

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ÊNFASE EM CARIOLOGIA**

**LESÕES DE CÁRIE EM ESMALTE
SUBMETIDAS A DIFERENTES
TRATAMENTOS COM
FLÚOR TÓPICO *IN SITU***

Juliana Jobim Jardim

**Porto Alegre
Dezembro, 2003.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS
ÊNFASE EM CARIOLOGIA

Linha de Pesquisa:

Diagnóstico e tratamento da doença cárie

**LESÕES DE CÁRIE EM ESMALTE SUBMETIDAS A
DIFERENTES TRATAMENTOS COM
FLÚOR TÓPICO *IN SITU***

Juliana Jobim Jardim

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Marisa Maltz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito final para a obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica, ênfase em Cariologia.

Porto Alegre, dezembro de 2003.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Eni** e **Wolmer**, pelo amor e pela educação, pelo incentivo constante, por serem meus exemplos de perseverança, pelos sacrifícios e por transmitirem a certeza de que serão sempre o meu suporte.

Às minhas amadas irmãs, **Jerusa** e **Jeovana**, pelo amor e pela amizade, pela compreensão, pela dedicação ao meu bem-estar e por terem vivido comigo os momentos mais importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Dr^a. **Marisa** Maltz, meu exemplo de mestre e de pesquisadora, pelo incentivo em buscar sempre o melhor e mostrar que o esforço sempre vale a pena. Pela preocupação com o meu crescimento e minha formação, por todos os ensinamentos compartilhados e pela compreensão.

À querida amiga **Marcele** Azambuja Pagot, que tornou esta jornada muito mais divertida. Pela amizade incondicional, pelo apoio constante, pelas incontáveis trocas de idéias durante a realização deste trabalho, por todos os momentos de “stress” e alegria compartilhados, por nunca me deixar desanimar e por estar sempre lá quando precisei.

À **Clarissa** Fatturi Parolo, grande amiga com a qual descobri várias afinidades e a quem admiro. Pela simpatia e amabilidade, por ter me recebido tão bem quando ingressei no laboratório. Pelos conhecimentos divididos e pelo incentivo, pela companhia e por estar sempre disposta a ajudar.

À amiga **Daniela** Jorge Corralo, pela amizade e cumplicidade durante a realização do mestrado. Minha companheira nas viagens e trabalhos, pela qual sinto muito carinho e agradeço a receptividade e o bom humor constantes. Um exemplo de dedicação e perseverança.

Às minhas **voluntárias** queridas, pelo comprometimento com o estudo e boa vontade.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas, funcionários e professores do curso de mestrado, especialmente às adoráveis amigas **Adriela** Mariath, colega desde os tempos do PET, a quem admiro pela competência científica e clínica, determinação e dedicação aos amigos; e **Ana** Eliza Lemes Bressani, pela inteligência, simpatia e por transmitir sempre otimismo. Meninas: vocês tornaram este período do mestrado muito mais agradável e divertido. Ao amigo **Alex Haas**, por estar sempre disposto a me auxiliar com a análise estatística. Aos colegas **Carlos** Grochau e **Luciano** Casagrande, pela convivência.

Ao Professor **Fernando** Borba de Araújo, pelos conhecimentos compartilhados e pelo exemplo de competência profissional. Por ter sempre a preocupação em ensinar e por ter contribuído para a minha formação, desde a graduação.

À professora **Berenice** Barbachan e Silva, pela receptividade e bom humor constantes, pelo companheirismo e pelo incentivo.

Ao **Laboratório de Materiais Cerâmicos - LACER** - da Escola de Engenharia da UFRGS, pela disponibilização de seus equipamentos para realização do meu trabalho. Aos pós-graduandos **Márcio** Dias Lima, **Mônica** Jung de Andrade e especialmente ao **Antônio** Shigueaki Takimi, pela enorme boa vontade com a qual me recebeu e auxiliou, por ser sempre tão amável e por nunca ter perdido o bom humor – muito obrigado mesmo!!

À acadêmica **Rochele** Mansan, pela dedicação e eficiência com as quais trabalhou para a realização deste trabalho.

Ao grupo **PET-Odonto-UFRGS**, por ter despertado em mim o gosto pela ciência e pela docência, e pelo aprendizado com o trabalho em grupo. À professora Maria **Antonieta** Lopes de Souza, que, apesar do pouco convívio, sempre será um

exemplo de profissional e grande incentivadora. À professora **Susana** Maria Werner Samuel, minha tutora, que me fez pensar não somente no conhecimento científico, mas também na importância de sermos cidadãos conscientes e atuantes. Pelos conselhos certos na hora certa.

Ao **Núcleo de Design e Seleção de Materiais – NdSM** - da Escola de Engenharia da UFRGS, especialmente aos professores **Wilson** Kindlein Júnior, coordenador do Núcleo, e Luís Henrique **Cândido**, pelo disponibilização do rugosímetro e pelo auxílio na realização dos ensaios.

Ao **Laboratório de Corrosão Eletroquímica – Eletrocorr** – da Escola de Engenharia da UFRGS, especialmente ao acadêmico **Rafael** Ramos, pela receptividade e auxílio nas etapas iniciais deste trabalho.

Ao **Laboratório Central de Saúde do Estado – Divisão de Análise de Produtos, Sessão de Físico-Química**, pela disponibilização de equipamentos e materiais para realização do ensaio de conteúdo de flúor. Especialmente à **Ângela** Pitta e à **Janete** Aguiar pela boa vontade com que me receberam, pelo auxílio nos procedimentos e por todos os conhecimentos compartilhados.

Ao **Laboratório de Metalurgia Física – LAMEF**, pela disponibilização do uso do microdurômetro, especialmente ao professor **Afonso** Reguly.

À professora **Lina** Hashizume, pela simpatia e pela disponibilidade em me ajudar durante a realização dos experimentos.

Ao professor **Paulo** Peres, pela ajuda nas etapas iniciais deste trabalho.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa do **Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal – LABIM**, pelo auxílio na execução desta pesquisa.

Ao **Sérgio Kato**, pela análise estatística.

Ao professor **Diego** Groisman, pela boa vontade e presteza com as quais realizou a revisão de inglês do artigo.

À **CAPES** que tornou possível a realização dos meus cursos de Graduação e Pós-Graduação através de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA	11
PROPOSIÇÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ARTIGO CIENTÍFICO	42
Introduction	42
Materials and Methods	42
Results	50
Discussion	56
Acknowledgments	58
References	58
ANEXO	61

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar se a aplicação tópica de flúor fosfato acidulado (FFA) em alta concentração tem efeito adicional no controle de lesões de esmalte, comparado ao uso de dentifrício fluoretado (baixa concentração). A frequência de FFA como auxiliar no tratamento de lesões de cárie e a deposição de flúor no esmalte após diferentes aplicações de flúor em alta e baixa concentração também foram avaliadas. Para tanto, 5 indivíduos utilizaram, por 42 dias, próteses parciais removíveis inferiores contendo blocos de esmalte bovino desmineralizados. Os espécimes de esmalte foram divididos em 5 grupos: (1) escovação 3 vezes ao dia com dentifrício fluoretado (DF) (1100 ppm F), (2) DF+1 aplicação tópica FFA (12300 ppm F), (3) DF+2 FFA, (4) DF+3 FFA, e 5) DF+4 FFA. O intervalo entre as aplicações foi de uma semana. Cinco blocos hígidos e 5 blocos desmineralizados foram utilizados como controle e não foram submetidos ao período intraoral. As alterações clínicas foram registradas com relação à textura, coloração e brilho superficiais. Análises de microdureza superficial (MS) e em cortes longitudinais (MCL), de rugosidade superficial (RS) e de conteúdo de flúor depositado no esmalte foram realizadas. Modificações clínicas semelhantes de coloração foram observadas em todos os grupos após formação da lesão *in vitro*, apesar da ausência de mudanças na textura e brilho superficiais. Após escovação e tratamento com flúor, todos os blocos desmineralizados (esbranquiçados), independentemente do tratamento, tornaram-se mais amarelados. Não foram detectadas mudanças na textura e brilho superficiais. Os valores de MS e de conteúdo de flúor aumentaram ($p < 0,05$) em relação aos blocos desmineralizados somente a partir de 2 FFA. Os valores de MCL não mostraram diferenças entre os blocos tratados e os desmineralizados em qualquer distância da superfície do esmalte. Os grupos DF+3 FFA e DF+ 4 FFA foram os únicos capazes de aumentar os valores de MS em relação aos blocos desmineralizados. Estes tratamentos levaram a um aumento significativo de flúor solúvel e insolúvel comparado aos espécimes hígidos e desmineralizados. Ainda que todas as lesões tenham sido controladas clinicamente e não mostrem diferenças de microdureza, parece que aquelas tratadas com maior número de FFA produziram um maior reservatório de flúor disponível para inibir novos processos de desmineralização.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate whether the topical fluoride application (acidulated phosphate fluoride - APF) at high concentration has an additional effect on the control of enamel lesions compared to fluoride dentifrice (low concentration). Furthermore it was also evaluated: (a) the frequency of APF treatment on the arrestment of caries lesions and (b) the amount of fluoride deposited on enamel surface after application of high and low fluoride concentrations. Five subjects with a lower removable partial denture volunteered for the study. Five demineralized blocks were fixed into the buccal surface of each partial denture. The volunteers wore the prosthesis during 42 days and brushed all specimens three times daily for 1 min with fluoride dentifrice (FD) (1100 ppm F). Besides the FD treatment, 4 specimens were submitted to APF gel topical applications (12300 ppm F) on different weekly frequencies (1, 2, 3 and 4 applications). Five sound enamel blocks and 5 demineralized blocks were stored and used as control. The enamel blocks were clinically examined at baseline, after demineralization and after intraoral procedures. Data regarding surface color, brightness and texture were recorded. The specimens' surface (SMH) and cross-sectioned (CSMH) microhardness, surface roughness and fluoride (soluble and non-soluble) content were analyzed. After tooth brushing and fluoride treatment, all demineralized blocks (whitish) became yellowish. Changes in surface brightness and texture were not detected. SMH and fluoride content analysis increased ($p < 0,05$) compared to demineralized blocks only after 2 APF. CSMH values showed no differences among demineralized and treated groups at any enamel depth. This study shows that FD+3 and 4 APF were the only treatments capable of increasing SMH values compared to demineralized blocks. These treatments lead to a significant increase of soluble and non-soluble fluoride compared to demineralized and sound specimens. Although all treatments lead to clinical arrestment and equal microhardness values, it seems that the enamel treated with high frequency of APF produces a larger reservoir of fluoride ions. This fluoride reservoir may enhance enamel resistance to future demineralization processes.

1. Formação da lesão de cárie

A estrutura mineral dentária depende do ambiente oral. Quando exposta ao meio bucal, alterações de temperatura, capacidade tampão e pH da placa podem levar à solubilização dos cristais de hidroxiapatita. Em normalidade, cálcio e fosfato estão presentes na saliva em condição de supersaturação em relação ao esmalte, favorecendo a manutenção do estado cristalino deste tecido quando em pH 6,8 (WOLINSKY, 1994; CURY, 2001). Alterações na dieta com a conversão de carboidratos em ácido pelas bactérias da placa levam a variações no pH. A saliva possui um efeito protetor limite para o esmalte até o pH 5,5 (pH crítico). Valores de pH inferiores a este criam condições para que haja aumento da solubilidade e dissolução dos cristais do esmalte. Quando episódios de redução do pH são intercalados por períodos maiores de retorno ao pH fisiológico, há um retorno ao equilíbrio entre os íons provenientes da saliva e do esmalte dentário. No entanto, quando períodos de pH crítico tornam-se mais freqüentes, pode ocorrer o predomínio da saída de íons do dente, formando uma lesão de cárie (WOLINSKY, 1994; FEATHERSTONE, 1999; CURY, 2001). As perdas minerais que ocorrem, primeiramente, em nível ultra-estrutural, podem chegar até a destruição total da peça dentária.

O controle desse desequilíbrio entre os processos de des e remineralização, levando à paralisação do desenvolvimento da lesão, pode ser obtido através da modificação de fatores locais, como alterações na dieta, no padrão de higiene bucal e com o uso de fluoretos (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

A compreensão do processo de formação e paralisação da lesão possibilita o diagnóstico de estágios mais precoces de perda mineral, assim como o estabelecimento de medidas de controle de progressão da lesão. Para tanto, a

estrutura do esmalte e os fenômenos que nele ocorrem durante os estágios de des e remineralização devem ser estudados.

