



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ANA CAROLINA RODRIGUES DANZI SALVIA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO EFEITO DAS TINTURAS DE
Camellia sinensis E DE *Aloe arborescens* NA
REMINERALIZAÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE
ARTIFICIAL EM ESMALTE DENTÁRIO HUMANO**

2015

ANA CAROLINA RODRIGUES DANZI SALVIA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO EFEITO DAS TINTURAS DE
Camellia sinensis E DE *Aloe arborescens* NA
REMINERALIZAÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL
EM ESMALTE DENTÁRIO HUMANO**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Dentística.

Orientadora: Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló

São José dos Campos

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Salvia, Ana Carolina Rodrigues Danzi

Avaliação in vitro do efeito das tinturas de *Camellia sinensis* e
de *Aloe arborescens* na remineralização de lesão de cárie artificial
em esmalte dentário humano / Ana Carolina Rodrigues Danzi Salvia. -
São José dos Campos : [s.n.], 2015.
203 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em
Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.
Orientadora: Rebeca Di Nicoló.

1. *Camellia sinensis*. 2. *Aloe*. 3. Flúor. 4. Cárie dentária. 5.
Remineralização dentária. I. Di Nicoló, Rebeca, orient. II. Instituto
de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ
Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de
Mesquita Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 10 de fevereiro de 2015
E-mail: ana_salvia@hotmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Eduardo Bresciani

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Eduardo Hebling

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
FOP – UNICAMP
Campus de Piracicaba

Profa. Dra. Graziela Ribeiro Batista

Faculdade de Odontologia
Universidade Braz Cubas

Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 10 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosana Maria Rodrigues Salvia e José Gilberto Danzi Salvia.

Aos meus queridos e amados avós, Neyde Pereira Rodrigues e Arlindo Rodrigues (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Àos familiares

Àos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar. Desde a juventude enfrentaram uma vida com dificuldades e com muita economia para que nada nos faltasse.

Àos meus avós, que hoje se encontram com Deus:

Arlindo Rodrigues (1930 - 2010):

Uma pessoa maravilhosa, que sempre estendeu a mão a quem precisava. Ia para a escola com os pés descalços. Quando adulto, formou-se em Direito. Sempre muito culto, com seu vocabulário rebuscado, ensinava-me a falar corretamente. Esteve sempre presente em minha vida, cuidando de mim com toda sua simpatia e carinho. Foi para mim um avô muito amado! Vivemos bons momentos juntos e não tenho palavras para agradecer tudo o que me proporcionou.

Neyde Pereira Rodrigues (1932 - 2014):

Minha avozinha querida, a pessoa que mais amei na minha vida. Deus permitiu a formação de uma união muito forte entre nós. Mais que minha madrinha, foi minha grande companheira, meu porto seguro, minha segunda mãe. Esteve ao meu lado desde quando nasci. Alimentou-me, embalou-me, ensinou-me a andar, ofereceu-me todo seu amor, carinho e amizade durante toda sua vida. Considero-me muito privilegiada por ter tido uma avó tão zelosa. Infelizmente, não fui capaz de retribuir tudo o que me fez. Qualquer espaço especial no meu coração é seu. Obrigada por tudo!

Ào meu irmão caçula, Mathêus, pela sua ajuda nos cálculos.

Ào Juninho, à Linha e aos Fífis, meus fiéis animais de estimação.
Sempre me alegrando. Não sei viver sem vocês.

Vocês sempre foram muito importantes na minha vida,
motivando-me e dando-me forças para seguir em frente.

Muito obrigada por tudo!

Aos docentes e amigos

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista na pessoa do diretor desta faculdade, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e vice-diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, em especial da Dentística: Eduardo Bresciani, Clóvis Pagani, Sérgio Gonçalves, Carlos Torres, César Pucci, Maria Amélia Araújo, Filomena Huhtala, Alessandra Borges, Taciana Caneppele e Karen Yui.

Aos professores que colaboraram na parte teórica ou experimental desta pesquisa com seus conhecimentos e sugestões: Carlos Torres, Alessandra Borges, Carolina Ramos, Eduardo Bresciani, Antônio Jorge, Ivan Bauducci e Gokithi Akisu.

Aos amigos da Pós-graduação, pela convivência e amizade: Débora, Maria Ângela, Luciana, Lucélia, Letícia, Érica, Priscila, Nathália, Helçinç, Laura, Dani, Raíssa, Ana Júlia, Daphnç, Grazi, Fernanda, Estçla, Tânia, Beatriz Maria, Maria Beatriz, Fabiana, Juliana, Marina, Mariana, Vivianç, Teozinho, Rodrigo e Rafael.

Ao amigo Rogçrio Lopes Di Nicoló.

À amiga Fábيا, estagiária do Prof. Gokithi.

Às técnicas do laboratório: Fernanda e Josiana.

À Thaís Paradella pela realização do EDS e MEV.

À assessora administrativa: Rosângela.

Aos secretários da Pós-graduação: Rosç, Ivan e Bruno.

À minha orientadora, Profa. Adj. Rebeca Di Nicoló, por aceitar ser minha orientadora, pela sua boa vontade em ensinar, pela sua confiança em mim, pelo apoio, paciência e amizade.

À Deus.

Obrigada a todos que contribuíram para o êxito desse trabalho!

“Quando a dúvida o assaltar, mantenha firme seu coração, no desejo sincero de perseverar até o fim”.

C. Torres Pastorino

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O esmalte dentário humano	17
2.2 A lesão de cárie incipiente/subsuperficial em esmalte dentário	19
2.3 O fluoreto na manutenção da saúde bucal e cinética Des-Re	21
2.4 A saliva na manutenção da saúde bucal e cinética Des-Re...	24
2.5 Lesão de cárie artificial incipiente/subsuperficial em esmalte dentário (lesão de mancha branca)	25
2.6 A aplicação terapêutica de plantas	29
2.6.1 <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze.....	29
2.6.2 Aloe (Liliaceae).....	33
2.7 Microdureza <i>Knoop</i>	37
2.8 Espectroscopia por dispersão de energia de raios-x (EDS) ...	39
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Aspectos éticos	43
4.2 Coleta e armazenamento dos dentes	43
4.3 Preparo dos espécimes	46

4.3.1 Corte dos dentes.....	46
4.3.2 Padronização das dimensões dos espécimes.....	47
4.3.3 Confeção dos suportes para fixação dos espécimes.....	48
4.3.4 Seqüência de polimento dos espécimes.....	50
4.4 Mensuração da microdureza inicial da superfície e distribuição dos espécimes em grupos.....	51
4.5 Desenvolvimento da lesão de cárie dentária artificial no esmalte (lesão incipiente/subsuperficial).....	52
4.6 Mensuração da microdureza da superfície após a formação da lesão de cárie dentária artificial.....	54
4.7 Preparo das soluções utilizadas nos tratamentos.....	55
4.8 Realização dos tratamentos.....	57
4.9 Mensuração da microdureza da superfície e em secção transversa, após os tratamentos.....	58
4.10 Espectroscopia por dispersão de energia de raios-x.....	60
4.11 Análise em microscopia de luz polarizada.....	61
4.12 Análise em microscopia eletrônica de varredura.....	63
4.13 Delineamento estatístico.....	64
4.13.1 Microdureza superficial.....	64
4.13.2 Microdureza em secção transversa.....	65
5 RESULTADO.....	67
5.1 Microdureza superficial.....	67
5.2 Microdureza em secção transversa.....	71
5.3 Espectroscopia por dispersão de energia de raios-x.....	83
5.4 Análise em microscopia de luz polarizada.....	90
5.5 Análise em microscopia eletrônica de varredura.....	96

6 DISCUSSÃO	102
6.1 Aspectos gerais	102
6.2 Microdureza superficial	106
6.3 Microdureza em secção transversa	112
6.4 Análises qualitativas: EDS, MEV, MLP	116
6.5 Considerações finais	118
7 CONCLUSÃO	119
8 REFERÊNCIAS	120
APÊNDICES	132
ANEXOS	197

Salvia ACRD. Avaliação *in vitro* do efeito das tinturas de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens* na remineralização de lesão de cárie artificial em esmalte dentário humano [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

