua ausência. No entanto, este estudo avaliou apenas uma única reação dos blocos dentais com as soluções de tratamento, sem alternância dos meios de imersão, o que melhor representaria uma situação clínica.

Os modelos in vitro de ciclagens de pH são amplamente usados para estimar o potencial anticárie de dentífricos fluoretados (Featherstone et al., 1986; ten Cate, 1990; Queiroz et al., 2008; Featherstone et al., 2011; Tenuta & Cury, 2013). Adicionalmente, permitem a exposição dos substratos dentais a períodos alternados de desmineralização e remineralização, simulando as variações dinâmicas que ocorrem no pH e na saturação mineral associadas com o processo de cárie natural (White, 1995). Dessa forma, mimetizam o desenvolvimento e progressão da cárie in vivo, de modo que a duração do período de desmineralização simula a soma de vários períodos de quedas de pH que

podem ocorrer no biofilme dental (ten Cate et al., 1988). Assim, a função dos modelos in vitro de ciclagens de pH é facilitar a geração de dados quantitativos suficientes para fornecer ao investigador confiança na elaboração de ensaios clínicos (Cummins, 1995).

Desta forma, o objetivo do presente projeto será avaliar o efeito do F presente em uma solução ácida tamponada na ativação da remineralização de lesões cáries artificiais no esmalte dental em um modelo de ciclagens de pH.

2. Objetivo

Avaliar o efeito de solução fluoretada tamponada na ativação da remineralização do esmalte dental cariado.

3. Material e Métodos

3.1 Delineamento experimental

O presente estudo in vitro utilizou blocos de esmalte dental bovino (4x4x2mm) planificados, lixados e polidos, com lesão cáries artificial, que foram submetidos a um modelo de ciclagens de pH. Os blocos dentais foram inicialmente selecionados a partir da dureza de superfície. Após, lesões cáries subsuperficiais foram induzidas por imersão dos blocos dentais em solução desmineralizante, composta por tampão acetato 0,1 M pH 5,0, contendo 1,28 mM de Ca, 0,74 mM de Pi e 0,03 µg F/ml, por 16 h a 37°C (Queiroz et al., 2008; Moi et al., 2008). Então, os blocos dentais, selecionados a partir da dureza de superfície pós-indução da lesão cáries artificial, foram aleatoriamente divididos em três grupos de tratamento (n=20): I – solução contendo histidina 0,1 M pH 5,0 (controle negativo), II – solução contendo 226 µg F/mL pH 5,0 e III – solução contendo 226 µg F/mL e histidina 0,1 M pH 5,0. Durante o ensaio de ciclagens de pH, que teve duração de 8 dias, os blocos permaneceram na solução desmineralizante durante 2 h e na solução remineralizante (tampão Tris 0,1 M pH 7,0 contendo 1,5 mM de Ca, 0,9 mM de Pi, 150 mM de KCl e 0,05 µg F/ mL) por 22 h a 37°C (Queiroz et al. 2008). Os blocos de esmalte reagiram com as soluções de tratamento 3 vezes ao dia (9, 14 e 17 h) na proporção de 2 mL de solução/mm² de superfície de esmalte exposto em uma mesa agitadora à 100 rpm, a temperatura ambiente. A dureza de superfície foi novamente analisada nos blocos de esmalte ao final do ensaio de ciclagens de pH, sendo

calculada a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS). Então, foi determinada a dureza do esmalte dental seccionado longitudinalmente. Após, duas camadas consecutivas de esmalte dental foram removidas por ataque ácido e o fluoreto firmemente ligado presente no extrato ácido foi determinado por eletrodo específico para íon F. O estudo foi cego em relação ao operador. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente.