2. Processo de desmineralização

O esmalte é a estrutura mais mineralizada do corpo humano, sendo constituído 95% por minerais e 5% por matéria orgânica. O mineral predominante é a hidroxiapatita, integrante da família de sais de fosfato de cálcio, representada pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Na estrutura da hidroxiapatita, os cristais estão arranjados em uma configuração hexagonal, com átomos de cálcio e fósforo na parte externa do cristal, e, no centro, grupamentos hidroxila estão circundados por 3 átomos de cálcio. Os cristais do esmalte possuem, aproximadamente, 40 nm de diâmetro. A relação de cada grupamento hidroxila no cristal desempenha um papel importante em sua estabilidade. Os cristais estão agrupados em prismas com cerca de 4-5 μm de diâmetro, constituindo o esmalte. Entre cada prisma, há uma matriz orgânica, constituída por proteína, lipídeos e água. Dessa forma, ainda que o esmalte pareça extremamente duro e bem mineralizado, sua superfície é porosa, permitindo a passagem de íons pequenos, como sódio, potássio, magnésio e flúor. Sendo a solubilidade da hidroxiapatita dependente da temperatura, do pH e das ligações iônicas do solvente adjacente ao cristal, alterações nesses parâmetros podem levar a uma solubilização dos cristais. Na cavidade bucal, a saliva é supersaturada de cálcio e fosfato, favorecendo o estado cristalino do esmalte. Como resultado, o dente não dissolve. Devido à natureza da reação de equilíbrio da cavidade bucal, o esmalte se encontra em um estado constante de mineralização e desmineralização em condições fisiológicas (cálcio e fosfato supersaturados, pH 6.8). Porém, quando o chamado pH “crítico” (5,5) é atingido, a solubilidade é aumentada e a dissolução ocorre. A hidroxiapatita é desestabilizada pelo efeito ácido nos grupamentos hidroxila do centro do cristal, resultando em formação de água. A forma dissociada do fosfato de cálcio é favorecida e o cristal é dissolvido (WOLINSKY, 1994; FEATHERSTONE, 1999).

Segundo Chow (1990), a desmineralização do tecido dentário consiste de 2 processos: (1) dissolução do mineral no *front* da lesão, e (2) processo de difusão nos quais íons ácidos são transportados da placa para o interior da lesão, e íons do mineral dentário solubilizados são transportados para fora. Na maioria das vezes, a difusão é o mais lento dos 2 mecanismos. Uma vez que a dissolução é o processo mais rápido, o fluido na lesão é quase saturado com relação ao mineral dentário. A composição do fluido da lesão, portanto, é um dos fatores principais no governo das forças de difusão para vários íons, e, em última instância, da velocidade de desmineralização.

As alterações no conteúdo de íons minerais têm como consequência mudanças na dureza do esmalte. Feagin, Koulourides e Pigman (1969), em estudo *in vitro*, estabeleceram uma relação linear entre a microdureza superficial do esmalte e o conteúdo de Ca e P. Espécimes que sofreram desmineralização sob diferentes condições experimentais apresentaram redução na microdureza superficial, sempre acompanhada por reduções no conteúdo de Ca e P, tanto para espécimes de esmalte humano quanto de esmalte bovino.

Quando ocorre um desequilíbrio do processo de des-remineralização, favorecendo períodos mais frequentes de saída de íons do tecido mineral dentário, levando à destruição deste, ocorre a formação da lesão de cárie (MALTZ e CARVALHO, 1997).

2.1. Histopatologia da lesão de cárie em esmalte

As características histológicas da lesão de cárie sem cavidade são descritas por diversos autores sob a forma de 4 zonas: camada superficial, corpo da lesão, zona escura e zona translúcida.

2.1.1. Zona translúcida

A espessura da zona translúcida varia entre 5 a 100 μ m, com média de 40 μ m (SILVERSTONE, 1968). Quando a lesão atinge estágios mais avançados, a zona translúcida passa a estar localizada na parte mais interna da lesão, entre a zona escura e o esmalte hígido. O volume de poros nesta zona da lesão é de 1%, sendo estes de diferentes tamanhos (DARLING, 1958; SILVERSTONE, 1973).

2.1.2. Zona escura

A zona escura recebeu esta denominação devido à aparência marrom escura assumida quando observada em microscopia de luz transmitida, embebida em quinolina, meio com índice de refração similar ao do esmalte (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995). O volume de poros varia entre 2 e 4% (DARLING, 1958). Com a progressão da lesão, situa-se entre o corpo da lesão e a zona translúcida. Apresenta birrefringência positiva. É considerada como resultado do processo dinâmico de desmineralização e remineralização (SILVERSTONE, 1973).

2.1.3. Corpo da Lesão

O corpo da lesão está situado entre a camada superficial e a zona escura, apresentando acentuada descalcificação (SILVERSTONE, 1966). O volume de poros varia de 5% na periferia, até 25% no centro da lesão (DARLING, 1958). Possui birrefringência positiva quando em meio aquoso (SILVERSTONE, 1973). Na profundidade do corpo da lesão, pode-se encontrar zonas com maior conteúdo mineral, indicando períodos de redeposição mineral em fases alternadas de atividade/controlado das lesões.

2.1.4. Camada Superficial

A camada superficial possui volume de poros menor do que 5% e apresenta birrefringência negativa quando a lesão é embebida em água para análise em microscopia de luz polarizada. Estudos em microrradiografia sugeriram que esta camada permanecia intacta durante o ataque cariogênico, porém, estudos em nível ultraestrutural comprovaram que esta camada apresenta intensa

desmineralização sendo, entretanto, mais estruturada do que o corpo da lesão (HOLMEN *et al*, 1985b).

2.2. Características clínicas da lesão de cárie ativa

Clinicamente, a cárie de esmalte é observada como uma lesão de mancha branca opaca, assumindo esta aparência devido à mudança do índice de refração da área de perda mineral, quando comparada com o do esmalte translúcido adjacente (FEATHERSTONE, 1999). Através da secagem do dente, os poros das diferentes zonas da lesão, inicialmente preenchidos por água (índice de refração = 1,33), são embebidos em ar (índice de refração = 1,0), o qual possui um índice de refração diferente do esmalte dentário (índice de refração = 1,62). Essa diferença nos índices de refração, associada à rugosidade superficial, faz com que a lesão de mancha ativa apresente-se opaca (THYSLTRUP e FEJERSKOV, 1995).

O aumento na porosidade da camada superficial do esmalte também é responsável pela mudança na textura superficial das áreas com lesão de cárie, que se tornam rugosas à sondagem, diferentemente da lisura encontrada no esmalte hígido adjacente.

3. Processo de remineralização

Como toda reação ácido-base, a dissolução da hidroxiapatita constitui-se em um processo de equilíbrio. A perda de minerais da hidroxiapatita é resultante da subsaturação de íons cálcio (Ca) e fosfato (P) em relação à interface dente-placa. Porém, se a concentração de Ca local aumenta e/ou há aumento do pH, a placa volta a ficar supersaturada de íons Ca e P, ocorrendo o crescimento dos cristais parcialmente dissolvidos pela precipitação de íons minerais da fase aquosa que circunda o tecido (fluido da placa, da lesão e saliva), de forma que o processo de perda mineral é revertido (SHELLIS e DUCKWORTH, 1994). Assim, controlando-se os fatores etiológicos da doença, propicia-se o retorno à condição

de equilíbrio dos processos des-mineralização e o controle da progressão da lesão é alcançado.

Wei (1970) realizou estudo *in vitro* no qual analisou, com microsonda eletrônica, a concentração de cálcio e fósforo em esmalte humano hígido, desmineralizado e remineralizado. Coroas de dentes extraídos foram divididas em 3 grupos: 2 coroas foram mantidas hígidas para controle; 2 sofreram processo de desmineralização com tampão acetato por 5 horas, e 2 foram desmineralizadas de acordo com as anteriores e após colocadas em solução calcificante contendo Ca. As análises foram realizadas a 3, 6, 9, 12, 15 e 60 μ m da superfície externa do esmalte. A desmineralização do esmalte produziu uma queda na concentração de Ca e P, com uma redução na proporção de Ca/P. Esta redução, porém, só foi observada nos primeiros 10 μ m, provavelmente porque, nas condições experimentais adotadas, as mudanças ocorridas foram muito superficiais. A remineralização foi demonstrada com o retorno às concentrações de Ca e P aos valores normais, assim como a proporção de Ca/P, demonstrando que o mineral removido pelo tratamento ácido foi repostado com sucesso.

Dando continuidade a essa linha de pesquisa, Wei e Koulourides (1971) estudaram (*in vitro*) amostras de esmalte desmineralizado e subseqüentemente remineralizado com relação à microdureza superficial e conteúdo de Ca e P. Os resultados demonstraram que o esmalte desmineralizado pode ser quase completamente remineralizado até sua concentração inicial de Ca e P na correta proporção de Ca/P. A microdureza foi restaurada parcialmente, sugerindo que a hidroxiapatita não foi o único produto formado, podendo ter ocorrido a reprecipitação de um composto com uma proporção de Ca/P similar à da hidroxiapatita. Devido ao modelo experimental utilizado, as mudanças ocorreram somente nos primeiros 10 μ m do esmalte.

Em um estudo sobre os mecanismo de deposição mineral na remineralização de lesões de cárie artificiais em esmalte, ten Cate e Arends

(1980) concluíram que, inicialmente, uma grande quantidade de mineral é depositada na camada superficial em uma forma mais solúvel. Após um período mais prolongado, estes minerais são gradualmente transferidos, em uma forma menos solúvel, para a parte mais profunda da lesão, começando na área de menor densidade mineral no corpo da lesão, a partir de 25 μ m em relação à superfície.

A remineralização de lesões também foi demonstrada *in situ*, através do trabalho desenvolvido por Gelhard, ten Cate e Arends (1979), no qual a exposição de blocos de esmalte desmineralizados ao ambiente bucal, escovados sem dentífrico, levou a um aumento da microdureza superficial. Concluiu-se que a redeposição de minerais também ocorre *in vivo*, ainda que em menor velocidade se comparada à remineralização *in vitro*.

3.1. Histopatologia da lesão de cárie em esmalte inativa

Na lesão inativa, a *camada superficial* torna-se menos porosa, com cristais de tamanho aumentado. Silverstone e Poole (1968), em estudo realizado com secções de esmalte, observaram que, quando examinadas em quinolina, a extensão do *corpo da lesão* diminuiu, com conseqüente aumento da *zona escura* na direção da camada superficial. Este fenômeno também foi registrado por experimentos com esmalte de lesões de cárie sem cavidade (SILVERSTONE, 1980). Uma vez que estes experimentos foram realizados com soluções calcificantes sem material orgânico, e estes demonstraram maior efetividade do que a saliva em produzir estas mudanças, a diminuição na porosidade da lesão deve ter sido obtida pela deposição de minerais. O autor discute que pode haver 2 maneiras através das quais a deposição de mineral contribui para as mudanças ópticas produzidas na zona escura. A primeira delas seria um aumento na birrefringência negativa causado pela deposição de cristais de hidroxiapatita ou cristais de outros minerais. A segunda seria que a deposição de mineral em forma amorfa, ainda que não contribua para a birrefringência por si, pode resultar em

uma redução significativa na birrefringência positiva por ocluir os poros existentes. Esse processo é resultado tanto da entrada de íons provenientes do meio externo, quanto da precipitação de minerais das camadas mais internas do esmalte.

3.2. Características clínicas da lesão de cárie inativa

A inativação da doença tem como consequência clínica a modificação do aspecto da lesão, que passa a ser brilhosa e lisa, podendo permanecer esbranquiçada, pigmentar ou desaparecer (BACKER DIRKS, 1966; NYVAD e FEJERSKOV, 1997).