O estudo avaliou a efetividade das tinturas de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens* na remineralização de lesão artificial de cárie subsuperficial no esmalte dentário humano. Noventa espécimes de molares permanentes hígidos foram distribuídos em 6 grupos (n=15): GH=esmalte hígido e saliva artificial, GS=esmalte cariado e saliva artificial, GA=esmalte cariado e água deionizada, GF=esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%, GC=esmalte cariado e tintura de *C. sinensis* e GB=esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*. A microdureza superficial foi mensurada nos espécimes quando hígidos (KHN₁), após a formação da lesão de cárie (KHN₂) e após os tratamentos (KHN₃). A microdureza em secção transversa (KHN_D) foi mensurada para avaliação da profundidade da lesão. Um espécime de cada grupo foi submetido: ao EDS, para avaliar a razão Ca/P do esmalte; ao MEV, para verificar alterações topográficas na superfície e à MLP para comprovar histologicamente a formação da lesão de cárie. A porcentagem do volume de conteúdo mineral foi realizada com as médias KHN₃ e KHN_D. As médias dos valores de microdureza foram submetidas aos testes estatísticos ANOVA, Tukey comparações múltiplas, Dunnett comparações múltiplas e t pareado (p<0,05). Houve aumento nos valores de microdureza superficial e em secção transversa após os tratamentos, assim como do conteúdo mineral, com exceção de GA. Concluiu-se que os tratamentos foram efetivos na remineralização da lesão de cárie tanto na microdureza superficial quanto em secção transversa, quando comparados a GA. Todos os tratamentos diminuíram a profundidade da lesão, com destaque para a solução de NaF, seguido pela tintura de *C. sinensis*, saliva e tintura de *A. arborescens*.

Palavras-chave: *Camellia sinensis*. *Aloe*. Flúor. Cárie dentária. Remineralização dentária.

Salvia ACRD. In vitro remineralizing effect of Camellia sinensis and Aloe arborescens tinctures in subsurface carious lesions developed in human dental enamel. [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

ABSTRACT

This in vitro study evaluated the effectiveness of Camellia sinensis and Aloe arborescens tinctures in the remineralization of subsurface carious lesions artificially developed in human dental enamel. Ninety specimens from sound permanent molars were distributed into 6 groups (n=15): GH=sound enamel and artificial saliva, GS=decayed enamel and artificial saliva, GA=decayed enamel and deionized water, GF=decayed enamel and 0.05% sodium fluoride aqueous solution, GC=decayed enamel and C. sinensis tincture and GB=decayed enamel and A. arborescens tincture. Surface microhardness essay was performed on sound specimens (KHN_1), after the caries lesion development (KHN_2) and after treatment (KHN_3). Cross-sectional microhardness essay (KHN_D) was performed to measure the lesion depth. One specimen of each group was submitted to: EDS to assess the enamel Ca/P ratio; SEM to verify topographical changes on the enamel surface and to the MLP to reveal the histological aspects of carious lesions. The volume percent of mineral content was performed with the KHN_3 and KHN_D averages. The microhardness averages were submitted to the following statistical analyzes: ANOVA, Tukey multiple comparisons, Dunnett multiple comparisons and paired t test ($p<0.05$). There was an increase in the surface and cross-sectional microhardness values after treatments, as well as in the mineral content, except for GA. It was concluded that the treatments were effective in remineralization of dental caries on the surface and on the cross-sectional microhardness essays, when compared to GA. All treatments reduced the depth of the lesion, especially the NaF solution, followed by C. sinensis, saliva and A. arborescens.

Keywords: Camellia sinensis. Aloe. Fluorine. Dental caries. Tooth remineralization.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é definida como uma doença infecciosa de etiologia multifatorial, relacionada à presença de biofilme dentário composto por microrganismos cariogênicos, além da dieta, tempo e suscetibilidade do hospedeiro (Stewart, 1877; Hopkins, 1899; Mummery, 1910; Castilho et al., 2007; Honório et al., 2008). Esses microrganismos, acidogênicos e acidúricos, metabolizam os carboidratos provenientes da dieta, produzindo ácidos orgânicos que desmineralizam o tecido dentário, formando no esmalte, uma lesão cáriosa subsuperficial com uma camada superficial relativamente intacta (Honório et al., 2008, 2010). Ainda, esse processo inclui outros aspectos, como a qualidade da saliva, composição mineral do dente e sua ultra-estrutura, processos de difusão e cinética de desmineralização e remineralização (Featherstone, 2008).

O primeiro sinal clínico de cárie dentária em esmalte caracteriza-se por uma lesão incipiente de mancha branca, a qual precede a cavitação. Portanto, o diagnóstico precoce e o tratamento dessas lesões são extremamente importantes, visto que são consideradas reversíveis se detectadas precocemente (Bhat et al., 2012; Torres et al., 2012).

Medidas preventivas, como a higiene bucal adequada, consultas regulares ao dentista, uso de dentifícios ou antissépticos

buciais fluoretados e ingestão de água fluoretada conduzem a uma diminuição significativa da prevalência de cárie (ten Cate, Featherstone, 1991; Honório et al., 2008). Esses e outros veículos fluoretados provaram ser efetivos na inibição do início e progressão da cárie dentária (ten Cate, Featherstone, 1991).

O emprego da fitoterapia no país, como alternativa para o tratamento e prevenção de doenças, tem aumentado a cada dia, uma vez que 25% da flora mundial está presente no Brasil (Castilho et al., 2007; Francisco, 2010). O consumo atual de medicamentos fitoterápicos pela população decorre, basicamente, do fato de que representam formas de terapia mais econômicas e/ou naturais que aquelas normalmente oferecidas e preconizadas pela indústria farmacêutica e a medicina alopática (Castilho et al., 2007). Ainda, em alguns países em desenvolvimento, até 80% da população depende exclusivamente de plantas medicinais para os cuidados primários com a saúde (Francisco, 2010). Em Odontologia, as pesquisas com plantas têm aumentado nos últimos anos devido à busca por novos produtos com maior atividade farmacológica, menor toxicidade e maior biocompatibilidade (Castilho et al., 2007; Francisco, 2010).

A cárie dentária ainda é uma doença altamente incidente, embora tenha havido um declínio da doença na maioria dos países desenvolvidos, constitui-se um dos principais problemas de saúde pública. Um dos objetivos da dentística moderna é restaurar lesões cariosas não cavitadas de forma não invasiva por meio da remineralização, visando prevenir a progressão da doença e melhorar a estética, resistência e função (Cochrane et al., 2010).

Considerando os potenciais efeitos colaterais de agentes químicos existentes no mercado para o controle da cárie dentária, existe a necessidade do desenvolvimento de novos agentes com atividade antimicrobiana, remineralizante e com baixa toxicidade para serem utilizados como bochecho. Dessa forma, considera-se relevante investigar o efeito de plantas no processo de remineralização de lesão de cárie artificial em esmalte dentário humano.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O esmalte dentário humano

O esmalte dentário é composto quimicamente de aproximadamente 96% em peso de mineral semelhante à hidroxiapatita (HA): $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ten Cate, Featherstone, 1991). Sua natureza química e estrutural permite muitas substituições em sua rede cristalina, sem perder o essencial de sua identidade (ten Cate, Featherstone, 1991). Ademais, o mineral de hidroxiapatita contém impurezas e inclusões de outros íons que provocam uma maior solubilidade do dente do que a hidroxiapatita ou a fluorapatita puras. A principal inclusão que torna os minerais do dente mais solúveis aos ácidos é o íon carbonato (CO_3^{2-}) que substitui o íon fosfato (PO_4^{3-}) na estrutura cristalina, produzindo defeitos e regiões de cálcio (Ca) deficientes. Aproximadamente 1 em cada 10 dos íons fosfato no esmalte é substituído pelo íon carbonato (Featherstone, 2008).

Os cristais de esmalte são arranjados em forma de prismas de pequena dimensão, da ordem de 40 nm de diâmetro (Featherstone, 2008). Esses prismas de esmalte estão dispostos em feixes paralelos a partir da junção amelo-dentinária (JAD) à superfície externa, sendo cada um deles composto por aglomerados de cristais de

pequenas dimensões. Os microporos entre os prismas e cristais são preenchidos com água e matéria orgânica (proteínas: amelogenina e enamelinina, e lipídios) e formam as vias de difusão para os ácidos, componentes minerais e íons fluoreto (F^-) (ten Cate, Featherstone, 1991).