3.2 Obtenção dos blocos

Cento e cinquenta incisivos bovinos hígidos foram mantidos em solução de formaldeído 2% (pH 7,0), por um período mínimo de 30 dias para desinfecção (referência). Posteriormente, os dentes foram seccionados na porção cervical, separando coroa e raiz, em uma cortadeira elétrica Isomet (Buehler®), utilizando um disco diamantado dupla face (Buehler® Diamond Wafering Blade no 11-4243 da série 15 HC). As coroas foram seccionadas, obtendo-se blocos dentais com dimensões de 4 x 4 mm. Após a obtenção dessas amostras, estas tiveram suas alturas reduzidas para 2,2 - 2,5 mm através da planificação da porção dentinária. Para tal, as superfícies dos blocos de esmalte foram fixadas com cera pegajosa contra a superfície de um disco de resina acrílica pré-fabricado com a dentina voltada para cima. A dentina foi então planificada com lixa de granulação 400 em politriz (AROTEC APL-4), verificando-se a espessura dos blocos com um paquímetro digital. Toda a planificação foi realizada com refrigeração à água. Após a planificação, o conjunto contendo bloco dental e disco de acrílico foi levado a um aparelho de ultra-som (T7, Thorton), onde permaneceu por 2 min, em água purificada para a limpeza da superfície de esmalte. Os blocos foram descolados dos discos de resina acrílica e colados novamente com cera pegajosa, porém com o esmalte voltado para cima. Foram lixados e polidos, por meio de uma máquina politriz AROTEC APL-4, com lixas de granulação de 400 a 1200 seguidas por disco de feltro e suspensão diamantada, deixando a porção central plana. Entre uma lixa e outra os blocos foram levados em ultra-som (T7, Thorton), durante 2 min, utilizando água purificada e ao final com solução detergente.

3.3 Seleção inicial dos blocos

Com o intuito de selecionar blocos dentais com valores

de microdureza Knoop de superfície padronizados e determinar a dureza inicial dos blocos de esmalte, 3 edentações foram realizadas próximas à região central de cada bloco, utilizando um microdurômetro (Future-Tech FM hardness tester, acoplado ao software FM-ARS 900) e penetrador tipo Knoop, carga de 50 g por 5 s, mantendo-se 100 µm de distância entre cada edentação. O critério de seleção foi baseado na média e desvio padrão da dureza de cada bloco dental. Foram excluídos os blocos dentais que apresentaram desvio padrão maior que 10% de sua média de dureza individual (variabilidade intrablocos) e aqueles que apresentaram sua média individual de dureza maior ou menor do que 10% da média da dureza calculada para todos os blocos obtidos (variabilidade entre blocos). Os blocos selecionados apresentaram dureza de $318,9 \pm 11,7$ kg/mm².

3.4 Indução da lesão cariosa artificial

Para a indução de lesões cariosas subsuperficiais, foi preparada solução desmineralizante, composta por tampão acetato 0,1 M pH 5,0, 1,28 mM de cálcio, 0,74 mM de fósforo inorgânico e 0,03 µg/ml de fluoreto. Esta solução é 50% saturada em relação ao esmalte dental bovino (Queiroz et al., 2008). Posteriormente foram realizadas dosagens de cálcio, fósforo e flúor desta solução, para confirmar as concentrações da fórmula. Os valores encontrados após as dosagens foram 0,03 µg F/mL, 1,36 mM Ca e 0,7 mM de Pi e estão dentro da margem aceitável de erro, considerando o preparo da solução e sua análise. A indução da lesão cariosa artificial dos blocos dentais selecionados pela dureza de superfície inicial foi feita por imersão destes na solução desmineralizante, na proporção de 2 mL de solução por mm² de esmalte, durante 16 h a 37°C.

3.5 Seleção dos blocos dentais após indução da lesão cariosa

Os blocos foram selecionados considerando sua dureza de superfície de esmalte, a qual foi determinada novamente após a indução das lesões cariosas artificiais, sendo utilizado o microdurômetro Future Tech modelo FM-7 acoplado a um software FM-ARS e com penetrador tipo Knoop, com carga de 50 g por 5 s (Fushida & Cury, 1999; Aires et al., 2006). Foram realizadas outras 3 edentações na região central dos blocos dentais, a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) foi calculada e o critério de

seleção foi baseado na média e desvio padrão dos valores de %PDS de cada bloco dental conforme descrito anteriormente. Os blocos selecionados apresentavam %PDS de 74,7 a 87,7, média de 82,2 com desvio padrão de 3,7. Após a seleção dos blocos dentais, os mesmos foram aleatorizados e distribuídos entre os grupos de tratamento, utilizando-se planilha do Excel e número aleatório.