As alterações clínicas associadas ao controle da lesão são explicadas, em parte, pelo desgaste e polimento da microssuperfície externa parcialmente dissolvida da lesão ativa (HOLMEN, THYLSTRUP e ÅRTUN, 1987). Concomitantemente, ocorre o processo de reposição de mineral (remineralização), uma vez que a saliva é uma fonte de minerais que pode repor aqueles dissolvidos do dente durante o processo de desmineralização (FEATHERSTONE, 1999). Estudos sugerem que o controle da lesão envolve a remineralização e/ou um processo de “recristalização”, ocorrendo, inclusive, no corpo da lesão (TEN CATE e ARENDS, 1980; SILVERSTONE, 1980; SILVERSTONE, HICKS e FEATHERSTONE, 1988; KASHKET, 1999).

4. O flúor e o processo de remineralização

A presença de flúor no meio durante as trocas de íons entre os tecidos duros do dente e o fluido adjacente (saliva, fluido da placa bacteriana) pode interferir significativamente neste processo, tanto pela formação de fluorapatita (flúor firmemente ligado) quanto de fluoreto de cálcio (flúor fracamente ligado).

Feagin et al. (1971), em estudo do processo de des e remineralização *in vitro*, observaram que o esmalte remineralizado na presença de F apresenta maior

resistência a uma nova desmineralização do que o esmalte hígido. Estudos posteriores mostraram que a substituição do íon hidroxila na hidroxiapatita pelo íon flúor pode ocorrer, havendo, então, a formação de fluorapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ -, a qual é mais resistente à dissolução por ácidos (KOULOURIDES e CAMERON, 1980; CHOW, 1990; MORENO, 1993). O tecido dentário cariado é, ao contrário do esmalte hígido, muito reativo ao flúor. ●gaard, R●lla e Helgeland (1983b, 1984) mostraram, em estudo *in vivo*, que uma fração muito maior de flúor é incorporado ao esmalte com lesão de cárie do que no esmalte hígido adjacente. A placa que cobre a lesão pode aumentar a retenção de flúor. Além disso, o aumento da porosidade no esmalte permite maior penetração e aumenta a área para reações nas lesões de cárie. Como já discutido anteriormente, o fluido no interior da lesão é um dos principais fatores no direcionamento das forças de difusão de íons no processo de desmineralização. Quando o flúor está presente neste fluido, 3 efeitos principais podem ser produzidos (CHOW, 1990):

a) Redução da solubilidade do mineral dentário pela formação de fluorapatita (FA) – a hidroxiapatita (HA) possui uma constante de solubilidade 4 vezes maior do que a FA. Devido à ausência de grupamentos OH no cristal, a solubilidade da FA é menor em um determinado pH. Assim, o pH crítico para dissolução do esmalte passa de 5,5 para 4,5 na presença de flúor.

b) Redução da difusão de íon mineral da lesão – quando há quantidades significativas de ácidos e de flúor na placa, as concentrações de Ca e P no fluido da lesão são menores devido à combinação destes íons com conseqüente incorporação de flúor. As forças de difusão desses íons são diminuídas e isto deve levar a uma redução dos fluxos de difusão e à redução da velocidade de desmineralização.

c) Interações entre flúor ligado e flúor ambiente - o flúor incorporado pode ser liberado para auxiliar na inibição da desmineralização e na potencialização da remineralização, servindo como uma fonte de flúor ambiente.

Estudos *in vitro* evidenciam o efeito protetor do flúor incorporado aos cristais. Em estudo recente de Takagi, Liao e Chow (2000), a ação cariostática do flúor firmemente ligado foi discutida. Neste trabalho *in vitro*, aplicações tópicas de flúor fosfato acidulado (FFA) foram realizadas para incorporar flúor no esmalte e determinar seus efeitos na formação de cárie em condições nas quais o flúor fracamente ligado estava ausente. Espécimes de esmalte humano foram imersos em soluções contendo F em baixas concentrações por 2 dias, seguido de 5 ciclos de aplicações de FFA (1,23% F) por 4 minutos cada. Após, foi realizada a remoção do flúor fracamente ligado, seguido de 5 ciclos de imersão dos espécimes em solução desmineralizante por 6 horas e em solução remineralizante por 8 horas. O conteúdo de flúor firmemente ligado foi determinado para os 100 µm mais externos das lesões. As análises foram feitas através de microrradiografias e microscopia de luz polarizada. Os resultados sugerem uma relação entre o flúor (F) incorporado e a resistência a desmineralização, ao mostrarem diferenças significativas quanto ao conteúdo de flúor incorporado nos espécimes que sofreram aplicação de FFA em relação ao controle, além de uma menor profundidade de lesão formada (redução de 34%). O tratamento com F tópico também reduziu a extensão da desmineralização em cerca de 55%. Os efeitos significativos do F incorporado ao esmalte na desmineralização se deram, provavelmente, por 2 razões. Primeira: as 5 aplicações de FFA foram capazes de aumentar o conteúdo de F nos minerais dentários, ao contrário de outros estudos, nos quais uma aplicação de FFA não produzia efeitos significativos ou, se produzia, o efeito cariostático era atribuído ao fluoreto de cálcio formado. Segunda: o flúor fracamente ligado estava essencialmente ausente, certificando a ação cariostática dos minerais fluoretados. Embora alguns estudos sugiram que não há aumento no conteúdo de F fortemente ligado após uma aplicação tópica de flúor (FFA) *in vivo*, os resultados deste estudo sugerem que um acúmulo gradual de F incorporado ao esmalte pode ocorrer com repetidas FFAs. O F fortemente ligado pode ser um suplemento ao F fracamente ligado a fim de produzir uma maior proteção.

Além da formação de cristais de fluorapatita no interior dos prismas, ligações específicas, com trocas de íons, podem ocorrer também na superfície destes. A adsorção de F, com troca pelos grupamentos OH, converte parte ou toda a superfície em fluorapatita, que irá reduzir a solubilidade do esmalte e a velocidade de dissolução. O efeito da fluoretação superficial na dissolução depende da proporção de superfície convertida, uma vez que superfícies fluoretadas e não fluoretadas dissolvem de maneira independente, de acordo com suas propriedades de solubilidade. Esta fluoretação da superfície é importante, mas só será mantida se a solução que banha os cristais tiver F suficiente, caso contrário, todas as partes da superfície irão dissolver (SHELLIS e DUCKWORTH, 1994).

Se, em baixas concentrações, o flúor pode ser adsorvido aos cristais e estabilizar a estrutura mineral dentária, em altas concentrações (>100 ppm F), fluoreto de cálcio (CaF_2) pode ser formado (GAARD, 2001). Dependendo das condições orais, como pH da saliva ou do fluido da placa, esta camada de CaF_2 , que apresenta uma solubilidade aumentada em relação à hidroxiapatita e à fluorapatita, irá dissolver, liberando flúor para reagir com íons de Ca e P (NELSON, JONGLEBOED, ARENDS, 1983). Os produtos finais dessas reações podem ser cristais de fluorapatita ou CaF_2 novamente formado na superfície dentária. A camada de fluoreto de cálcio pode ser considerada um reservatório de íons de flúor disponíveis para inibir a desmineralização e potencializar a remineralização (KOULOURIDES et al, 1974; CURY, 2001).

Duschner, Götz e Gaard (1997) e Saxegaard e Rølla (1988), em estudos sobre a ação do flúor na estrutura mineral dos dentes, observaram, através de microscopia eletrônica de varredura, que o fluoreto de cálcio pode ser visualizado como pequenos glóbulos (< 1 μm) na superfície dentária ou em lesões, formando microcristais. A forma globular só é encontrada quando íons fosfato são adsorvidos à superfície, visto que o fluoreto de cálcio puro assume forma cúbica. Utilizando-se microscopia confocal de escaneamento a laser, pode-se identificar

que o CaF_2 é formado não só na superfície mas também no interior do esmalte até uma profundidade de mais ou menos 30 μm (DUSCHNER, GÖTZ e ●GAARD, 1997).

A formação do fluoreto de cálcio se dá quando íons de cálcio são liberados da estrutura dentária e reagem com o flúor do agente de aplicação tópica (LARSEN e JENSEN, 1994). Saxegaard e R●lla (1988) encontraram que a formação de CaF_2 pode ser intensificada pelo aumento da concentração de flúor do agente de aplicação tópica, aumentando o tempo de exposição e reduzindo o pH do produto. A formação de camada de CaF_2 também varia de acordo com a condição do esmalte, uma vez que maiores quantidades fluoreto de cálcio são encontradas em lesões de cárie quando comparadas com o esmalte hígido. No esmalte hígido, o fluoreto de cálcio é mais facilmente perdido, enquanto na lesão, por ser precipitado no ambiente microporoso da estrutura parcialmente desmineralizada, sua retentividade e área para interação iônica são maiores (BRUUN e GIVSKOV, 1991).

O fluoreto de cálcio não era considerado um produto importante para o efeito cariostático por ter sido considerado, através de estudos *in vitro*, muito solúvel. Porém, *in vivo*, uma camada de proteínas e fosfato recobre o CaF_2 e estabiliza as partículas do composto (●GAARD, 2001). Cavslavska et al. (1991) realizaram estudo clínico com crianças de 9 a 13 anos, no qual avaliaram, através de biópsias do esmalte, a permanência de CaF_2 nos períodos de 6 semanas e 18 meses após aplicações tópicas de flúor em tecido hígido. Quantidades significativa de flúor solúvel ainda foram encontradas após 6 semanas do tratamento, e pequenas quantidades persistiram na superfície do esmalte em 18 meses. Saxegaard e R●lla (1989), pesquisaram, em estudo *in situ*, a aquisição e perda do fluoreto de cálcio em esmalte hígido e desmineralizado e também confirmaram a maior estabilidade do composto no dente *in vivo* do que se pensava antigamente. Com uma velocidade de dissolução diminuída, a capacidade de atuar como um reservatório de flúor pode ter uma duração suficiente para apresentar significância

clínica. Ainda, o reconhecimento de que o flúor disponível na fase líquida do cristal de apatita e no fluido da placa é o mais importante durante o processo de desmineralização enfatiza que uma liberação lenta do depósito de CaF_2 é um fator muito importante no mecanismo cariostático de ação do flúor. Aplicações freqüentes de flúor tópico asseguram um depósito constante de CaF_2 na superfície dentária.

As implicações das reações do flúor com o esmalte desmineralizado no controle de lesões de cárie têm sido estudadas. Um resultado obtido com a remineralização de lesões de cárie naturais ou artificiais é que, em presença de flúor, há um aumento significativo do grau de remineralização e uma redução do período de tempo para que este processo ocorra (SILVERSTONE, 1982).

Histologicamente, sabe-se que, com a participação do F no processo de inativação, uma formação mais rápida e significativa da zona escura irá ocorrer, com conseqüente redução do corpo da lesão (SILVERSTONE, 1980).

Silverstone (1982), em estudo *in vitro*, mostrou que lesões artificiais de cárie em esmalte humano podem ser remineralizadas e que este processo é acelerado pela presença de flúor. Neste trabalho, secções de esmalte com cárie artificial foram expostas a diferentes fluidos remineralizadores: fluido bucal (saliva total) com ou sem F, e fluido calcificante sintético, com Ca ou Ca+F. Os espécimes foram analisados qualitativamente e quantitativamente por microscopia de luz polarizada. Após exposição ao fluido bucal, observou-se, qualitativamente, que quase a totalidade do corpo da lesão original foi revertido em zona escura, mostrando birrefringência positiva em quinolina. Esta mudança envolveu uma redução de 30-40% do volume de poros para cerca de 2-4%. Quantitativamente, a remineralização foi observada apenas na porção mais superficial das lesões (80 μm), provavelmente devido à deposição de conteúdo orgânico, “bloqueando” o espécime para uma remineralização das camadas mais profundas. Quando íons de flúor foram adicionados ao meio, uma maior remineralização pode ser

detectada, embora ainda limitada à porção inicial do corpo da lesão. Ao serem expostas ao fluido sintético, um percentual maior de remineralização pode ser alcançado, potencializado quando o flúor foi adicionado ao meio. Mostrou-se que a inclusão de flúor ao fluido levou a uma redução dobrada na porosidade tecidual. A remineralização ocorreu em toda a profundidade da lesão, com a redução na área do corpo da lesão passando de 28% na ausência de flúor para 69% na presença deste.