Durante a amelogênese, os prismas de esmalte são formados primeiro pela deposição de uma matriz orgânica, sendo posteriormente preenchida com mineral inorgânico (ten Cate, Featherstone, 1991). Seu desenvolvimento é regulado por células epiteliais, os ameloblastos, que expressam um importante conjunto de genes que codificam a produção de proteínas essenciais para a formação desse tecido dentário. Durante o estágio de secreção, os ameloblastos sintetizam e secretam proteínas da matriz do esmalte, tais como amelogenina, ameloblastina e enamelinina, além da enzima enamelinina, também chamada MMP-20. Foram identificadas duas novas proteínas, amelotina e apina, também sintetizadas pelos ameloblastos. Estas, localizadas na lâmina basal e epitélio juncional são produzidas durante a amelogênese no estágio de maturação, fase importante para o desenvolvimento final da dureza do esmalte. Especula-se que essas proteínas tenham alguma participação no processo de adesão celular (Nishio, 2008).

2.2 A lesão de cárie incipiente/subsuperficial em esmalte dentário

A lesão de cárie incipiente/subsuperficial ou mancha branca é a precursora de uma cavidade de cárie. Essa lesão caracteriza-se por aparentar uma camada superficial relativamente intacta subjacente a uma desmineralização subsuperficial (Featherstone et al., 1978). Ela é um processo patológico transmissível, que depende de diversos fatores, como o microbiológico, salivar, composição mineral do dente, dieta cariogênica e cinética de desmineralização e remineralização (Des-Re) (Featherstone, 2008).

Os microrganismos cariogênicos são essenciais para o desenvolvimento desse processo, destacando-se os do gênero *Streptococcus*. Destes, são relatados os do grupo mutans (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae* e *S. downei*) bem como em menor escala os do grupo mitis (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*), além de *Lactobacillus* (*L. fermentum*; *L. casei*), *Actinomyces*, leveduras e bifidobactérias (Jorge, 1995; Leites et al., 2006; García-Godoy, Hicks, 2008; Beighton et al., 2010). De acordo com García-Godoy e Hicks (2008), logo após a erupção dos primeiros dentes decíduos, a colonização por *S. mutans* inicia-se em 20% das crianças com idades entre 12 a 16 meses. Os sulcos na língua podem ser um nicho ecológico para esse microrganismo cariogênico mesmo antes da erupção do primeiro dente decíduo. Ainda, segundo os autores, a principal fonte de transmissão desse microrganismo é a

vertical, pelas mães. Ela ocorre em aproximadamente 60% das crianças quando a concentração salivar da mãe possui 10^5 UFC/mL ou mais. A transmissão horizontal, pela família, amigos e cuidadores também é uma forma de colonizar a boca de crianças.

Os ácidos produzidos por essa bactéria, como o lático, acético, fórmico e propiônico, facilmente difundem-se através dos microporos do esmalte e tecido subjacente, dissolvendo os minerais do dente. Esses ácidos são difundidos no interior do tecido dentário através da água juntamente com os cristais. Quando os ácidos alcançam um sítio suscetível em uma superfície do cristal de cálcio e fosfato, são dissolvidos na fase aquosa circundante entre os cristais. Se os íons fluoreto estiverem presentes na superfície do cristal como fluoreto de cálcio (CaF_2) em concentração suficiente, antes ou durante a desmineralização, esses íons podem adsorver em direção a superfície dos cristais de fluorapatita (FA) e significativamente inibir a desmineralização pelo ácido (Featherstone, 2008).

Lesões de mancha branca no esmalte dentário, detectáveis clinicamente, podem ser remineralizadas (Bhat et al., 2012). Conseqüentemente, a remineralização é aceita como uma abordagem não invasiva viável para restaurar dentes cariados em seu estágio inicial (Bhat et al., 2012). Quando se inicia a desmineralização, esta pode apenas ser observada sob microscopia eletrônica em dentes extraídos. Com o progresso da lesão, a perda de mineral torna-se mais profunda até ser possível sua observação por radiografia, visualmente ou por métodos mais recentes, como a fluorescência induzida por laser (Featherstone, 2008).

A progressão ou reversão da cárie dentária dependem do equilíbrio Des-Re, o qual depende de fatores como a concentração de íons cálcio e fosfato na saliva, biodisponibilidade de fluoreto e potencial hidrogeniônico (pH). A remineralização ocorre quando o pH é elevado e o cálcio e fosfato da saliva, juntamente com o fluoreto, formam novos cristais de hidroxiapatita na superfície de esmalte e corpo da lesão. Histologicamente, a cárie dentária incipiente em esmalte resulta na formação de um defeito no esmalte com mineral removido da região abaixo da superfície anatômica. Assim, uma camada superficial (1-2 μm) que sofreu apenas uma perda mineral marginal sobrepõe o chamado corpo da lesão, onde a perda mineral pode aumentar até 50% em volume antes de ocorrer cavitação (Buskes et al., 1985; ten Cate, Featherstone, 1991).

2.3 O fluoreto na manutenção da saúde bucal e cinética Des-Re

A descoberta de que o fluoreto apresentava efeito na diminuição da cárie dentária foi um marco na história da odontologia (Aoba, 1997). Em comunidades onde a água de abastecimento naturalmente apresentava quantidades relativamente tóxicas de fluoreto (1,7 a 2,5 ppm), a porcentagem de crianças livres de cárie dentária era maior que em outras cidades (Dean, 1938). Dessa forma, comprovou-se a hipótese de que a aplicação tópica de fluoreto diminuía a incidência de cárie, além de que o esmalte de dentes

cariados apresentava menor quantidade de fluoreto que o de dentes hígidos (Knutson, Wallace, 1943).

O fluoreto está constantemente presente na cavidade bucal participando da cinética Des-Re, apresentando no biofilme uma concentração aproximada de 1 ppm por extensos períodos durante o dia (ten Cate, Duijsters, 1983). Contudo, sua concentração mais elevada encontra-se na superfície do esmalte, sendo de aproximadamente 1000 a 2000 ppm em áreas não fluoretadas e de 3000 ppm em áreas fluoretadas (Rošin-Grget et al., 2013). Quando aplicado sobre a superfície dentária, o fluoreto reage formando dois produtos: o fluoreto incorporado ao esmalte (fluorapatita) e o precipitado sobre o esmalte e biofilme (CaF_2) (Moi et al., 2008; Rošin-Grget et al., 2013).

Abaixo do pH crítico (5,5 e 5,0 na presença do fluoreto), a hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é dissolvida, porém os minerais liberados podem ser re-precipitados (Arnold et al., 2007). Se os íons fluoreto substituïrem completamente os íons hidroxila da HA, origina-se a fluorapatita (FA) ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$), a qual é menos solúvel aos ácidos e pode fornecer proteção adicional aos cristais de apatita (Aoba, 1997; Arnold et al., 2007). A formação de FA ocorre durante longos períodos de exposição a baixas concentrações de fluoreto tópico, variando entre 0,01 a 10 ppm (Rošin-Grget et al., 2013).

Os íons fluoreto podem promover a remineralização do esmalte previamente desmineralizado se o cálcio e o fosfato da saliva ou do biofilme estiverem disponíveis em quantidades adequadas

quando o fluoreto for aplicado (ten Cate, Duijsters, 1983; Bhat et al., 2012). Para cada 2 íons fluoreto, 10 íons cálcio e 6 íons fosfato são requeridos para formar uma unidade celular de fluorapatita (Bhat et al., 2012). Os íons fluoreto são adsorvidos à superfície do cristal de apatita atraindo íons cálcio, os quais atraem íons fosfato, iniciando a construção de uma estrutura semelhante à fluorapatita remineralizada na superfície do cristal. Essa superfície é muito menos solúvel que a original hidroxiapatita carbonatada e menos suscetível à dissolução por ácidos, promovido pelo desafio do biofilme dentário (ten Cate, Duijsters, 1983; Featherstone, 2008), visto que a substituição da hidroxila pelo fluoreto promove uma diminuição no volume dessa unidade celular, tornando-a mais densa e com estabilidade química muito maior em virtude da ligação eletrostática entre o fluoreto e os íons adjacentes (Aoba, 1997).