3.6 Preparo das soluções de tratamento

Para a ciclagem de pH, foi preparada solução de tratamento contendo NaF na concentração de 226 µg F/mL e pH 5,0, com água purificada, que foi tamponada ou não com tampão histidina 0,1 M, solução desmineralizante contendo tampão acetato 0,1 M pH 5,0, 1,28 mM de cálcio, 0,74 mM de fósforo inorgânico e 0,03 µg/ml de flúor e solução remineralizante composta por tampão Tris 0,1 M pH 7,0 contendo 1,5 mM de Ca, 0,9 mM de Pi, 150 mM de KCl e 0,05 µg F/mL. O ajuste do pH das soluções foi feito utilizando-se eletrodo de pH e peagômetro calibrado com soluções de pH 4,0 e 7,0 e acréscimo de HCl ou NaOH. Para a dosagem de F nas soluções de tratamento previamente ao seu uso, amostras das mesmas foram diluídas e, em seguida, misturadas com TISAB II (tampão acetato 1 M, pH 5,0, contendo NaCl 1 M e CDTA a 0,4%) na proporção de 1:1. A determinação de F foi feita em duplicata e utilizando eletrodo específico ORION 96-06 e analisador de íons EA 940, previamente calibrado (Arthur et al., 2007).

3.7 Ciclagem de pH

Vinte blocos dentais para cada grupo de tratamento foram submetidos, durante 8 dias, a um regime de ciclagens de pH (Queiroz et al., 2008). Os blocos foram mantidos individualmente na solução desmineralizante durante 2 h (6,25 mL/mm²), e na solução remineralizante a cada dia (3,12 mL/mm²), a 37°C. Este ciclo foi repetido diariamente e no quarto dia, as soluções des e remineralizantes foram trocadas por soluções frescas. Os blocos foram imersos nas soluções de tratamento por 1 min três vezes por dia (9, 14 e 17 h) na proporção de 2 mL de solução/mm² de superfície de esmalte dental exposto em uma mesa agitadora à 100 rpm, em temperatura ambiente. Após mais 4 dias de ciclagens, a remineralização da lesão cariiosa foi avaliada.

4. Análises Laboratoriais

Determinação de flúor nas soluções des e remineralizantes

Para a dosagem de F nas soluções des e remineralizantes, amostras das mesmas foram misturadas com TISAB III na proporção de 1:1. A determinação de F foi feita em duplicata e utilizando eletrodo específico ORION 96-06 e analisador de íons EA 940, previamente calibrado (Arthur et al., 2007). A solução desmineralizante após o preparo apresentou 0,03 µg F/mL e a remineralizante 0,05 µg F/mL.

Determinação de dureza de superfície e do esmalte seccionado longitudinalmente pós tratamento:

Ao final do ensaio de ciclagens de pH, a dureza de superfície (DS) do esmalte foi novamente determinada e a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS) foi calculada através da fórmula:

$$\frac{100 (DS \text{ após ciclagem} - DS \text{ pós-cárie})}{(DS \text{ inicial} - DS \text{ pós-cárie})}$$

Ao final do experimento, foram selecionados aleatoriamente 15 blocos dentais de cada grupo de tratamento, os quais foram cortados transversalmente por corte longitudinal com uso de disco diamantado acoplado à cortadeira elétrica. Um dos hemiblocos foi embutido (embutidora Arotec Pre 30) em resina acrílica incolor, ficando a parte seccionada exposta. Para possibilitar as análises da lesão de cárie, a superfície seccionada do esmalte foi lixada e polida com lixas de granulação 320, 600 e 1200 e refrigerada com água purificada. Discos de feltro com suspensão de 1 micron também foram utilizados para dar polimento final e em seguida a dureza foi determinada. Para tanto as impressões foram realizadas no centro do bloco, às distâncias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µm da superfície do esmalte, todas com carga de 25 g e tempo de 5 s. Então, as médias das durezas nas três posições do hemibloco a cada distância da superfície foram calculadas. A área de lesão (ΔS) foi calculada por integração numérica usando regra do trapézio pela diferença entre a área abaixo da curva da superfície do esmalte (kg/mm² x µm) e a área de desmineralização. Os dados foram expressos como número de dureza Knoop (kg/mm²) versus distância da superfície (Ana et al., 2012).

5. Análise Estatística

Todas as análises foram executadas com auxílio do software BioEstat (versão 5.0; Ayres et al. 2007), com nível de significância estabelecido em 5%. Os dados que não satisfizeram as pressuposições foram transformados e feitos os ajustes adequados para a análise de variância. Para os dados de F no esmalte, foi realizada transformação para logaritmo na base 10. Os dados de %RDS, ΔS e F no esmalte foram analisados pela análise de variância complementado pelo teste de Tukey.