Gelhard, ten Cate e Arends (1979), em estudo *in vivo*, demonstraram o potencial remineralizador do flúor. Em um 1º experimento, blocos de esmalte bovino com lesões artificiais de cárie foram colocados em próteses parciais removíveis inferiores e escovados com água. Medições de microdureza superficial foram realizadas nos dias 2, 9, 30 e 65. Após, as próteses foram imersas por 15 min em uma solução neutra com 1000 ppm NaF e reutilizadas pelos voluntários por mais 2 semanas. No 2º experimento, blocos com lesões artificiais preparadas da mesma maneira que as anteriores., foram colocados nas próteses dos mesmos pacientes. Estas foram pré-tratadas por 15 min com uma solução neutra de 1000 ppm NaF antes de serem colocadas em boca. Medições de microdureza foram realizadas nos dias 2, 5 e 28. Após 28 dias, as próteses foram novamente colocadas na solução e utilizadas por mais uma semana (medições de microdureza nos dias 30, 33 e 35). Os resultados, comparados com estudos anteriores, mostram que a remineralização ocorre mais lentamente *in vivo* do que *in vitro*. Conclui-se também que, no 2º experimento, uma redução de 46% no tamanho das endentações é atingido em 35 dias, enquanto no 1º experimento, este patamar só alcançado aos 65 dias. Assim, o efeito de 2 aplicações tópicas de flúor aumentam a velocidade de remineralização.

Gelhard e Arends (1984) também mostraram que a remineralização ocorre *in vivo*, com uma recuperação maior de volume mineral caso o flúor seja utilizado em concentrações de 1500 ppm F em conjunto com a escovação. Neste trabalho, 30 pacientes utilizaram blocos de esmalte humano com lesões artificiais de cárie,

em próteses inferiores, durante 3 meses. Os voluntários foram divididos em 3 grupos: A – controle – escovação diária com água; B – solução – escovação diária com água e bochecho com solução neutra de 50 ppm F; C – escovação – escovação diária com pasta de dente fluoretada (1500 ppm F neutro). As análises foram realizadas através de ensaios de microdureza Knoop e microradiografias. Após 3 meses, a redução no tamanho da endentação foi de 16, 13 e 20% para os grupos A, B e C respectivamente, sendo todas as diferenças estatisticamente significativas. A porcentagem de volume mineral no corpo da lesão, inicialmente cerca de 47%, passou para 50,7% no grupo A, 48,7% no grupo B e 53,1% no grupo C, sem diferenças significativas entre os grupos A e B. A média de redução na profundidade das lesões foi de 18, 13 e 25 μ m para os grupos A, B e C. A porcentagem de recuperação do volume mineral para os grupos controle, solução e escovação foi de 20, 5 e 31%. A velocidade de remineralização foi relativamente rápida nas primeiras 2 semanas, tornando-se muito lenta no restante do período de duração do estudo. Comparando os dados obtidos com a velocidade de remineralização alcançada por experimentos *in vitro*, conclui-se que a remineralização ocorre muito mais lentamente *in vivo* do que *in vitro*, concordando com Gelhard, ten Cate e Arends (1979). Isto ocorre provavelmente pela presença de material orgânico para competir com os íons pelos microporos da lesão e pelo fato de os espécimes serem submetidos a repetidos ciclos de des e remineralização, e não somente a períodos contínuos de redeposição mineral. Além disso, mostrou-se que, para lesões mais profundas de cárie, a remineralização ocorre de maneira mais efetiva se concentrações mais elevadas de flúor estiverem presentes no meio, configurando o papel deste como ativador do processo de remineralização também *in vivo*.

5. O flúor como auxiliar no tratamento de lesões de cárie

Existem diversos agentes para aplicação tópica e estes podem ser classificados em agentes de aplicação profissional, com alta concentração de flúor e em agentes de autoaplicação, com concentração reduzida de flúor. Dentre os

veículos de aplicação profissional, encontram-se os géis, vernizes, soluções e espumas. Já os produtos de autoaplicação mais utilizados são os dentifrícios e soluções para bochecho (MELLBERG, 1990).

Dentre os veículos para aplicação profissional, o mais comumente utilizado no Brasil é o gel fluoretado (VILLENNA e CORRÊA, 1998). Seus compostos mais aplicados são o flúor fosfato acidulado (FFA 1,23% - 12300 ppm F) e o flúor neutro (NaF 2% - 9200 ppm F) ambos apresentando redução semelhante na experiência de cárie (MELLBERG, 1990; FEJERSKOV, EKSTRAND e BURT, 1996; VAN RIJIKOM, TRUIN e VAN'T HOF, 1998), apesar de formarem camadas de fluoreto de cálcio com diferentes morfologias e espessuras (NELSON, JONGEBLOED, ARENDS, 1983).

Em estudos epidemiológicos, a efetividade do flúor de alta concentração na redução da incidência de cárie foi demonstrada. Ripa (1989), ao analisar 10 trabalhos publicados sobre a influência do FFA em gel na experiência de cárie em crianças, mostrou que este método leva a uma redução efetiva no incremento de lesões de cárie. Van Rijkom, Truin e Vant't Hof (1998), mostraram, através de uma meta-análise, efeito significativo do flúor gel em alta concentração na redução da experiência de cárie, em torno de 22%.

A eficácia do flúor de alta concentração na remineralização de lesões de cárie em esmalte foi demonstrada por Buchalla et al.(2002), em trabalho *in situ*, no qual 18 voluntários utilizaram dispositivos intra-orais removíveis contendo amostras de esmalte desmineralizado. Neste estudo cruzado, os espécimes de esmalte receberam, antes de serem inseridos no dispositivo, uma única aplicação de flúor com concentração de 10000 ppm F ou aplicação de placebo. Após 4 semanas de uso do dispositivo intrabucal, o conteúdo de flúor, o ganho mineral e a redução na profundidade da lesão foram analisados. As lesões tratadas com o flúor de alta concentração apresentaram maior conteúdo de flúor e maior ganho mineral do que o placebo.

Com a disseminação do uso dos dentifrícios fluoretados, a partir da década de 1980, vários estudos foram desenvolvidos demonstrando sua efetividade não só na prevenção de lesões de cárie, como também auxiliando no controle daquelas já estabelecidas (Cury, 2001).

Dijkman et al. (1990), em estudo *in situ*, comprovou a remineralização de lesões *in vitro* previamente formadas com uso de dentifrício fluoretado após 3 meses. Três diferentes grupos de tratamento foram estabelecidos: escovação com dentifrício fluoretado (A), escovação com dentifrício sem flúor (B) e ausência de escovação (C). No grupo C, houve aumento da profundidade das amostras em cerca de 40%, enquanto a escovação sem flúor não alterou a profundidade e a escovação com flúor causou redução de 35%. A perda mineral aumentou em 50% no grupo C, em contraste ao grupo A, no qual observou-se redução de 40% na perda de mineral. Os resultados apontam que, em comparação com a ausência de escovação, o efeito da escovação com dentifrício sem flúor apresenta metade do benefício da escovação com flúor na remineralização de lesões de cárie em esmalte.

Dos Santos, Koo e Cury (1998) também em estudo *in situ*, com 6 voluntários, mostraram a eficácia do dentifrício fluoretado em remineralizar lesões incipientes e incorporar flúor em esmalte. Os voluntários utilizaram, em estudo cruzado, placas palatinas removíveis contendo blocos de esmalte humano desmineralizado, os quais foram escovados 3 vezes ao dia com dentifrício fluoretado ou com dentifrício placebo por 45 dias. Após, os blocos foram analisados quanto ao conteúdo de flúor e grau de remineralização (ensaio de microdureza). O dentifrício fluoretado foi mais eficaz na deposição de flúor e foi capaz de remineralizar o esmalte em 73%, enquanto a remineralização com o dentifrício placebo ficou em torno de 42%.

Porém, Bjarnason e Finnbogason (1991) em estudo sobre o efeito do dentifrício fluoretado no desenvolvimento de cárie proximal, concluíram que este

método de aplicação tópica de flúor traz maiores benefícios no retardo do estabelecimento das lesões do que na redução da progressão de lesões já estabelecidas.

A importância relativa do uso de fluoretos de alta concentração associado ao uso de agentes de baixa concentração na remineralização de lesões de cárie em esmalte tem sido estudada (MELLBERG, 1990; ØGAARD, SEPPÄ e RØLLA, 1994).

Leme et al. (2003), em estudo *in vitro*, comparou o efeito de dentifrício fluoretado e de FFA, e a combinação destes, em lesões artificiais de cárie em esmalte bovino. Quatro grupos de tratamento foram submetidos à ciclagem de pH: (1) dentifrício não-fluoretado (DP) – tratamento placebo; (2) dentifrício fluoretado (DF); (3) FFA + DP, e (4) FFA + DF. O gel de FFA foi aplicado aos blocos dos grupos 3 e 4 por 4 minutos previamente ao experimento. Após a ciclagem, os espécimes foram avaliados quanto ao conteúdo de flúor e microdureza. A recuperação de dureza superficial dos blocos submetidos ao tratamento com DF foi significativamente maior do que aquela obtida pelos demais tratamentos, inclusive pela associação FFA + DF. Quanto aos valores de microdureza, apesar de não haver diferenças significativas entre os tratamentos DF, FFA+DF e FFA+DP, o último não diferiu do tratamento placebo. A análise do conteúdo de flúor mostrou que grandes quantidades de flúor foram incorporadas após o tratamento com FFA, porém um decréscimo significativo desta quantidade foi observado quando os espécimes foram submetidos ao tratamento com DP. Esta redução não foi significativa quando os blocos foram tratados com DF. A concentração de flúor nos espécimes foi maior nos grupos DF, FFA+DP, FFA+DF do que no grupo DP, mas não foram observadas diferenças entre os próprios grupos. Os resultados mostram que, ainda que o tratamento com FFA propicie maiores depósitos de flúor no esmalte, o reparo da lesão, em termos de recuperação da dureza superficial, é melhor alcançado com aplicações freqüentes

de flúor em baixa concentração do que com uma única aplicação de flúor em alta concentração.

Dando continuidade a esta linha de estudos, Maia, de Souza e Cury (2003), avaliaram o efeito da combinação de dentifrício e verniz fluoretados em lesões de esmalte bovino, também em estudo *in vitro* utilizando ciclagem de pH. Os mesmos grupos experimentais descritos no trabalho anterior foram estabelecidos, trocando o FFA por verniz fluoretado (VF). Os resultados foram semelhantes, mostrando que os grupos não diferiram quanto aos valores de microdureza, mas apontaram uma melhor recuperação de dureza superficial para o grupo de DF do que VF. O conteúdo de flúor formado foi maior para o grupo do VF. Os resultados sugerem, concordando com o estudo de Leme (2003), que apesar de uma aplicação de verniz fluoretado aumentar a concentração de flúor no esmalte, isto não melhora a capacidade do DF utilizado regularmente de recuperar a dureza do tecido.

Resultados diferentes foram encontrados em estudo no qual a frequência de aplicação do flúor de alta concentração foi aumentada. Lagerweij e ten Cate (2002), realizaram estudo *in situ* para avaliar a remineralização de lesões artificiais de cárie em esmalte bovino através do uso de dentifrício fluoretado e gel fluoretado. Blocos de esmalte desmineralizado foram colocados em próteses parciais de 26 voluntários, os quais foram divididos em 2 grupos: (1) escovação dos espécimes com dentifrício fluoretado (DF) 2 vezes ao dia por 2 min, e (2) escovação idêntica ao grupo anterior + aplicação diária de gel fluoretado (12500 ppm F) por 4 min (DF+G). Após 4 semanas, os espécimes foram avaliados com relação ao conteúdo de flúor e conteúdo mineral (microradiografia). As lesões tratadas com DF+G sofreram maior grau de remineralização (ganho de 27% em volume mineral) do que as tratadas somente com DF (ganho de 11%) . A deposição de mineral ocorreu também nas regiões mais profundas das lesões em ambos os grupos, mas diferenças estatisticamente significantes foram observadas somente na camada superficial. O conteúdo de flúor formado no grupo DF+G foi significativamente maior do que no grupo DF.