A aplicação tópica de materiais que contêm alta concentração de fluoreto (100 a 10000 ppm) sobre o esmalte dentário conduz à formação de CaF_2 , considerado uma fonte eficiente de íons fluoreto durante o desafio cariogênico (Aoba, 1997; Rošin-Grget et al., 2013). Em baixo pH ocorre a dissolução de CaF_2 , liberando íons fluoreto e diminuindo a desmineralização, contribuindo significativamente para a proteção dos dentes expostos ao fluido bucal (Aoba, 1997; Moi et al., 2008; Rošin-Grget et al., 2013).

2.4 A saliva na manutenção da saúde bucal e cinética Des-Re

A saliva (pH 6,7 a 7,3) desempenha um importante papel na mastigação, deglutição, fonação, possui ação antimicrobiana, além de promover a reversão ou o controle da progressão da cárie dentária. Ela atua tamponando os ácidos, formando uma solução saturada de cálcio e fosfato para inibir a desmineralização e promover a remineralização (Featherstone, 2008).

Após a erupção dentária, a superfície exposta do dente é coberta pela película adquirida. Esta consiste de uma camada acelular de proteínas protetoras derivadas da saliva, que avidamente liga-se a hidroxiapatita, via estaterina, proteínas ricas em prolina, mucinas, cistatinas, histatinas, lisozima, amilase, lactoferrina, lactoperoxidase, carbono anidro, imunoglobulina A secretória e glicosiltransferases derivadas de bactérias. A película adquirida, de espessura de 0,1 a 1,0 μm , promove uma camada lubrificante que facilita a mastigação, protege contra a desmineralização e colabora na maturação do esmalte pós-erupção. Assim, esses componentes derivados da saliva tentam anular os sub-produtos deletérios derivados do metabolismo microbiano (García-Godoy, Hicks, 2008).

As primeiras bactérias colonizadoras da saliva aderem-se à película adquirida. A estaterina e as glicoproteínas ricas em prolina possuem receptores de ancoragem que permitem que os microrganismos fixem-se firmemente em suas superfícies por forças eletrostáticas, iônico-hidrofóbicas e de van der Waals. À medida que o

biofilme amadurece, os primeiros colonizadores microbianos e os mais tardios agregam-se e aderem-se uns aos outros. Esse processo permite a co-existência de uma diversidade de microrganismos no biofilme, tais como os cariogênicos (Leites et al., 2006).

2.5 Lesão de cárie artificial incipiente/subsuperficial em esmalte dentário (lesão de mancha branca)

A lesão de cárie subsuperficial produzida artificialmente em esmalte dentário tem sido amplamente estudada tanto em dentes humanos quanto em dentes de animais (Featherstone, Mellberg, 1981a; Buskes et al., 1985; Magalhães et al., 2009; Torres et al., 2012). Técnicas como dureza, densidade mineral (microradiografia de contato), propriedades ópticas (microscopias) ou alterações na composição química (espectroscopia por infra-vermelho; difração por raios-x) tem sido empregadas para medir as alterações provocadas nesse tecido (Featherstone et al., 1983; Magalhães et al., 2009). Essa lesão caracteriza-se por apresentar uma delgada zona superficial mais mineralizada (1-2 μm) sobrejacente ao corpo da lesão, área menos mineralizada (Buskes et al., 1985; Magalhães et al., 2009). Clinicamente apresenta-se como uma mancha branca não cavitada (Featherstone et al., 1978).

A literatura relata diversos métodos para o desenvolvimento artificial de lesão de cárie dentária subsuperficial, que variam tanto no tipo de substância empregada, quanto no tipo de

substrato dentário (humano ou animal) submetido a determinado método. Esses métodos empregam soluções ou géis a base de minerais e ácidos (ácido láctico, acético, propiônico, poliacrílico, fluorídrico e outros) que variam em concentração, pH e tempo de permanência no substrato em questão. Essa variabilidade nas metodologias pode resultar em diferentes tipos de lesões cariosas subsuperficiais artificiais. Isso pode ser confirmado pelo estudo de Magalhães et al. (2009), que relataram diferenças significantes na dureza da superfície e subsuperfície de lesões cariosas em esmalte dentário bovino desenvolvidas por diferentes protocolos. Ainda, a média da profundidade da lesão provocada pelo MHDP (hidroxi-metil difosfonato)/ácido láctico foi de 86 μm , diferindo dos demais grupos (entre 35 e 52 μm). Além disso, de acordo com Featherstone e Rodgers (1981b) ao produzirem lesão cariosa em pré-molares e molares humanos, em uma concentração de 0,1 mol/L de ácido com 0,1 mmol/L de MHDP, observou-se que o ácido acético produzia lesões mais rapidamente que o ácido láctico, num mesmo pH (4,5). Além disso, enquanto a profundidade da lesão produzida pelo ácido acético era de aproximadamente 300 μm , a lesão produzida pelo ácido láctico era de aproximadamente 200 μm , em 15 dias. Por outro lado, o efeito produzido pelo ácido acético (pH 5,4) e pelo ácido láctico (pH 5) foi similar (aproximadamente 100 μm de profundidade em 15 dias).

É importante destacar que para ser formada artificialmente uma lesão cariosa subsuperficial é necessário preservar a camada superficial, a qual é influenciada pela presença de cálcio, fosfato e fluoreto na fase líquida. Lesões iniciais normalmente não

apresentam a camada superficial, a qual é formada com o tempo e, sua espessura, uma vez formada, aparenta ser mais ou menos constante (Magalhães et al., 2009). Ademais, para que essa camada superficial seja formada artificialmente, o MHDP desempenha um importante papel como inibidor de dissolução da superfície, atuando na formação de uma ampla camada superficial intacta, um corpo da lesão altamente desmineralizado e uma zona interna (zonas escura e translúcida) fracamente acometida. Isso acontece após o início do ataque ácido, em que o MHDP é adsorvido à superfície do esmalte para promover uma proteção parcial contra o condicionamento direto do esmalte. Conforme o ácido difunde-se para o interior, rapidamente ocorre dissolução de até 20% do esmalte original. Dessa forma, a camada superficial intacta é construída a partir do esmalte original remanescente pela deposição de cálcio e fosfato existentes na rede cristalina e, ao mesmo tempo o esmalte subsuperficial dissolve-se e difunde-se para o exterior sob um gradiente de concentração. A espessura final da zona superficial, que ocorre em função da concentração de MHDP, é alcançada quando a taxa de perda na superfície é igual à taxa de deposição de cálcio e fosfato na subsuperfície. Ainda, é necessária uma concentração mínima de inibidor (MHDP), porém, conforme essa concentração aumenta, a zona superficial atinge uma espessura máxima ($\approx 36 \mu\text{m}$), além da qual nenhum novo aumento ocorre (Featherstone et al., 1978). Neste mesmo estudo, os autores constataram que concentrações de 0,1 e 0,5 mM de MHDP, juntamente com o tampão lactato, produziam zonas superficiais de $36 \mu\text{m}$ após 5 dias de imersão na solução tampão.

Segundo ten Cate e Duijsters (1983), inicialmente, minerais são dissolvidos na superfície do esmalte e os íons difundem-se no meio líquido. Com a subsequente desmineralização, íons são removidos de sítios abaixo da superfície anatômica e a via de difusão torna-se crescente. Com a formação de depósitos de CaF_2 na superfície, o esmalte subjacente torna-se mais eficientemente protegido, visto que uma solução supersaturada em CaF_2 revela uma taxa de perda mineral consideravelmente menor.