6. Resultados

A tabela 1 apresenta a média da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS), área da lesão cariosa (ΔS ; Kg/mm² x μm) e F no esmalte ($\mu\text{g F/cm}^2$) dos blocos dentais após a ciclagem de pH. O grupo flúor + histidina apresentou numericamente maior valor de %RDS que os grupos controle negativo e flúor, entretanto diferiu significativamente apenas no grupo controle negativo e não diferiu estatisticamente do grupo flúor.

Tabela 1. Porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS), área da lesão cariosa (ΔS ; Kg/mm² x μm) e F no esmalte ($\mu\text{g F/cm}^2$) dos blocos dentais em função dos tratamentos.

GRUPOS DE TRATAMENTO	% RDS (n=20)	ΔS (Kg/mm ² x μm ; n=15)	F no esmalte ($\mu\text{g F/cm}^2$; n=5)
Controle Negativo ¹	29,4 ± 13,95 a	9887,8 ± 1905,0 a	1,6 ± 0,4 a
Flúor ²	42,4 ± 13,24 b	7988,6 ± 1828,9 b	6,9 ± 4,6 b
Flúor + Histidina ³	45,5 ± 17,13 b	6801,7 ± 1838,2 b	6,9 ± 2,6 b

¹solução de histidina 0,1 M pH 5,0

²solução contendo 226 $\mu\text{g F/mL}$ pH 5,0

³solução contendo 226 $\mu\text{g F/mL}$ e histidina 0,1 M pH 5,0.

Letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de tratamento.

No gráfico 1 está representada a porcentagem de recuperação de dureza de superfície dos blocos dentais após o experimento. Houve uma maior %RDS nos blocos de esmalte tratados com a solução fluoretada tamponada com histidina, no entanto, estes dados não diferiram significativamente daquele do grupo tratado apenas com flúor. Os blocos tratados com solução de histidina (controle negativo) apresentaram a menor %RDS dos grupos do presente estudo e este grupo diferiu significativamente dos 2 grupos com flúor, com ou sem tampão histidina.

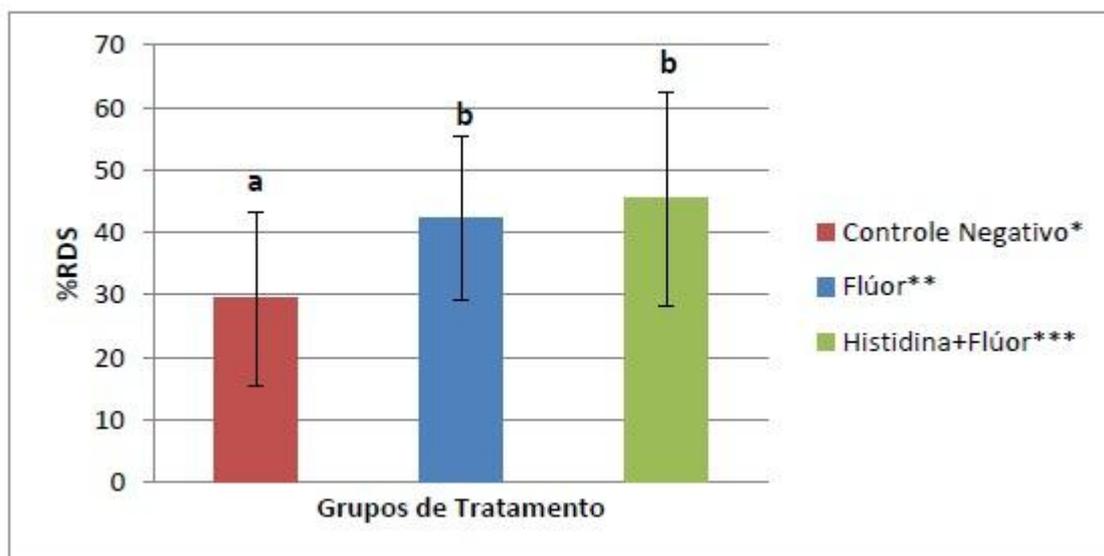


Gráfico 1. Porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%RDS; média) dos blocos dentais em função dos tratamentos (n=20). As barras denotam o desvio-padrão. * solução de histidina 0,1 M pH 5,0; **solução contendo 226 µg F/mL pH 5,0; ***solução contendo 226 µg F/mL e histidina 0,1 M pH 5,0.