Cabe discutir ainda que, uma vez definida a utilização de flúor em alta concentração como auxiliar no controle de lesões de cárie ativas, a frequência com a qual este deve ser utilizado ainda não está bem estabelecida. Johnston e Lewis (1995), em estudo com 329 crianças canadenses com idades entre 6 e 11 anos, avaliaram a ATF anual ou bianual de FFA em gel na prevenção do aparecimento de novas lesões de cárie. Após 3 anos de acompanhamento, não foi detectada diferença no incremento médio de cárie entre as crianças que receberam ATF anual ou bianual. Em contrapartida, Olivier, Brodeur e Simard (1992), em estudo de acompanhamento de 2 anos sobre a frequência de aplicações do gel em crianças, mostraram diferenças significativas entre o incremento de cárie dos indivíduos que receberam aplicações anuais em relação aos que receberam aplicações de flúor de alta concentração 2 vezes ao ano.

Ripa et al., (1986), desenvolveram recomendações para uso profissional do flúor, levando em consideração a atividade de cárie do paciente e a presença de flúor na água de abastecimento. Indivíduos livres de cárie deveriam receber ATF 2 vezes ao ano somente no caso de residirem em local sem água fluoretada. Na presença de atividade de cárie, independentemente da fluoretação da água, os indivíduos deveriam receber 2 aplicações de flúor em gel por ano e, no caso de cárie rampante, 4 aplicações deveriam ser instituídas.

Van Rijkom, Truin e Vant't Hof (1998), após análise da literatura, não encontraram padronização quanto à frequência de uso do flúor tópico profissional, apresentando variações desde uma até 30 aplicações ao ano. No Brasil, um dos protocolos de utilização do flúor de alta concentração como auxiliar no controle de lesões de cárie é a aplicação do produto uma vez por semana, em 4 consultas consecutivas.

Não há evidências científicas consensuais sobre a existência de um efeito adiconal do uso combinado de flúor em alta concentração e com o de baixa

concentração no controle das lesões ativas de cárie, assim como sobre a frequência com que este deve ser realizado.

PROPOSIÇÃO

1. Avaliar se a aplicação de flúor em alta concentração tem efeito adicional no controle de lesões de esmalte e na deposição de flúor na superfície comparado ao uso de dentifrício fluoretado.
2. Avaliar a frequência de aplicações tópicas de flúor em alta concentração no controle das lesões de cárie e na deposição de flúor na superfície do esmalte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACKER DIRKS, O. B.; Poseruptive changes in dental enamel. **J. Dent. Res.**, Washington, v.45, n.3, p.503-511, May, 1966.

BJARNASON, S.; FINNBOGASON, S. Y. Effect of different fluoride levels in dentifrice on development of approximal caries. **Caries Res.**, Basel, v. 25, n. 3, p. 207-212, 1991.

BRUUN, C.; GIVSKOV, H. Formation of CaF₂ on sound enamel and in caries-like enamel lesions after different forms of fluoride applications in vitro. **Caries Res.**, Basel, v. 25, n. 2, p. 96-100, March-April, 1991.

BUCHALLA, W. et al. Fluoride uptake, retention and remineralization efficacy of a highly concentrated fluoride solution on enamel lesions in situ. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 81, n. 5, p. 329-333, 2002.

CAVSLAVSKA, V. et al. CaF₂ in enamel biopsies 6 weeks and 18 months after fluoride treatment. **Caries Res.**, Basel, v. 25, n. 1, p. 21-26, January-February, 1991.

CHOW, L. C. Tooth-Bound Fluoride and Dental Caries. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 69 (Spec Iss), p. 595-600, February, 1990.

CLARCKSON, J. J. et al. International collaborative research on fluoride. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 79, n. 4, p.893-904, April, 2000.

CRUZ, R.; ●GAARD, B.; R●LLA, G. Uptake of KHO-soluble and KHO-insoluble fluoride in sound human enamel after topical application of a fluoride varnish (Duraphat) or a neutral 2% NaF solution in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**,

Copenhagen, v. 100, n. 3, p. 154-158, June, 1992.

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, **Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades**, 2 ed. São Paulo: Santos, 2001. Cap. 02, p.33-68.

DARLING, A. I. Studies of the early lesion of enamel caries – Its nature mode of spread and points of entry. **Brit. Dent. J.**, London, v.105, n.04, p.119-135, August, 1958.

DIJKMAN, A. et al. Remineralization of human enamel in situ after 3 months: The effect of not brushing versus the effect of na F dentifrice and na F-free dentifrice. **Caries Res.**, Basel, v. 24, p. 263-266, 1990.

DUSHNER, H.; GÖTZ, H.; GAARD, B. Fluoride induced precipitates on enamel surface and subsurface areas visualized by electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 105, n. 5, Part II, p. 466-472, October, 1997.

FEATHERSTONE, J.D.B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.27, n.01, p.31-40, February, 1999.

FEAGIN, F; KOULOURIDES T; PIGMAN, W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 14, n. 12, p.1407-17, December, 1969.

FEAGIN, F. et al. Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 16, n. 5, p.

535-548, 1971.

FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B. A. Fluoride in dentistry. 2 ed. Munksgaard, 1996.

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, **Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades**, 2 ed. São Paulo: Santos, 2001. Cap. 02, p.33-68.

GELHARD, T. B. F. M.; TEN CATE, J. M.; ARENDS, J. Rehardening of artificial enamel lesions *in vivo*. **Caries Res.**, Basel, v. 13, n. 2, p. 80-83, March-April, 1979.

GELHARD, T. B. M. F.; ARENDS, J. In vivo remineralization of artificial subsurface lesions in human enamel. I. **Jour. Biol. Buccale**, Paris, v. 12, n. 1, p. 49-57, March, 1984.

GELHARD, T. B. M. F.; ARENDS, J. Microradiography of in vivo remineralized lesions in human enamel. II. **Jour. Biol. Buccale**, Paris, v. 12, n. 1, p. 59-65, March, 1984.

HOLMEN, L. et al. A scanning electron microscopy study of progressive stages of enamel caries in vivo. **Caries Res.**, Basel, v. 19, p. 355-367, 1985.

HOLMEN, L.; THYLSTRUP, A.; ARTUN, J. Clinical and histological features observed during arrestment of active enamel carious lesions *in vivo*. **Caries Res.**, Basel, v. 21, n. 6, p.546-554, November-December 1987.

HOLMEN, L.; THYLSTRUP, A.; ARTUN, J. Surface changes during the arrest of active enamel carious lesions *in vivo*: a scanning electron microscope study. **Acta Odontol. Scand.**, Stockholm, v.45, n.06, p.383-390, December, 1987.

JOHNSTON, D. W.; LEWIS, D. W. Three-year randomized trial of professionally applied topical fluoride gel comparing annual and biannual applications with/without prior prophylaxis. **Caries Res.**, Basel, v. 29, p. 331-336, 1995.

KASHKET, S. Historical review of remineralization research. **J. Clin. Dent.**, Yardley, v.10, n.02, p.56-64, 1999.

KOULOURIDES, T. Fluoride and the caries process. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 69 (Special Issue), p.558, February, 1990.

KOULOURIDES, T. et al. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 3, n. 4, p.185-196, 1974.

KOULOURIDES, T; CAMERON, B. Enamel Remineralization as a Factor in the Pathogenesis of dental caries. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 9, n. 5, p. 255-269, September, 1980.

LAGERWEIJ, M. D.; TEN CATE, J. M. Remineralization of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: An in situ study. **Caries Res.**, Basel, v. 36, n. 4, p. 270-274, August, 2002.

LARSEN, M. J.; JENSEN, S. J. Experiments on the initiation of calcium fluoride formation with reference to the solubility of dental enamel and brushite. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 23-27, January, 1994.

LEME, A. F., et al. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. **Am J Dent.**, San Antonio, v. 16, n. 2, p. 91-5, April, 2003.

MAIA, L. C.; DE SOUZA, I. P. R.; CURY, J. A. Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake in vitro. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 111, n. 1, p. 68-72, February, 2003.

MALTZ, M.; CARVALHO, J. Diagnóstico da doença cárie. In: KRIGER, L. **ABOPREV – Promoção de Saúde Bucal**. São Paulo: Artes Médicas, 1997. Cap.04, p.71-91.

MELLBERG, J. R. Evaluation of topical fluoride preparations. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 69 (Special Issue), p.771-779, February, 1990.

MORENO, E. C. Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. **Int. Dent. J.**, Guildford, v. 43(n.1 Suppl 1), p. 71-80, February, 1993.

NELSON, D. G. A.; JONGEBLOED, W. L.; ARENDS, J. Morphology of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: SEM considerations. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 62, n. 12, p. 1201-1208, December, 1983.

NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Assessing the stage caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.25, n.01, p.69-75, February, 1997.

●GAARD, B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Res.**, Basel, v. 35 (Suppl. 1), p.40-44, May, 2001.

●GAARD, B.; R●LLA, G.; HELGELAND, K. Alkali soluble and alkali insoluble fluoride retention in demineralized enamel in vivo. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 91, n. 3, p. 200-204, June, 1983b.

●GAARD, B.; R●LLA, G.; HELGELAND, K. Fluoride retention in sound and

demineralized enamel in vivo after treatment with a fluoride varnish (Duraphat). **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 92, n. 3, p. 190-197, June, 1984.

●GARD, B.; SEPPÄ, L.; R●LLA, G. Professional topical fluoride applications – clinical efficacy and mechanism of action. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 8, n. 2, p. 190-201, July, 1994.

OLIVIER, M.; BRODEUR J. M.; SIMARD, P. L. Efficacy of APF treatments without prior toothcleaning targeted to high-risk children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 20, p. 38-42, 1992.

RICHARDS, A. et al. Fluoride content of buccal surface enamel and its relation to dental caries in children. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 425-428, July, 1977.

RIPA, L. W. et al. A guide to the use of fluorides for the prevention of dental caries. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 113, p. 503-566, 1986.

RIPA, L. W. et al. Review of anticaries effectiveness of professionally applied and self-applied topical fluoride gels. **J. Public. Health Dent.**, Raleigh, v. 49, n. 5 (Spec no), p. 297-309, 1989.

DOS SANTOS, M. N.; KOO, H.; CURY, J. A. Evaluación in situ de la incorporación de flúor y remineralización del esmalte dental con un dentífrico brasileiro fluorado comercializado para niños. **Fola/Oral**, n. 12, Junio, 1998.

SAXEGAARD, E.; R●LLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 96, n. 6, p. 523-535, December, 1988.

SAXEGAARD, E.; R●LLA, G. Kinetics of acquisition on and loss of calcium

fluoride by enamel in vivo. **Caries Res.**, Basel, v. 23, n. 6, p.406-411, November-December, 1989.

SCHAMSCHULA, R. G. et al. Association between fluoride concentration in successive layers of human enamel and individual dental caries experience. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 24, n. 10-11, p. 847-852, October-November, 1979.

SHELLIS, R. P.; DUCKWORTH, R. M. Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. **Int. Dent. J.**, Guildford, v. 44, n. 3 (Supplement 1), p. 263-273, June, 1994.

SILVERSTONE, L. M. The effect of fluoride in the remineralization of enamel caries and caries-like lesions in vitro. **J. Public Health Dent.**, Raleigh, v. 42, n. 1, Winter, 1982.

SILVERSTONE, L. M. Laboratory studies on the demineralization and remineralization of human enamel in relation to caries mechanisms. **Australian Dental J.**, Sydney, v. 25, n. 3, p. 163-168, June, 1980.

SILVERSTONE, L. M. Structure of carious enamel, including the early lesion. **Oral Sciences Reviews**, Copenhagen, v.03, second part, p.100-132, Autumn, 1973.

SILVERSTONE, L.M. The primary translucent zone of enamel caries and of artificial caries-like lesions. **Brit. Dent. J.**, London, v.120, n.10, p.461-471, May, 1966.

SILVERSTONE, L.M.; HICKS, J.M.; FEATHERSTONE, M.J. Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I: The dynamic nature of enamel caries. **Quintessence Int.**, Berlin, v.19, n.10, p.683-711, October, 1988.

SILVERSTONE, L. M.; POOLE, D. F. G. Histologic and ultrastructural features of remineralized carious enamel. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 48, n. 5, p. 766-770, September-October, 1969.

TAKAGI, S.; LIAO, H.; CHOW, L. C. Effect of tooth-bound fluoride on enamel demineralization/remineralization in vitro. **Caries Res.**, Basel, v. 34, n. 4, p. 281-288, July-August, 2000.

TEN CATE, J. M.; ARENDS, J. Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*. III. A study of the deposition mechanism. **Caries Res.**, Basel, v.14, n.6, p.351-358, 1980.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O.. **Cariologia Clínica.**, 2ed. São Paulo: Santos, 1995. 421p., Cap. 06, p. 111-157: Características Clínicas e Patológicas da Cárie Dentária.