Outro fato a ser questionado é o tipo de substrato utilizado para o desenvolvimento dessas lesões cariosas. Atualmente existe uma maior dificuldade na obtenção de dentes humanos livres de cárie para serem utilizados em pesquisas. Conseqüentemente, dentes de animais vêm sendo amplamente empregados como substitutos. Porém, apesar de possuírem semelhanças, esses substratos não são idênticos e, dessa forma, talvez fosse interessante comparar pesquisas realizadas com o mesmo tipo de substrato, sempre que possível. Em um estudo de Featherstone e Mellberg (1981a), mostrou-se que a progressão da lesão de cárie dentária artificial produzida por ácido láctico em gelatina (pH 4) durante 1 a 8 dias, bem como por ácido láctico e MHDP (pH 4,45) durante 2 a 30 dias foi três vezes mais rápida em incisivos bovinos permanentes que em pré-molares humanos, examinada pela embebição em corante e microscopia de luz. Um comportamento semelhante foi observado por Buskes et al. (1985), ao desenvolverem esse tipo de lesão cariosa com solução tampão contendo diferentes concentrações de MHDP em pré-molares humanos e incisivos bovinos. Foram desenvolvidas, nos dentes

bovinos, indentações de maior comprimento (menor dureza) num menor tempo de contato com a substância. Dessa forma, é importante advertir que a taxa de formação de lesão (progressão) depende da difusão dos componentes químicos através do esmalte (Featherstone; Mellberg, 1981a), do tempo, do tipo, concentração e pH da substância (Featherstone, Rodgers, 1981b).

2.6 A aplicação terapêutica de plantas

2.6.1 Camellia sinensis (L.) Kuntze

O chá é considerado uma das bebidas mais populares no mundo devido ao seu sabor agradável, aroma e efeitos benéficos à saúde, sendo seu consumo de aproximadamente 3×10^9 kg por ano (Lu et al., 2004). Os chás produzidos a partir das folhas de *Camellia sinensis* são classificados em três categorias, conforme o processo de fabricação: fermentado (chá preto), não-fermentado (chá verde) e o semi-fermentado (chá oolong) (Malinowska et al., 2008; Lima et al., 2009; Araghizadeh et al., 2013). Especialmente o chá verde tem recebido grande atenção em relação aos seus efeitos benéficos sobre diversos problemas de saúde (Araghizadeh et al., 2013). Suas atividades farmacológicas estão associadas à diminuição de câncer bucal, de AVC, de doenças cardiovasculares, do colesterol e

obesidade, da cárie dentária, além de possuir propriedade antialérgica, anti-esclerótica e antimicrobiana, ser rico em minerais, cafeína, aminoácidos e vitamina K (Reto et al., 2007; Lima et al., 2009; Araghizadeh et al., 2013).

Os efeitos promotores de saúde do chá verde são principalmente atribuídos aos seus polifenóis, comumente referidos como catequinas. Existem quatro principais tipos de catequinas: epigallocatequina-3-galato (EGCG), que representa 59% do total de catequinas; epigallocatequina (19%), epicatequina-3-galato (13,6%) e epicatequina (6,4%). O chá verde também contém ácido gálico e outros ácidos fenólicos tais como o ácido clorogênico e cafeico, e flavonóis como o caempferol, miricetina e quercetina (Lima et al., 2009; Awadalla et al., 2011; Araghizadeh et al., 2013).

Um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da cárie dentária é o consumo da sacarose, considerada o açúcar de maior cariogenicidade devido a capacidade de microrganismos cariogênicos metabolizarem-na rapidamente, produzindo ácidos orgânicos e polissacarídeos extracelulares bioadesivos, um fator de virulência relevante (Daglia et al., 2011). E de uma forma interessante, a literatura tem mostrado uma forte atividade antimicrobiana dos polifenóis, que apresentam em comum o radical galoil (pirogaloil), responsável pela inibição da atividade enzimática (Hirassawa et al., 2006) e da aderência de células bacterianas à superfície dentária (Ferrazzano et al., 2011).

Os polifenóis diminuíram a hidrofobicidade da superfície celular de *S. mutans* e sua capacidade de produzir, a partir

da sacarose, o insolúvel e bioadesivo polímero glucano, que permite a formação do biofilme dentário (Daglia et al., 2011). Ademais, inibiram o crescimento de diversas bactérias patogênicas como *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* metilina-resistente, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysentery*, *S. flexneri* e *Vibrio cholerae*, vírus da imunodeficiência humana, hepatites virais e influenza (Araghizadeh et al., 2013). Todos os isolados de *S. mutans* foram sensíveis ao extrato do chá verde nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL e exibiram zonas de inibição de 10 a 38 mm (Araghizadeh et al., 2013).

O bochecho com o chá verde 2% durante 5 minutos diminuiu a contagem de *S. mutans* na saliva e no biofilme dentário (Awadalla et al., 2011). Ainda, o bochecho com um enxaguatório bucal composto por *C. sinensis*, utilizado por pacientes após a extração de terceiros molares inclusos (duas vezes ao dia, durante sete dias), diminuiu a contagem total de microrganismos em ágar sangue, além de *Streptococcus* do grupo mutans, *Staphylococcus* spp., *Candida* spp., enterobactérias e pseudomonas, em fios de sutura porém, não superou a clorexidina 0,12% (Faria et al., 2011). Outra formulação de enxaguatório bucal de *C. sinensis*, utilizado durante um minuto, três vezes ao dia, por um total de 7 dias, também diminuiu a contagem de *S. mutans* e *Lactobacillus* presentes na saliva (Ferrazzano et al., 2011).

A solução de epigallocatequina-galato (EGCG) 5 mg/mL, utilizada para bochecho durante 5 minutos, inibiu a diminuição do pH em meio contendo bactérias cariogênicas, porém

não eliminou as células (*S. mutans* e *S. sobrinus*) em meio contendo sacarose, nem mesmo 90,4% dos estreptococos bucais aderidos ao disco de hidroxiapatita revestida por saliva humana. Contudo, foi efetiva na diminuição da produção de ácido pelo biofilme dentário coletado de molares e de *S. mutans* (incubado em meio com sacarose). Ademais, EGCG e epicatequina-galato inibiram em 99 e 92%, respectivamente, a atividade lactato desidrogenase, que converte o ácido pirúvico a ácido láctico (Hirassawa et al., 2006).

O chá verde diminuiu consideravelmente o biofilme de *C. albicans* aderido à resina acrílica termopolimerizável convencional, após imersão durante 15 minutos na sua infusão, apresentando diferença estatisticamente significativa do controle negativo (Antunes et al., 2014).

C. sinensis promoveu aumento significativo da microdureza em dentina erodida, após 1 minuto de imersão em seu extrato hidroetanólico (Mirkarimi, Toomarian, 2012). Segundo os autores, as catequinas presentes na planta podem ter inibido a ação das metaloproteinases, retardando a progressão da erosão. Ou ainda, podem ter permitido a formação de um depósito superficial de materiais orgânicos sobre a dentina. As metaloproteinases são endopeptidases que participam da organização da matriz orgânica do esmalte e dentina e de sua mineralização. Estão presentes na dentina e são responsáveis pela hidrólise de componentes da matriz extracelular durante os processos de remodelamento e degradação no ambiente bucal (Mirkarimi, Toomarian, 2012).

A planta *C. sinensis* também é conhecida como uma acumuladora de flúor. O fluoreto é seletivamente absorvido do solo pela planta, permanecendo em suas folhas como um ânion. Seu teor nas folhas de chá pode ser 1000 vezes o do fluoreto solúvel em água e de 2 a 7 vezes o teor total de fluoreto no solo. Sabe-se também que seus níveis nas folhas e caules aumentam com a idade da planta (Lu et al., 2004; Malinowska et al., 2008). Dentre os diversos minerais encontrados no chá, observou-se que as quantidades de potássio, cálcio e fluoreto foram respectivamente: 92 a 151 mg/L, 1,9 a 3,5 mg/L e 0,8 a 2,0 mg/L, nas diferentes marcas comerciais analisadas (Reto et al., 2007). Numa infusão preparada com folhas secas de *C. sinensis*, foi constatada a presença de 42 ppm de íons fluoreto (Daglia et al., 2011).

De maneira geral, o consumo do chá verde é seguro para a maioria das pessoas, quando ingerido com moderação. Quando administrado por via oral, os possíveis efeitos adversos são distúrbios gastrointestinal e do sistema nervoso central, devido à cafeína contida no chá (Araghizadeh et al., 2013).