No gráfico 2 está representada a área da lesão cariiosa dos blocos dentais após o experimento. Os blocos tratados com solução de histidina (controle negativo) apresentaram maior área de lesão cariiosa entre os grupos do presente estudo e este grupo diferiu significativamente dos 2 grupos com flúor, com ou sem tampão.

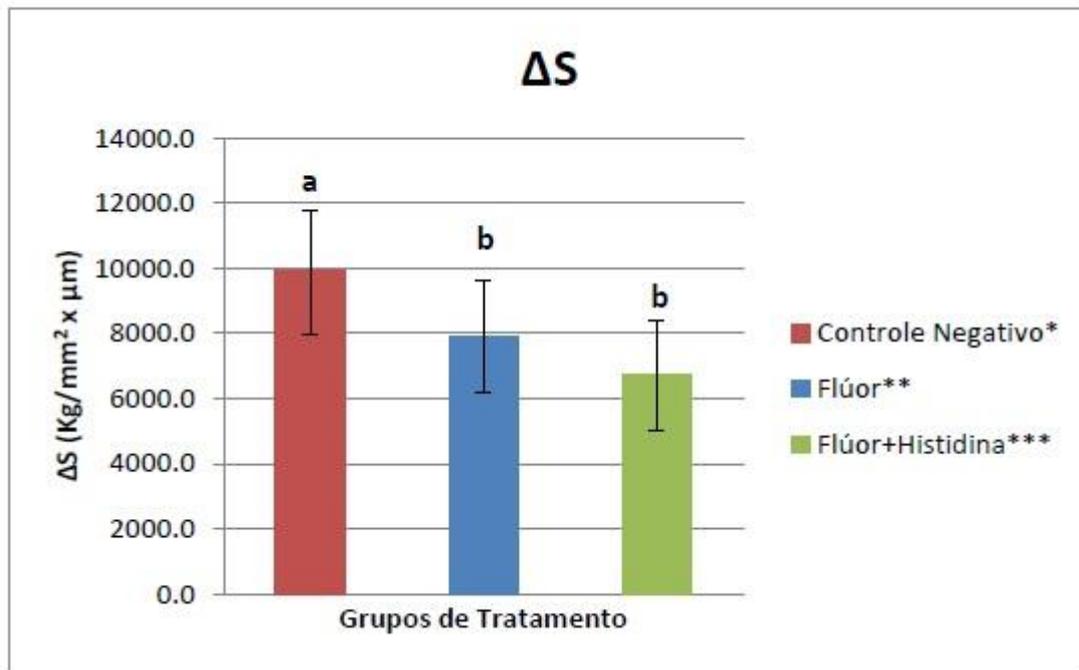


Gráfico 2. Área da lesão cariada (ΔS ; Kg/mm² x μm ; média) dos blocos dentais em função dos tratamentos (n=15). As barras denotam o desvio-padrão. *solução de histidina 0,1 M pH 5,0; **solução contendo 226 μg F/mL pH 5,0; ***solução contendo 226 μg F/mL e histidina 0,1 M pH 5,0.

No gráfico 3 está apresentada a média da concentração de flúor presente no esmalte dos blocos dentais depois da ciclagem de pH. O grupo controle negativo apresentou numericamente a menor concentração de flúor fortemente ligado do que os grupos flúor e flúor+histidina, que obtiveram praticamente o mesmo resultado.