WEI, S. H. Y. Electron microprobe analyses of the remineralization of enamel. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 49, n. 3, p. 621-625, May-June, 1970.

WEI, S. H. Y.; KOULOURIDES, T. Electron microprobe and microhardness studies of enamel remineralization. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 51, n. 2, p. 648-651, March-April, 1972.

WOLINSKY, L. E. Caries and Cariology. In: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Oral microbiology and immunology**. Philadelphia: Saunders, 1994. 477p. Cap. 27, p.341-359.

VAN RIJIKOM, H. M.; TRUIN, G. J.; VANT'T HOF, M. A. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of fluoride gel treatment. **Caries Res.**, Basel, v. 32, n. 2, p. 83-92, March-April, 1998.

VILLENA, R. S.; CORRÊA, M. S. N. P. Flúor – Aplicação tópica. In: CORRÊA, **Odontopediatria na primeira infância**, São Paulo: Santos, 1998. Cap.25, p. 315-342.

Enamel dental caries submitted to different topical fluoride treatments *in situ*

J. J. Jardim M. Maltz

Department of Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Key words

Dental caries, Fluoride, Remineralization, Acidulated Phosphate Fluoride, Dentifrice, *In situ* study

Introduction

The effectiveness of topical fluoride as a cariostatic agent is well established. Fluoride incorporated into the enamel crystal, forming a fluorapatite like mineral, improve its resistance to the acid challenge [Moreno, 1993; Chow, 1990]. During the caries process, some of the mineral dissolves, and this apatitically bound fluoride can be released to act in the de-remineralization process [Koulourides, 1990]. After fluoride topical applications (>100 ppm F), loosely bound fluoride or a calcium fluoride like material is formed on the enamel or in caries lesions [Cruz et al., 1992]. Depending on the oral conditions, such as pH in saliva and/or in plaque fluid, this CaF₂ layer, which has an increased solubility over hydroxyapatite and fluorapatite, will be dissolved, releasing fluoride to react with calcium

and phosphate ions [Nelson et al., 1983]. The ending products of these reactions may be fluorapatite crystals or CaF_2 incorporated again on tooth surface. The calcium fluoride coating could be considered a reservoir of fluoride ions available to inhibit demineralization and enhance remineralization [Koulourides et al, 1974; Cury, 2001].

The fluoride constantly present in the oral fluid is an important factor in caries control. Thus, lower levels of fluoride, more frequently delivered in the oral environment, as obtained with fluoride dentifrices, are considered effective on caries prevention and control [Koulourides, 1990; Clarkson et al., 2000].

Although professional topical fluoride has been used to enhance the arrestment of active caries lesions [Øgaard et al., 1994], it is not clear the additional effect of fluoride at high concentrations on the remineralization process, specially with the widespread use of frequent low concentration of fluoride (toothpaste). An *in situ* study showed that high fluoride concentration applications, at high frequencies, caused an enhancement of remineralization, with significant increased in loosely bound and structurally bound fluoride concentrations, when compared to toothpaste only [Lagerweij and ten Cate, 2002]. However, some *in vitro* studies showed that single applications of fluoride gel or fluoride varnish with daily use of F-dentifrice does not offer additional effect on enamel remineralization and fluoride uptake than the use of toothpaste only [Maia et al., 2003; Paes Leme et al., 2003].

Besides the questionable necessity of topical applications of high fluoride concentration to caries control, the application frequency remains undetermined [Van Rijikom et al., 1998].

The aim of the present *in situ* study was to evaluate whether the application of high fluoride concentration has an additional effect on control of enamel lesions compared to F-dentifrice. Furthermore the frequency of high fluoride concentration applications on the

arrestment of caries lesions was tested. The amount of fluoride deposited on enamel surface after applications of high and low concentrations of fluoride was also evaluated.

Materials and Methods

Sample preparation

Enamel specimens (4 x 4 x 2 mm) were cut from bovine incisors, and enamel and dentine surfaces were ground and polish with wet sandpaper and a diamond paste using a manual device so that both surfaces were planar and parallel [Jardim et al., 2003]. The samples were stored in 4% formaldehyde solution for at least 30 days in order to obtain sterilization [White, 1987]. The baseline surface microhardness (SMH) of all specimens was measured using a microhardness tester (Micromet® 2001, Buehler, Illinois, USA) with a Knoop diamond indenter under a 50 g load for 10 s. The average of five indentations made on each specimen was used for SMH determination. After SMH measurements, 35 enamel blocks were selected, with a Knoop hardness number units (KHN) ranging from 265,32 to 324,28. Five sound specimens were stored (humid atmosphere at 4°C) for later cross-sectioned microhardness measurements (CSMH) and fluoride analysis, whereas 30 blocks were submitted to demineralization. Digital photographs were taken of all specimens at different times - sound, after demineralization and after intraoral procedures.

Experimental design

The study experimental design is showed in figure 1.

Demineralization

In vitro lesions were formed in the enamel using a sodium acetate buffer solution for 16 h. All surfaces of the samples were coated with acid resistant nail varnish, except the polished enamel surface. Each specimen was immersed at 37°C in 16 mL of sodium acetate buffer solution 0,05 M (pH = 5), 50% saturated in regard to the bovine enamel, and agitated for 16 h [Moreno and Zahradnik, 1974]. After the lesion formation, the varnish was removed and the specimens were washed with deionized water for 3 min. SMH of all specimens was then measured. Ten indentations spaced 100 µm from the baseline indentations (five on each side) were made with a Knoop diamond indenter under a 25 g load for 10 s. The percentage surface microhardness loss (%SMHL) was calculated as:

$$\% \text{ hardness loss} = \frac{(\text{baseline hardness} - \text{demineralized hardness}) \times 100}{(\text{baseline hardness})}$$

Five blocks were then stored for later CSMH and fluoride analysis.

Intraoral procedures

Five subjects with a lower removable partial denture volunteered for the study, age ranging from 40 to 70 years. The volunteers were residents of a fluoridated water supply area (0.7 – 1 ppm F) and continued their dietary habits. The prosthesis were kept in the mouth day and night, except during treatments. All participants signed an informed consent. The study was approved by the Odontology Faculty (UFRGS) Ethics Committee.

Five demineralized blocks were fixed bilaterally (sticky wax) into recessed areas on the buccal surface of each partial denture. The volunteers wore the prosthesis during 42 days

and brushed all specimens three times daily for 1 min with fluoride dentifrice (FD) (1100 ppm F as NaF, Tandy®, Brazil). Four specimens were submitted to acidified phosphate fluoride (APF) gel topical applications (12.300 ppm F, pH = 3) on different weekly frequencies (see figure 1). Each specimen was removed from the partial denture for the gel application by a professional, for 1 min and then rinsed off with deionized water .

Clinical evaluation

The specimens were clinically examined at baseline, after demineralization and after intraoral procedures. Evaluation was carried out blind by the same calibrated examiner (J.J.J.) under standardized conditions using light, compressed air, plane mouth mirror and explorer. The samples were dried for 5 seconds and the surfaces were examined regarding surface color, brightness (shiny/opaque) and texture (rough/smooth). The intra-examiner reliability of the clinical criteria was assessed after each experimental period on the basis of duplicate recordings (4 days interval) of all samples. The kappa values for surface brightness and roughness were 1.0 and 0.81 respectively.

Surface roughness assay

The surface roughness of the samples was measured using a surface roughness profilometer (Surftest 401, Mitutoyo®, Japan) to an accuracy of 0.01 μm , a range of 2.00 mm and a 0.25 mm cut-off. The parameter recorded was roughness average (Ra) in μm .

Microhardness measurements

After intraoral procedures, the SMH of the enamel specimens was measured again. Ten indentations spaced 100 μm from the indentations after the demineralization (five on each

side) were made with a Knoop diamond indenter (50 g load for 10 s). The percentage surface microhardness recovery (SMHR) was calculated as:

$$\% \text{ hardness recovery} = \frac{(\text{intraoral procedures hardness} - \text{demineralized hardness}) \times 100}{(\text{baseline hardness} - \text{demineralized hardness})}$$

The stored sound specimens, demineralized specimens and all 25 specimens submitted to fluoride treatment were cut and a half of each was imbedded in epoxy resin (Araldite®, Brazil) to perform CSMH. Three measurements, spaced 100 µm from each other, at 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µm from the outer surface were performed with a Knoop diamond indenter (25 g load for 10 s). The mean values at each distance were used to calculate the mineral content (vol. %) [Featherstone et al., 1983].

Fluoride analysis

The other half of each specimen was used to determine the KOH-soluble fluoride. All tooth surfaces of the blocks were covered with nail varnish, except the polished surface. The surface of every specimen was exposed to 1 mL KOH solution (1 mol/L) and agitated for 24 h at 23°C. The solution was neutralized (1 mL 1 mol/L HNO₃) and buffered (1 mL TISAB II). Fluoride content was measured with a fluoride-sensitive electrode (Oakton, Vernon Hills, USA) and calculated in µg/cm² enamel surface [Buchalla et al., 2002].

The same specimens were used to determine the structurally bound fluoride. The surface of the specimens were exposed to 0.5 mL 0.5 M HCl for 2 min. After that, the solution was buffered with 0.5 mL TISAB II modified with 20 g/L NaOH. Fluoride content was

measured with a fluoride-sensitive electrode (Oakton, Vernon Hills, USA) and calculated in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ enamel surface [.

The total fluoride content was also determined by adding the KOH-soluble and structurally bound fluoride.

Statistical Analysis

Non-parametric Friedman's test was used to compare SMH values before and after treatments, complemented with Multiple Comparisons test. Percentage of surface microhardness loss (%SMHL) and surface microhardness recovery (%SMHR) among treatments were also analyzed by Non-parametric Friedman's Test. One-way ANOVA, followed by Least Significant Difference test, was used to compare CSMH values among the different groups. Surface roughness among the treatments was analyzed by Non-parametric Friedman's test and among the different groups by ANOVA. Analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's studentized range test at the 5% level of confidence, was used to evaluate fluoride content data among the different groups.

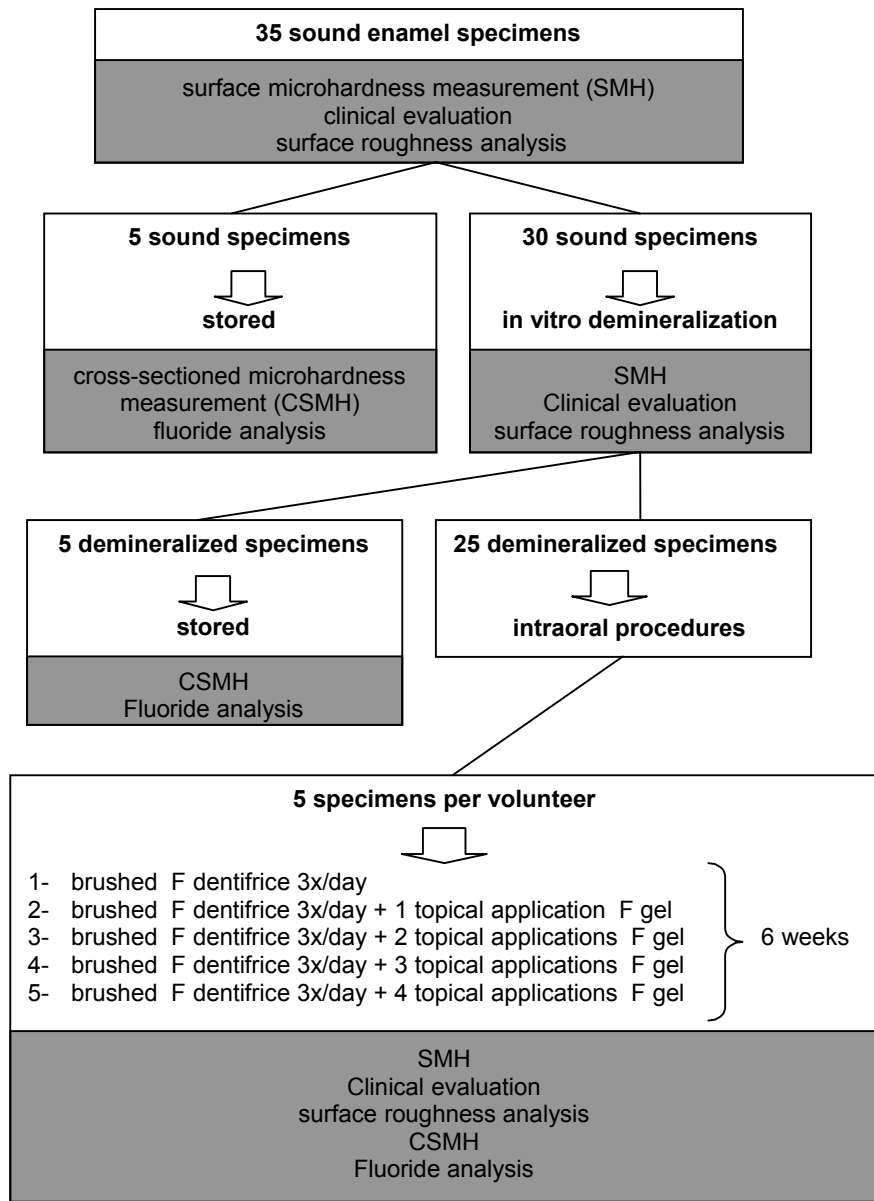


Fig. 1. Illustration of the study experimental design.