2.6.2 *Aloe* (Liliaceae)

Aloe é uma planta conhecida vulgarmente como babosa. Evidências históricas indicam sua origem africana, cultivada no Egito há milhares de anos, com registros de sua utilização pelos

povos do Mediterrâneo que remontam ao ano de 400 a.C. (Gutterman, Chauser-Volfson, 2008; Martins, 2010). A palavra *Aloe* provém do árabe, via grego e latim, que significa amargo e brilhante ou transparente, porque quando se remove a casca, o gel interno assemelha-se a um bloco de gelo molhado (Martins, 2010).

Embora existam mais de 300 espécies do gênero *Aloe*, poucas apresentam propriedades medicinais, sendo *Aloe vera* a mais comumente estudada, possuindo também valor nutricional. Seu nome científico foi concedido por Carl Von Linne, em 1720, sendo, posteriormente, também referida como *Aloe barbadensis* Miller (Araújo et al., 2002; Lissoni et al., 2009; Bisi-Johnson et al., 2011).

O gênero *Aloe* possui diversas atividades biológicas, como a antisséptica, antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, imuno-reguladora, detoxificante, cicatrizante, antimicrobiana e antiviral (Ali et al., 1999; Araújo et al., 2002; Lissoni et al., 2009; Bisi-Johnson et al., 2011, Bastian et al., 2013; Coopoosamy, Naidoo, 2013; Di Luccia et al., 2013), as quais devem-se às diversas substâncias presentes nesse gênero, como as ligninas e saponinas, antraquinonas, vitaminas (A, B₁, B₂, B₃, B₆, B₁₂, C, D, E, ácido fólico/B9) colina, monossacarídeos e polissacarídeos (celulose, glicose, manose, galactose), oxidase, amilase, catalase, lipase, alinase, taninos e esteróides. Essa planta também possui minerais como o cálcio (18,6 mg/L), carbonato de potássio (31,4 mg/L), ferro, sódio, magnésio, manganês, cromo e zinco (Martins, 2010).

A espécie *Aloe arborescens* Miller encontra-se nas regiões montanhosas do sul da África. Atualmente é cultivada como

matéria-prima para medicamentos, cosméticos e alimentos em diversos países como a China, Israel, Itália, Japão, Polônia e Ucrânia (Bastian et al., 2013). Essa planta contém antranóides; derivados de antraquinona, tais como a aloína A (barbaloína), aloína B (isobarbaloína) e aloemodina no sumo das folhas secas; alquil cromonas (aloeresina A, B e C); pironas (aloenina e aloearabinosídeo); heteropolisacarídeos (acemananas, betamananas, glucomananas, arabinogalactanos, galacturonanas semelhantes ao ácido pectínico), glicoproteínas (lectinas P-2 e S-1, aloctina A e B), poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), carboxipeptidase (enzima que inativa a bradicinina) e proteína (Beppu et al., 2004; Bastian et al., 2013). *A. arborescens* auxilia no tratamento de queimaduras, acelerando o processo de cicatrização; possui atividades imunoestimulante (acemannana) e antiproliferativa para as células cancerosas (antraceno, antraquinona, e aloenina) (Di Luccia et al., 2013). Seus componentes fenólicos (barbaloína, aloenina e derivados da aloeresina) também são conhecidos por proteger a pele dos raios solares, queimaduras, alta radiação, para tratar úlceras gástricas e diabetes. Ademais, o consumo do sumo de suas folhas é permitido no Japão, porém o consumo das folhas de *A. vera*, *A. ferox* e *A. africana* é proibido (Gutterman, Chauser-Volfson, 2008).

Medicamentos à base de extratos aquosos das folhas de *A. arborescens* têm sido utilizados no tratamento sintomático e profilaxia de infecções do trato respiratório superior (resfriado) desde a década de 1950, possuindo um perfil terapêutico único e excelente segurança, sendo particularmente adequados para o uso em crianças

(Bastian et al., 2013). O primeiro medicamento baseado no extrato das folhas de *A. arborescens*, oficialmente registrado na Polônia em 1958, foi a ampola para injeção subcutânea ou intramuscular de Biostymina[®], indicada para crianças. Em 1990 foi desenvolvido o xarope Bioaron C[®] (extrato líquido das folhas frescas de *A. arborescens* combinado à vitamina C) (Bastian et al., 2013). A literatura relata seu efeito antidiabético em ratos, por meio de compostos fenólicos concentrados extraídos das folhas dessa espécie, ao serem administrados por via oral. O mesmo efeito não foi observado com *A. vera* (Beppu et al., 2006).

É importante ressaltar que a efetividade de um extrato depende da natureza do solvente, da espécie da planta e do tipo da folha (seca ou fresca). Um determinado solvente é capaz de extrair um determinado componente da planta (Ali et al., 1999). No entanto, as condições para seu cultivo (variação sazonal) podem influenciar os níveis de compostos que estão associados ao seu uso na medicina popular, sendo os meses mais quentes os mais favoráveis para a maior concentração de substâncias (Beppu et al., 2004). Ademais, existem diversos métodos de preparo do extrato da planta, que variam entre comunidades. Alguns produzem infusões da planta fresca ou seca, administrada por via oral; outros espremem seu sumo para aplicação direta em lesões; outros pulverizam as folhas, que são em seguida, misturadas com geléia de petróleo, formando uma pasta que é aplicada topicamente sobre feridas (Coopoosamy, Naidoo, 2013).

Os extratos etanólicos das folhas secas de espécies de *Aloe* (*A. arborescens*, *A. vera* e *A. eru*) apresentaram maior atividade

antifúngica (*Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* e *Fusarium moniliforme*), seguidos por clorofórmio, benzeno e água (Ali et al., 1999). *Aloe vera*, adicionada ao dentifrício, resultou na diminuição da gengivite e acúmulo de biofilme dentário, porém sem diferença significativa quando comparado ao dentifrício convencional fluoretado (Oliveira et al., 2008).

2.7 Microdureza *Knoop*

A dureza pode ser definida como a capacidade do material de resistir a uma deformação plástica quando em contato com um penetrador (indentador) sobre o qual é aplicada uma carga (Rocha, 2006; Bertol, 2009). É amplamente utilizada na caracterização de materiais e no estudo de propriedades mecânicas (Rocha, 2006).

O método *Knoop* é utilizado para a medição de microdureza, adaptado para microestruturas, na qual um penetrador de diamante com formato de pirâmide alongada é pressionado contra uma superfície devidamente polida sob uma determinada carga durante um tempo definido. A microdureza *Knoop* (KHN=*Knoop Hardness Number*) é representada pela fórmula:

$$\text{KHN}_{(\text{Kg/mm}^2)} = \frac{14230 \text{ K}}{\text{L}^2}$$

onde K é a carga aplicada em gramas e L é o comprimento medido da diagonal maior da indentação em μm (Featherstone et al., 1983; Souchois et al., 2008). Para a determinação da dureza *Knoop*, somente a diagonal maior (três vezes maior que a diagonal menor) da indentação é medida e usada na fórmula para o cálculo de KHN. Segundo Arends e ten Bosch (1992), o comprimento da indentação é determinado microscopicamente em μm . Ademais, a raiz quadrada da microdureza de superfície (final) (após a lesão de cárie, por exemplo) é proporcional ao comprimento da indentação (citado por Magalhães et al., 2009).

O teste de microdureza *Knoop* permite a aplicação de cargas entre 0,01 e 1 kgf, utiliza microscópio acoplado ao equipamento, tempo mínimo de indentação de 5 a 15 s, distâncias entre cada indentação, velocidade entre 15 a 70 $\mu\text{m/s}$ e comprimento mínimo de 20 μm das diagonais das marcas de microdureza (Rocha, 2006; Soprano, 2007).

A microdureza *Knoop* é aplicada na Odontologia para avaliar propriedades mecânicas de materiais odontológicos e também alterações no tecido dentário (evidência de ganho ou perda mineral como consequência de remineralização ou desmineralização) (Featherstone et al., 1983; Arends, ten Bosch, 1992; Magalhães et al., 2009). Se o comprimento da indentação aumenta, o tecido perdeu mineral, porém, se o comprimento da indentação diminui, o tecido provavelmente adquiriu mineral (Arends, ten Bosch, 1992). Como os valores de dureza estão estreitamente relacionados ao conteúdo mineral do esmalte dentário normal e desmineralizado, tanto em

lesões cárias naturais quanto em artificiais, é possível determinar-se a porcentagem do volume de conteúdo mineral, utilizando-se a equação proposta por Argenta et al. (2003) e Souchois et al. (2008):

$$\text{Vol\% mineral} = 4,3(\sqrt{\text{KHN}})+11,3$$

Ademais, a profundidade da lesão cária é definida pela distância da superfície externa à posição em que o conteúdo mineral alcança 95% do volume mineral do esmalte hígido. Portanto, os perfis de microdureza podem ser utilizados para mensurar alterações na dureza de esmalte ou dentina e a perda ou ganho de conteúdo mineral (Souchois et al., 2008).