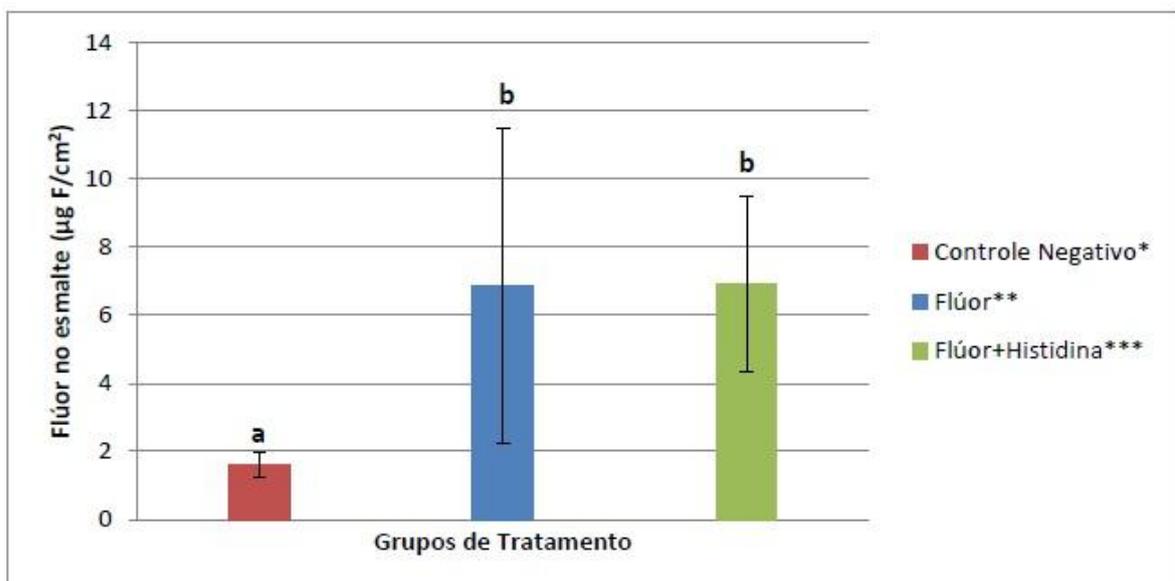


Gráfico 3. Concentração de flúor fortemente ligado ($\mu\text{g F/cm}^2$; média) dos blocos dentais em função dos tratamentos (n=5). As barras denotam o desvio-padrão. *solução de histidina 0,1 M pH 5,0; **solução contendo 226 $\mu\text{g F/mL}$ pH 5,0; ***solução contendo 226 $\mu\text{g F/mL}$ e histidina 0,1 M pH 5,0.

7. Discussão

Os dados obtidos sugerem que o tamponamento de uma solução fluoretada não aumentou a remineralização dos blocos dentais com lesão cáries artificial, apesar de estudos anteriores terem mostrado uma maior reatividade do esmalte com lesão de cárie com solução fluoretada contendo um tampão (Arthur et al., 2007; Vieira Jr., 2010). Estes achados estão suportados pelos dados de %RDS e área de lesão cáries obtidos, cujos valores para o grupo flúor+histidina não diferiram estatisticamente daqueles do grupo de tratamento com flúor. Vale ressaltar que, em relação à ciclagem de pH, a duração do tratamento dos blocos dentais com as soluções foi de 1 minuto, o que está proposto pelo modelo *in vitro* utilizado (Queiroz et al., 2008). Entretanto, talvez este tempo possa ter sido pouco, considerando que após um bochecho com uma solução fluoretada os níveis de flúor na saliva permanecem elevados por um tempo superior à duração do bochecho em si. Assim, num estudo futuro poderia ser testado um tempo de tratamento dos blocos dentais com as soluções por cerca de 5 minutos.

Não foi observado também aumento na incorporação de flúor no esmalte quando a solução fluoretada foi associada ao tampão. Assim, a princípio, poderia ser sugerido que os resultados do presente estudo não estão de acordo com aqueles encontrados por Vieira Jr (2010), que verificou que o tamponamento da solução fluoretada aumentou a reatividade do F com o esmalte dental com lesão cáries. No entanto, o principal mecanismo envolvido na formação de fluorapatita, que é o que de fato foi avaliado no presente estudo, é resultado dos ciclos de desmineralização/remineralização que ocorrem no meio bucal, na presença do fluoreto. Assim, pode ter havido uma maior reatividade da solução fluoretada tamponada com histidina durante o tratamento com a mesma com formação de fluoreto fracamente ligado, porém não refletiu numa maior incorporação de F pelo mineral durante a ciclagem. Em acréscimo, o tamponamento da solução fluoretada foi feito com histidina, um aminoácido, que apresenta pKa de 6,05. E o pH 5,0 da solução fluoretada proposta

já estaria no limite de ação deste tampão. Entretanto, outros tampões poderiam ser testados desde que não interferissem com a reatividade do flúor com o esmalte dental ou com a dinâmica de perda e ganho de minerais que ocorre durante os modelos de ciclagem de pH. O tampão acetato (pKa 4,76) é uma possibilidade.

8. Conclusão

Dentro das limitações e nas condições do presente estudo in vitro, os dados obtidos sugerem que o tamponamento de uma solução fluoretada não aumentou a remineralização do esmalte dental com lesão cariiosa.