Results

Clinical examinations

Change in surface color could be observed after demineralization, all specimens presenting white spot lesions (fig 2b). After the fluoride treatments, samples surfaces became yellowish (fig 2 c-g). After the intraoral procedures, fragments of the outer enamel layer were lost in some cases (fig. 2 - arrows) and the surface color became similar to sound enamel. No changes were recorded regarding brightness and texture after the different periods.

Surface roughness

Table 1 shows roughness average (Ra) (mean \pm standard deviation) of sound, demineralized and treated specimens. There was a slightly but not statistically significant increase in roughness after demineralization. The differences among demineralized and fluoride treated specimens were not significant ($p=0,578$). No differences in roughness values could be observed among the specimens after the different fluoride treatments ($p=0,980$).

Surface microhardness

Surface microhardness analysis of all groups are shown in table 2 and fig. 3. The demineralized specimens demonstrated a significant decrease ($p<0,05$) in microhardness (table 3). The microhardness increased from the demineralized to the treated blocks for all groups, but statistically significant differences could only be observed for the FD+3 APF and FD+4 APF groups. However, no differences were detected among the treatments

($p > 0,05$). The % SMHL was similar for all groups ($p > 0,05$) (figure 3). No additional effect of fluoride gel could be detected on enamel surface microhardness recovery ($p = 0,231$).

Cross-sectioned microhardness

Table 3 shows cross-sectioned microhardness analysis of sound, demineralized and treated specimens. Differences between sound and demineralized/treated groups were detected only at the distances of 10 and 20 μm . No differences among demineralized and treated groups could be observed at any distance from the outer surface of enamel. Apparently, none of the treatments was able to increase subsurface microhardness during the study period of time. This fact can be seen also in fig. 4, which shows similar mineral content curves for demineralized and treated specimens.

Fluoride Content

Table 4 shows fluoride content analysis of sound, demineralized and treated specimens. Although no significant differences could be observed for the amount of KOH-soluble fluoride within the treatment groups, only the FD+3 APF and FD+4 APF groups were different from the sound and demineralized specimens. The structurally bound and total fluoride content of the enamel blocks with 2 or more topical applications was statistically significant compared to the sound/demineralized blocks. Fluoride toothpaste with and without a single APF topical application was similar to either sound/demineralized or the FD+2, 3 and 4 APF groups. Despite the amount of KOH-soluble fluoride formed had been smaller than the structurally bound fluoride content, a significant correlation between both forms of fluoride was found ($r = 0.536$; $p = 0.002$).

Table 1. Roughness average (③m) of the specimens

according to the different groups (mean ± SD).

Group	Roughness average
Sound (n=5)	0.053 ± 0.010 ^a
Demineralized (n=5)	0.110 ± 0.042 ^a
FD (n=5)	0.084 ± 0.046 ^{a,b}
FD+1 APF (n=5)	0.096 ± 0.058 ^{a,b}
FD+2 APF (n=5)	0.086 ± 0.038 ^{a,b}
FD+3 APF (n=5)	0.076 ± 0.034 ^{a,b}
FD+4 APF (n=5)	0.086 ± 0.032 ^{a,b}

^a Not statistically significant (p=0,578) and ^b (p=0,980)

Table 2. Surface microhardness analysis (mean ± SD, median and spreading) of bovine enamel specimens according to the different groups.

Group	SMH	Median	Spreading
Sound	301.07 ± 4.15 ^a	303,51	296,01 - 304,87
Demineralized	46.62 ± 17.66 ^c	48,50	22,94 - 71,17
FD	139.70 ± 42.99 ^{abc}	150,25	65,57 - 169,76
FD+1 APF	162.78 ± 39.06 ^{abc}	153,47	116,44 - 213,24
FD+2 APF	139.77 ± 46.29 ^{bc}	160,47	63,12 - 174,85
FD+3 APF	162.37 ± 23.95 ^{ab}	170,95	129,50 - 190,75
FD+4 APF	171.55 ± 33.06 ^{ab}	188,84	121,63 - 200,79

Means followed by different letters are statistically significant (p <0,001) (5% level of confidence).

Table 3. Enamel cross-section microhardness values (mean \pm SD) at each distance from the outer surface (μm) according to the different groups.

Group	10	20	40	60	80	100
Sound	263.14 \pm 29.55 ^a	278.42 \pm 36.79 ^a	305.16 \pm 22.76 ^a	322.54 \pm 16.70 ^a	318.26 \pm 43.71 ^a	307.42 \pm 29.68 ^a
Demineralized	102.31 \pm 61.16 ^b	147.80 \pm 69.67 ^b	218.30 \pm 101.08 ^a	246.41 \pm 100.24 ^a	271.72 \pm 67.28 ^a	315.30 \pm 57.30 ^a
FD	135.56 \pm 70.46 ^b	176.62 \pm 92.28 ^b	241.41 \pm 73.51 ^a	274.76 \pm 83.32 ^a	287.67 \pm 91.13 ^a	304.30 \pm 82.29 ^a
FD+1 APF	114.71 \pm 66.65 ^b	171.18 \pm 58.71 ^b	238.27 \pm 46.56 ^a	289.96 \pm 77.21 ^a	318.47 \pm 91.84 ^a	333.55 \pm 53.91 ^a
FD+2 APF	128.83 \pm 82.39 ^b	184.09 \pm 73.15 ^b	273.21 \pm 99.55 ^a	287.98 \pm 89.11 ^a	311.84 \pm 60.66 ^a	322.52 \pm 59.41 ^a
FD+3 APF	100.90 \pm 27.55 ^b	149.05 \pm 33.39 ^b	219.67 \pm 73.29 ^a	258.33 \pm 66.72 ^a	283.53 \pm 65.83 ^a	306.07 \pm 83.04 ^a
FD+4 APF	104.26 \pm 61.66 ^b	135.61 \pm 51.83 ^b	219.68 \pm 68.52 ^a	246.19 \pm 63.65 ^a	274.73 \pm 92.02 ^a	298.53 \pm 71.34 ^a

Means followed by different letters in the columns are statistically significant (5% level of confidence).

Table 4. KOH-soluble, structurally bound fluoride and total F (mean \pm SD) content of enamel specimens according to the different groups.

Group	KOH-soluble F (g/cm^2)	Structurally bound F (g/cm^2)	Total F (g/cm^2)
Sound	1.39 \pm 0.36 ^a	1.32 \pm 0.66 ^a	2.76 \pm 0.55 ^a
Demineralized	1.69 \pm 0.49 ^{ab}	1.83 \pm 0.92 ^a	3.53 \pm 1.20 ^a
FD	2.87 \pm 0.89 ^{abc}	29.62 \pm 19.79 ^{ab}	22.77 \pm 11.82 ^{ab}
FD+1 APF	4.09 \pm 2.01 ^{abcd}	36.02 \pm 26.05 ^{ab}	40.11 \pm 25.41 ^{ab}
FD+2 APF	4.72 \pm 1.76 ^{bcd}	57.07 \pm 28.9 ^b	61.79 \pm 29.10 ^b
FD+3 APF	6.42 \pm 1.86 ^d	50.21 \pm 27.32 ^b	56.63 \pm 26.22 ^b
FD+4 APF	5.80 \pm 2.12 ^{cd}	50.95 \pm 20.59 ^b	56.77 \pm 22.07 ^b

Means followed by different letters in the columns are statistically significant (5% level of confidence).

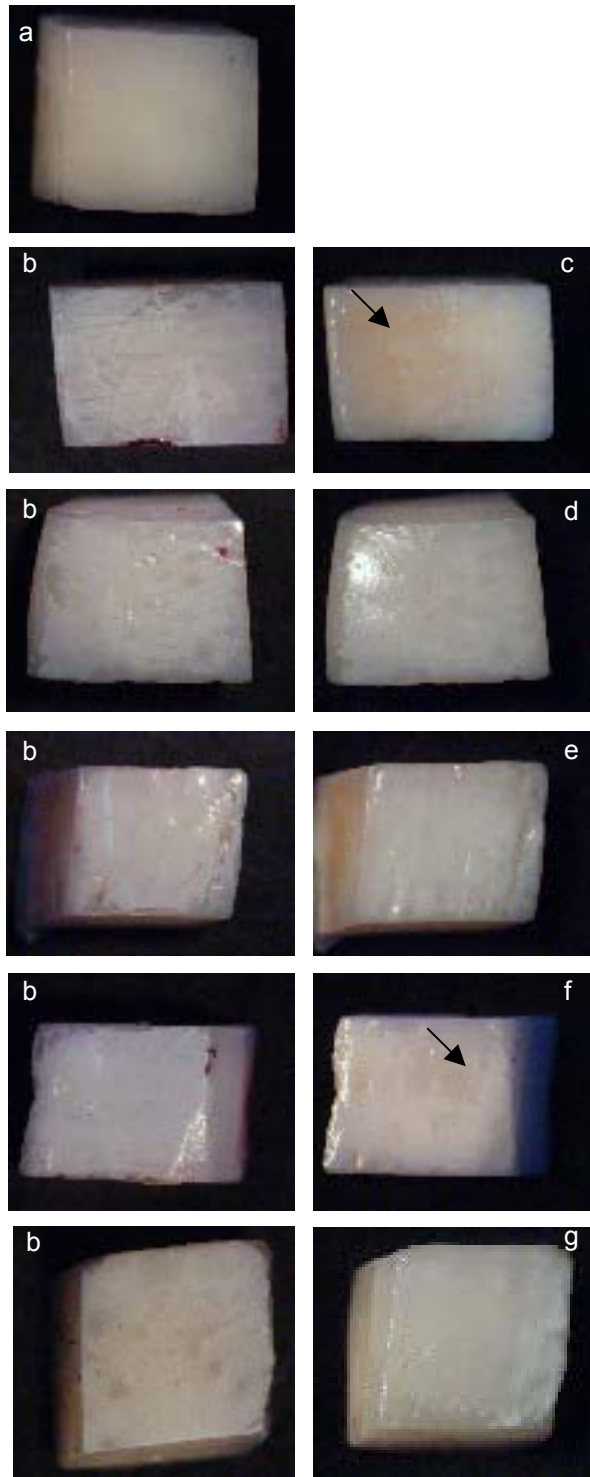


Fig. 2. Enamel blocks: sound (a), demineralized (b), brushed three times daily for 1 min with fluoride dentifrice during six weeks (c), brushed + 1 F gel application (d), brushed + 2 F gel application (e), brushed + 3 F gel application (f) and brushed + 4 F gel application (g). The arrows indicate loss of surface layer during the intraoral procedures.