2.8 Espectroscopia por dispersão de energia de raios-x (EDS)

A espectroscopia por dispersão de energia de raios-x (EDS) é um dos recursos da microscopia eletrônica de varredura (MEV) que permite a análise composicional de materiais com dimensões lineares de aproximadamente 1 μm , desde que os elementos estejam em concentração suficiente e que sejam suficientemente pesados (elementos mais pesados que o Boro) (Chinaglia, Correa, 1997; Mainjot et al., 2013), atuando como um poderoso instrumento para análise qualitativa e quantitativa dos elementos químicos encontrados nos materiais, em porcentagem

atômica ou em peso (Neckel, 2009; Soares, 2011). A grande vantagem da técnica deve-se ao fato da análise poder ser realizada a partir de um volume muito pequeno de material, sendo que a detecção dessa pequena quantidade de massa de amostra deve ser limitada pelo volume de interação do feixe de elétrons. Para elementos com número atômico $Z > 10$, o limite de detecção da técnica varia entre 10 e 100 ppm³ (Chinaglia, Correa, 1997) e os espectros de raios-x podem ser obtidos para todos os elementos da tabela periódica, com exceção do hidrogênio ($Z = 1$) (Dedavid et al., 2007).

Os sinais utilizados na análise química por EDS são gerados a partir da interação de um feixe de elétrons de alta energia (20 kV de potencial) com os elementos químicos da superfície da amostra, produzindo-se fótons de raios-x específicos do número atômico da amostra. Dessa forma, o seu comprimento de onda ou sua energia podem ser utilizados para identificar o elemento que está emitindo a radiação (Chinaglia, Correa, 1997; Dedavid et al., 2007). Os sinais gerados pela amostra são captados por detectores específicos e apresentados na forma de espectros de energia versus intensidade relativa dos picos. Esta deve considerar alguns fatores, uma vez que a geração dos fótons está sujeita a flutuações estatísticas, sendo o valor medido sempre uma média (Chinaglia, Correa, 1997).

A interpretação dos espectros é facilitada por uma base de dados que contém, para cada elemento, as energias e a intensidade das raias que as produziu. É possível localizar, para cada energia do espectro, a lista dos elementos que possuem uma raia neste domínio energético, e também, fazer aparecer sobre o espectro um diagrama

em barras representando a posição e as energias das raias deste elemento. Porém, os elementos em quantidade inferior a 0,2% em massa não poderão ser detectados (Dedavid et al., 2007).

Os raios-x emitidos da amostra, devido ao bombardeio de elétrons, podem ser detectados pelo espectrômetro convencional de cristais ou pelos dispositivos de estado sólido, silício dopado com lítio. O feixe de elétrons é suficientemente energético para ionizar camadas profundas dos átomos da amostra e produzir também a emissão de raios-x, além da emissão de outras partículas como os elétrons retro-espalhados utilizados na formação da imagem. A resolução espacial da análise depende da energia dos raios-x detectados e da natureza do material. Na configuração de um microscópio eletrônico pode-se acoplar um detector de raios-x EDS que permite coletar fótons produzidos pelo feixe de elétrons primários. A zona analisada será aquela percorrida pelo feixe. No caso de varredura, a análise será de toda a superfície da imagem, sendo possível, também, parar a varredura em um ponto (*spot*) selecionado na imagem (Dedavid et al., 2007).

Com base na descrição exposta, considerou-se relevante a investigação do potencial das tinturas das plantas *Camellia sinensis* (chá verde) e *Aloe arborescens* (babosa) na remineralização de lesão de cárie artificial no esmalte dentário humano, por meio da análise de microdureza *Knoop* (quantitativa), assim como pelas análises de EDS e MEV (qualitativas).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a efetividade das tinturas de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens* na remineralização de lesão de cárie incipiente/subsuperficial desenvolvida artificialmente em esmalte dentário humano permanente, por meio da microdureza superficial e em profundidade (secção transversa). As análises de EDS e MEV tiveram caráter qualitativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CONEP; CAAE: 13706713.7.0000.0077) devido à utilização de dentes humanos indicados para extração. A coleta dos dentes com indicação de extração, doados pelos pacientes, foi autorizada pelo professor responsável pela clínica de Cirurgia e Periodontia desta instituição (ICT-UNESP), para sua utilização em pesquisa. Os documentos referentes à aprovação do estudo pelo CONEP, bem como pela autorização da coleta dos dentes doados, assinada pelo professor responsável pela clínica, encontram-se no item Anexo (A e B, respectivamente).

4.2 Coleta e armazenamento dos dentes

Foram coletados 20 dentes molares humanos permanentes hígidos, irrompidos, com indicação de extração devido a

problemas periodontais, obtidos da Clínica de Cirurgia e Periodontia do ICT-UNESP. Durante o período de coleta, os dentes foram armazenados em recipiente plástico tampado contendo água deionizada (trocada semanalmente) em temperatura ambiente. Após, os dentes foram limpos com curetas periodontais para a remoção de debris e acondicionados a 4 °C em água deionizada, trocada semanalmente, até o momento do uso. Sua manipulação foi realizada com equipamentos de proteção individual (EPI).

Devido à presença de microrganismos em dentes extraídos, optou-se inicialmente, por realizar sua esterilização previamente à confecção dos espécimes. Dessa forma, uma pequena quantidade de dentes coletados, armazenada em frasco plástico tampado contendo água deionizada, foi esterilizada por radiação gama com cobalto 60 (25 kGy/6 h) (Embrarad, Cotia, SP). O processo de esterilização ocasionou alteração da cor e aumento da friabilidade do esmalte, impossibilitando a obtenção de espécimes como descrito no item 4.3.1 (o esmalte de todos os dentes esfacelou-se durante o procedimento de corte e tais dentes danificados foram descartados). A escolha por este método de esterilização baseou-se em estudos prévios (Rodrigues et al., 2004; Brauer et al., 2008). Brauer et al. (2008) relatam alterações mínimas nas propriedades mecânicas (módulo de elasticidade e dureza) de esmalte e dentina de terceiros molares humanos, utilizando-se as respectivas dosagens e tempos de exposição: 7 kGy/40 h e 35 kGy/200 h. Rodrigues et al. (2004), ao esterilizarem terceiros molares humanos impactados com a dosagem de 25 kGy, relataram não haver alterações significantes na

microdureza do esmalte. O tempo de irradiação não foi revelado. Infelizmente, o mesmo resultado não foi atingido no presente estudo.

Outros métodos de esterilização como a autoclavagem, sendo os dentes imersos em solução salina e ciclo de 30 min. a 121°C/ 15 psi (Cicccone-Nogueira, 2009) ou durante 15 min., armazenados secos (Freitas, 2011), o uso de óxido de etileno (7 h) ou o armazenamento em solução de formalina 10% (7 dias) provocou diminuição significativa da microdureza do esmalte de molares humanos irrompidos, comparada ao controle (sem esterilização) (Cicccone-Nogueira, 2009; Freitas, 2011). Ademais, os métodos de desinfecção pelo armazenamento em solução de timol 0,1% ou azida de sódio 0,02% mostraram-se ineficientes na descontaminação de dentes humanos comparados ao controle, além de diminuir sua microdureza de superfície (Freitas, 2011). A análise das placas foi realizada de modo qualitativo (presença ou ausência de crescimento bacteriano), uma vez que houve grande proliferação de microrganismos, o que impossibilitou a contagem de unidades formadoras de colônias nas diversas diluições. Dessa forma, optou-se por manter os dentes do presente estudo armazenados apenas em água deionizada a 4 °C (trocada semanalmente), os quais foram manipulados com o uso de EPI, concordando com outros estudos que não mencionaram métodos de desinfecção ou esterilização de dentes humanos para o uso em pesquisa (Sano et al., 2007; Kumar et al., 2008; Lata et al., 2010; Bhat et al., 2012; Meharry et al., 2012). Uma possível alternativa para diminuir a infecção cruzada devido à utilização de dentes contaminados nos aparelhos de laboratório seria

proteger esses dispositivos com barreiras descartáveis (quando possível) além da desinfecção com álcool 70° INPM ou outro desinfetante equivalente após sua utilização.