9. Referências Bibliográficas

1. Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA: Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res* 2006; 40:28-32.
2. Ana PA, Tabchoury CP, Cury JA, Zezell DM: Effect of Er,Cr:YSGG laser and professional fluoride application on enamel demineralization and on fluoride retention. *Caries Res* 2012; 46:441-451.
3. Arthur RA, Tabchoury CPM, Giancristófaró M, Del Bel Cury A, Cury JA. Effect of preservatives on reactivity of fluoride with dental enamel. *RGO* 2007; 55(4): 375-80.
4. Barkvoll P, Rölla G, Lagerlof F. Effect of sodium lauryl sulfate on the deposition of alkali-soluble fluoride on enamel in vitro. *Caries Res* 1988; 22(3): 139-44.
5. Barkvoll P. Effect of sodium lauryl sulfate on the uptake of fluoride NaF and MFP by etched enamel in vitro. *J Biol Buccale* 1991; 19(3): 235-9.
6. Bratthall D, Hansel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci.* 1996; 104: 416-422.
7. Cummins. Working group report 3: Role of models in assessing new agents for caries prevention. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 338-339.
8. Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997; 31: 356-60.
9. Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J.* 2004; 15(3): 167-174.
10. Cury JA, Tenuta LMA. How to Maintain a Cariostatic Fluoride Concentration in the Oral Environment. *Adv Dent Res.* 2008; 20 (1): 13-16.
11. Delbem AC, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent* 2002; 15(3): 169-72.
12. Delbem AC, Carvalho LP, Morihisa RK, Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2005; 39: 258-260.
13. Featherstone JD, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S: Enhancement of remineralisation in vitro and in vivo. In: Leach SA (ed); *Factors Affecting De- and Remineralization of the Teeth.* 1986; 23-34.
14. Featherstone JD, Stookey GK, Kaminski MA, Faller RV: Recommendation for a non-animal alternative to rat caries testing. *Am J Dent* 2011; 24: 289-294.

15. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004; 38(3): 182-191.
16. Feldens CA, Giugliani ER, Duncan BB, Drachler Mde L, Vítolo MR. Long-term effectiveness of a nutritional program in reducing early childhood caries: a randomized trial. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010; 38(4): 324-332.
17. Feldens CA, Vítolo MR, Drachler Mde L. A randomized trial of the effectiveness of home visits in preventing early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007; 35(3): 215-223.
18. Franco EM, Cury JA. Bochecho com Plax e reatividade do flúor. *RGO* 1993; 41: 283-286.
19. Franco EM, Cury JA. Effect of plax prebrushing rinse on enamel fluoride deposition. *Am J Dent* 1994; 7:119-121.
20. Friberger P. The effect of pH upon fluoride uptake in intact enamel. *Scand J Dent Res* 1975; 83(6): 339-344.
21. Fushida CE, Cury JA. Estudo in situ do efeito da frequência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1999; 13: 127-134.
22. Kidd E. *Essentials of Dental Caries.* 3a Ed. Oxford, 2004.
23. Moi GP, Tenuta LMA, Cury JA. Anticaries potential of a fluoride mouthrinse evaluated in vitro by validated protocols. *Braz Dent J* 2008; 19(2): 91-96.
24. Nyvad B. The role of oral hygiene. In: Fejerskov O, Kidd E. *Dental caries. The disease and its clinical management.* Oxford: Blackwell Munksgaard, 2008: 257-264.
25. Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 21-27.
26. ten Cate JM, Timmer K, Shariati M, Featherstone JD. Effect of timing of fluoride treatment on enamel de-and remineralization in vitro: a pH-cycling study. *Caries Res.* 1988; 22(1): 20-26.
27. ten Cate JM. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res.* 1990; 69 Spec N°:614-619; discussion 634-636.
28. ten Cate J M: Current concepts on the theories of mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol. Scand* 1999; 57: 325-329.
29. Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res.* 2010; 24 Suppl 1: 9-17.

30. Tenuta LM, Cury JA: Laboratory and human studies to estimate anticaries efficacy of fluoride toothpastes. *Monogr Oral Sci* 2013; 23:108-124.
31. Vieira Jr WF. Efeito do tamponamento na reatividade do fluoreto com o esmalte. 2010. 20f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, Piracicaba, 2010.
32. White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effect on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 1987; 21: 126-40.
33. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the theet. *Adv Dent Res*. 1995; 9(3): 175-193.