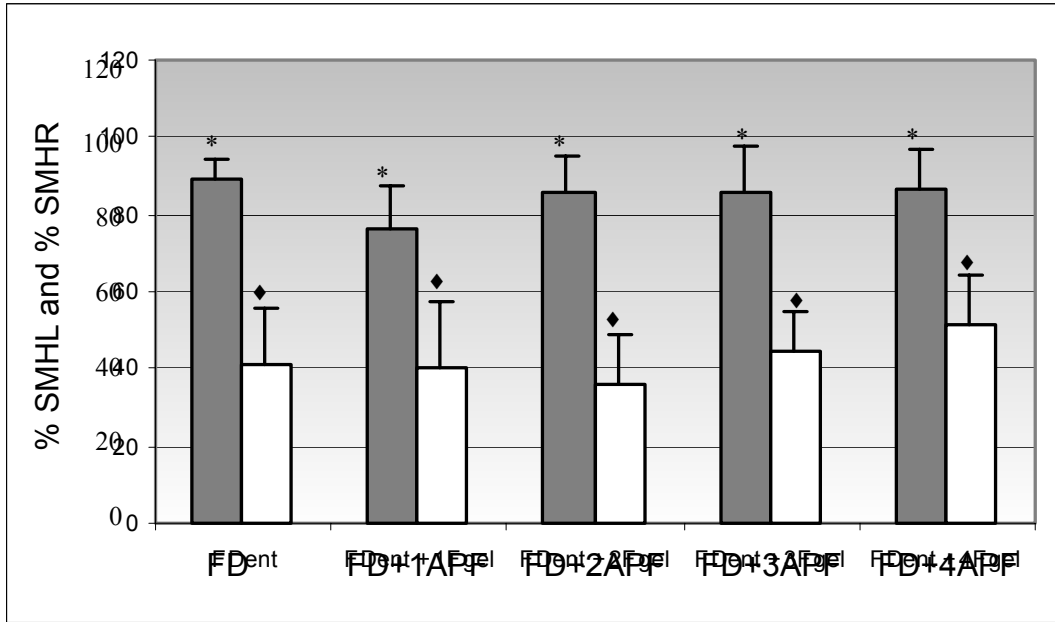


Fig. 3. Mean values for surface microhardness loss (%SMHL – gray) and surface microhardness recovery (%SMHR - white) according to the treatments. * Indicate not significant differences among treatments for %SMHL and ♦ for % SMHR

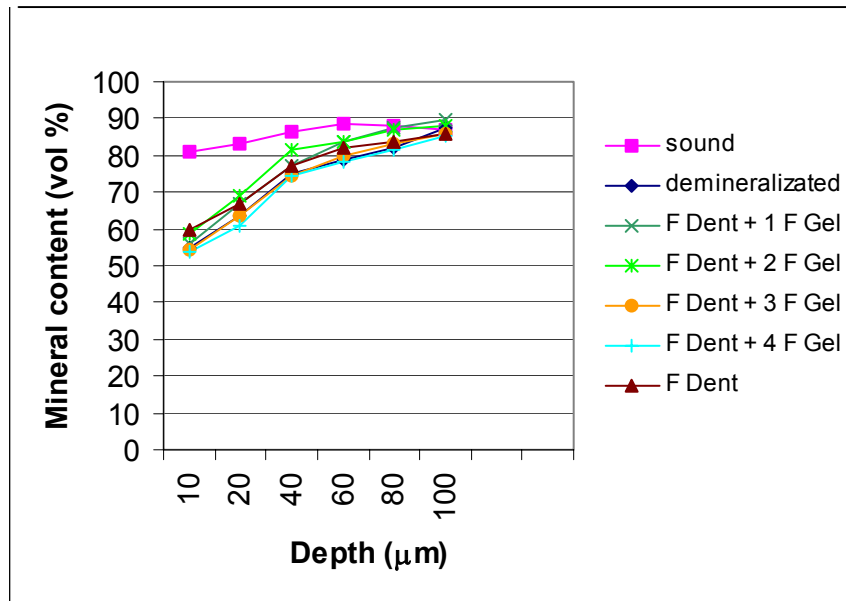


Fig. 4. Mineral content profiles from sound, demineralized and treated specimens plotted versus the distance from the outer surface.

Discussion

This experiment shows clinical change in surface color after tooth brushing and APF, despite the lack of change in surface brightness and texture, confirmed by surface roughness assay. SMH and fluoride content analysis showed that significant differences could be detected after the second application of high fluoride concentration. Subsurface microhardness values showed no differences among demineralized and treated groups at any distance from the outer surface of enamel.

During the arrestment of enamel lesions, the tooth surface becomes gradually smooth, shiny and shows a reduction in opacity [Backer Dirks, 1966; Holmen et al., 1987; Nyvad and Fejerskov, 1997]. However, the present study didn't show any change in surface texture and brightness after lesion consolidation, probably due to the fact that all specimens were previously polished in order to allow microhardness assay. Additionally, the relatively small depth reached by *in vitro* lesions [Buchalla et al., 2002; Lagerweij and ten Cate, 2002] may have contributed to the lack of roughness changes. Surface color shift from whitish to yellowish can be explained by surface wearing caused by mechanical removal of dental plaque, as shown by Holmen and co-workers [1987]. Although fragments of the outer enamel layer were lost in some cases, generally the surface wearing did not exceed a layer of about 4 μ m [Koulourides et al., 1976; Arends and ten Bosch, 1992], once the indentations could still be seen after the treatment period.

Results from SMH and % SMHR showed no differences between FD and FD+1 APF treatments, in agreement with results of Leme et al. [2003] and Maia et al. [2003], studying *in vitro* fluoride treatment with APF and fluoride varnish respectively. However, FD+3

APF and FD+4 APF were the only treatment groups which showed differences compared to the demineralized blocks. This fact is clinically relevant, especially with regard to the treatment of caries active patients. These results were supported by Lagerweij and ten Cate [2002] previous study, in which quantitative analysis was performed by microradiography, and showed that, increasing APF frequency, higher mineral contents can be obtained.

Even though SMH values increased after treatments, CSMH change could be seen compared to demineralized specimens. This result is in agreement with Holmen et al [1987], which showed that remineralization in the deeper parts of the lesion is difficult to be achieved *in vivo*. Lagerweij and ten Cate [2002] presented remineralization of the lesions throughout their depth, but the lesions in this study were very superficial and the changes in mineral contents didn't reach more than 40 μ m from the outer surface.

With respect to fluoride depots on and in the enamel surface, no differences could be seen between a single application of APF+FD or fluoride varnish+FD compared to FD. These results are in agreement with Leme et al [2003], Maia et al. [2003]. However, raise in high fluoride concentration application frequency (μ 2 APF) showed significantly greater amounts of structurally bound and total fluoride contents compared to the demineralized and sound blocks. Lagerweij and ten Cate [2002] also found that larger amounts of fluoride are formed with high frequency of APF treatments compared to FD use.

In conclusion this study shows that FD+3 and 4 APF were the only treatments capable of increasing SMH values in relation to demineralized blocks. These treatments lead to a significant increase of soluble and non-soluble fluoride compared to demineralized and sound specimens. Although all treatments lead clinical arrestment and didn't show microhardness differences, it seems that the enamel blocks treated with a larger number of

high fluoride concentration gel applications produce a larger reservoir of fluoride ions (soluble and structurally bound) available to inhibit future demineralization processes.

Acknowledgements

The authors thank: Ceramic Materials Laboratory - UFRGS for the use of the microhardness tester; Laboratory of Materials Design and Selection - UFRGS for the use of the surface roughness profilometer and to L. H. Cândido for assistance with the roughness measurements; Rio Grande do Sul Central Laboratory for the use of the fluoride-sensitive electrode and to A. Pitta and J. Aguiar for the technical assistance and CAPES for the financial support.

References

- Arends J, ten Bosch JJ: Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res* 1992;71 (Spec Iss):924-928.
- Buchalla W et al.: Fluoride uptake, retention and remineralization efficacy of a highly concentrated fluoride solution on enamel lesions in situ. *J. Dent. Res.*: 2002;81:329-333.
- Chow LC: Tooth-bound fluoride and dental caries. *J Dent Res* 1990;69(Special Issue):595-600.
- Clarkson JJ, Barmes D, Hardwick K, Richardson LM: International collaborative research on fluoride. *J Dent Res* 2000;79:893-904.
- Cruz R, Øgaard B, Rølla G: Uptake of KHO-soluble and KHO-insoluble fluoride in sound human enamel after topical application of a fluoride varnish (Duraphat) or a neutral 2% NaF solution in vitro. *Scand J Dent Res* 1992;100:154-158.

Cury JA: Fluoride use and the control of caries as a disease; in Baratieri LN et al. (eds): Restorative Dentistry – principles and perspectives. São Paulo, Editora Santos, 2001, pp 33-68.

Dirks OB: Poreruptive changes in dental enamel. J Dent Res 1966;45:503-511.

Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res 1983;17:385-391.

Holmen L, Thylstrup A, Artun J: Clinical and histological features observed during arrestment of active enamel carious lesions *in vivo*. Caries Res 1987;21:546-554.

Jardim JJ, Pagot MA, Peres PEC, Maltz M: Manual polishing device to dental tissues specimens. Pesq Odontol Bras 2003;17 (Supplement 3):221 (Portuguese).

Koulourides T: Fluoride and the caries Process. J Dent Res 1990;69(Special Issue):558.

Koulourides T et al. Cariogenicity of nine sugars tested with intraoral device in man. Caries Res 1976;10:427-441.

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T: Na intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. J Oral Pathol 1974;3:185-196.

Lagerweij MD, ten Cate JM: Remineralization of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: An in situ study. Caries Res 2002;36:270-274.

Leme AF, Tabchoury CPM, Cury JA, Fu J, Zero DT: Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesion. Am J Dent 2003;16:91-95.

Maia LC, de Souza IPR, Cury JÁ: Effect of a combination of fluoride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluoride uptake in vitro. *Eur J Oral Sci* 2003;111:68-72.

Moreno EC: Role of Ca-P-F in caries prevention: chemical aspects. *Int Dent J* 1993;43:71-80.

Moreno EC, Zahradnik RT: Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 1974;53:226–235.

Nelson DGA, Jongebloed WL, Arends J: Morphology of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: SEM considerations. *J Dent Res* 1983;62:1201-1208.

Nyvad B; Fejerskov O: Assessing the stage caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;25:69-75.

Øgaard B, Seppä L, Rølla G: Professional topical fluoride applications – clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res* 1994;8:190-201.

White DJ: Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effect on early lesions, F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 1987;21:126-140.

Van Rijikom HM, Truin GJ, Van't Hof MA: A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of fluoride gel treatment. *Caries Res* 1998;32:83-92.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA: CARIOLOGIA

Termo de Consentimento Informado

Nome do estudo: Lesões de cárie em esmalte submetidas a diferentes tratamentos com flúor tópico

Pesquisadores Responsáveis: Prof^ª. Marisa Maltz e Juliana Jobim Jardim

Objetivo do estudo: Estudar a paralisação de lesões ativas em esmalte dentário bovino submetido a diferentes frequências de tratamento com flúor tópico.

1. Explicação dos procedimentos:

1.1. Período experimental: O participante fará uso de uma prótese parcial removível inferior, confeccionado em acrílico, com 5 janelas 4 x 4 x 2 mm onde serão colocados blocos de esmalte dentário bovino estéreis. O participante deverá **higienizar** os blocos de esmalte, **três** vezes ao dia, através de escovação com dentifrício fluoretado (1100 ppm F, NaF, base sílica). Este período terá duração de 42 dias. Uma vez por semana, o participante deverá comparecer até a Faculdade de Odontologia da UFRGS, no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Bucal, 4º andar, a fim de que os blocos possam ser removidos do dispositivo e uma aplicação tópica de flúor seja efetuada sobre os mesmos. Este procedimento será efetuado por uma das pesquisadoras responsáveis pelo estudo e, após, os blocos retornarão à prótese parcial removível inferior .

2. Acompanhamento e Assistência: O participante do estudo receberá atendimento odontológico durante o período do experimento.

3. Direito de desistência: O (a) senhor (a) pode desistir de participar deste estudo a qualquer momento, sem qualquer ônus para si.

4. Sigilo: Todas as informações obtidas neste estudo poderão ser publicadas com finalidade científica, sem divulgação dos nomes das pessoas envolvidas.

5. Consentimento:

Declaro ter lido e compreendido integralmente as informações acima antes de assinar este formulário, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste termo. Assim, livre de qualquer forma de constrangimento e coação, aceito participar deste estudo.

Participante:

Assinatura:

Data:

Este consentimento será impresso em duas cópias, sendo uma de propriedade do participante da pesquisa , e outra de propriedade dos pesquisadores responsáveis.