4.3 Preparo dos espécimes

4.3.1 Corte dos dentes

Os dentes foram posicionados em uma máquina cortadora de amostras e as coroas foram cortadas com uma broca trefina com partículas de diamante em sua ponta ativa (Torres et al., 2012) acoplada à máquina, sob refrigeração a água. Foram obtidos 6 espécimes de formato cilíndrico das superfícies livres e proximais de cada coroa dentária (Figura 1). O armazenamento dos espécimes foi realizado a 4 °C em água deionizada para evitar desidratação.

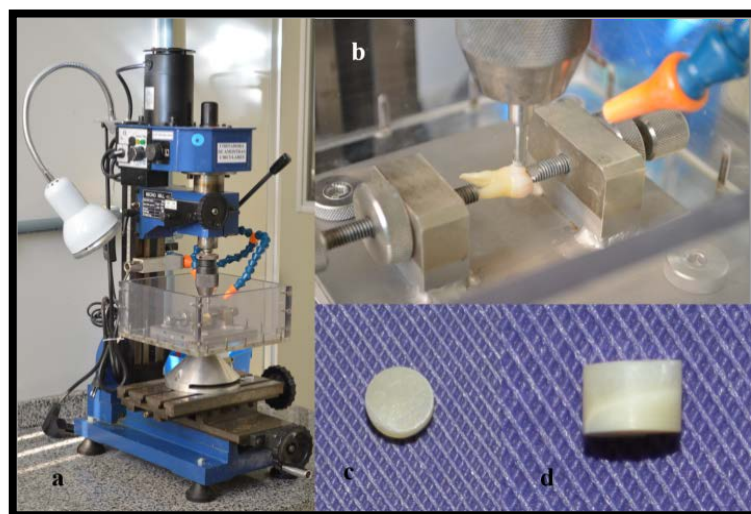


Figura 1 - Corte dos dentes; a = máquina cortadora de amostras; b = dente em posição de corte; c = espécime em vista superior; d = espécime em vista lateral.

4.3.2 Padronização das dimensões dos espécimes

Cada espécime foi inserido no interior de uma matriz metálica (Torres et al., 2012), com dimensões fixadas em 3 mm de diâmetro e 2,20 mm de profundidade, verificada por meio de paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A superfície de dentina ficou voltada para o exterior do orifício da matriz metálica e foi desgastada com papel abrasivo de óxido de alumínio (Al_2O_3) de granulação 1200 (Erios, Equipamentos Técnicos e Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica SA, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração a água e baixa velocidade. Posteriormente, a posição do espécime foi invertida e a superfície de esmalte foi desgastada nas mesmas condições, resultando num espécime de

superfícies de esmalte e dentina planas e paralelas entre si com 2,20 mm de altura (Figura 2).

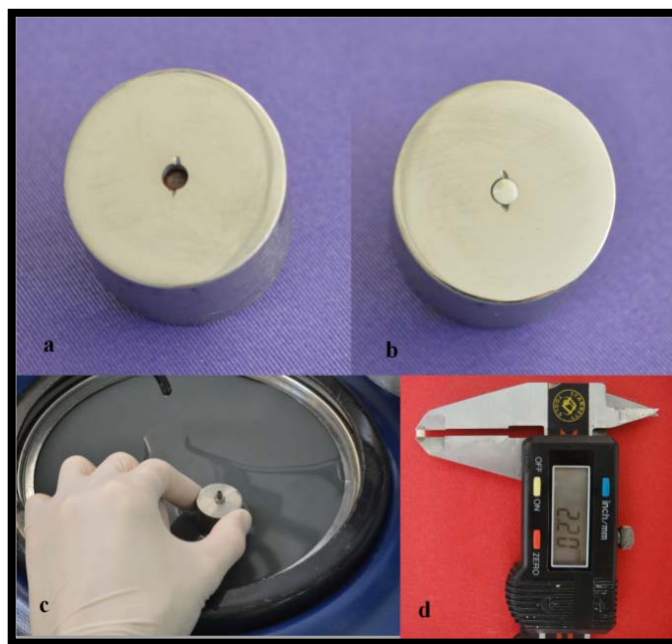


Figura 2 - Espécime posicionado na matriz metálica para polimento; a = matriz metálica; b = espécime dentro da matriz; c = polimento do espécime; d = mensuração do espécime após polimento.

4.3.3 Confeção dos suportes para a fixação dos espécimes

Foram confeccionados 90 suportes com cano de Policloreto de Vinil (PVC) (Amanco, São Paulo, SP, Brasil) de 2,5 cm de diâmetro, cortado em cilindros de 2,0 cm de altura, por meio de um serrote. Posteriormente, os cilindros foram inseridos no interior de uma matriz de silicone e preenchidos com resina acrílica autopolimerizável (RAAQ) (Jet, Clássico, Campo Limpo Paulista, SP,

Brasil), na proporção sugerida pelo fabricante, manipulada em um pote Paladon e vertida dentro dos cilindros de PVC em consistência fluida. Após o término da polimerização, os canos foram retirados da matriz e as irregularidades foram removidas com papel abrasivo (Al_2O_3) de granulação 400 (Erios, Equipamentos Técnicos e Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica SA, São Paulo, SP, Brasil), com 5 pesos, sob refrigeração a água.

Em seguida, cada espécime foi fixado com cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, SP, Brasil) sobre o suporte de PVC, com a superfície de esmalte voltada contra o mesmo (Figura 3). Essa etapa foi efetuada para facilitar o manuseio dos espécimes e promover a padronização do polimento da superfície de esmalte e das medidas de microdureza.

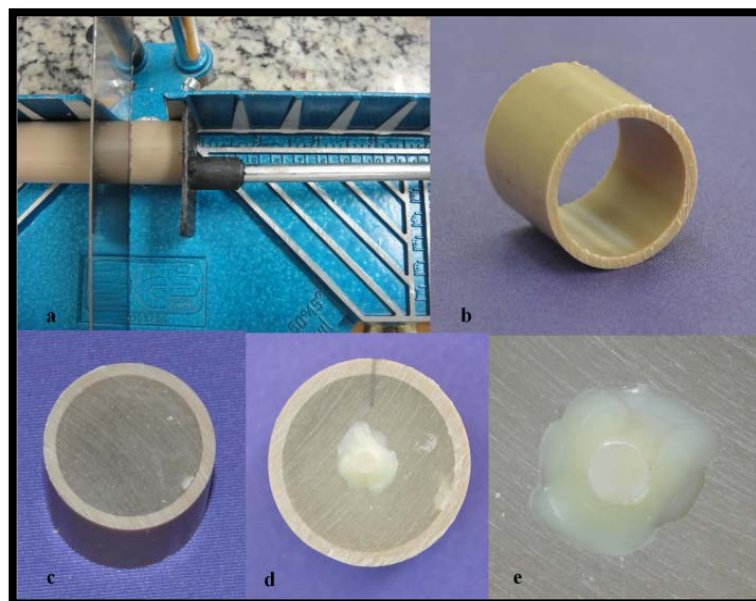


Figura 3 - Confeção dos suportes para a fixação dos espécimes; a = corte do cano de PVC; b = cano cortado; c = cano preenchido com RAAQ; d = espécime fixado ao cano com cera pegajosa; e = d em maior aumento.

4.3.4 Seqüência de polimento dos espécimes

Os espécimes, fixados em seus suportes de PVC, foram posicionados em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica SA, São Paulo, SP, Brasil) para receberem polimento da superfície de esmalte com a seqüência de papéis abrasivos (Al_2O_3) nas granulações 2400 e 4000 (Erios, Equipamentos Técnicos e Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) durante 1 min. com o primeiro e 2 min. com o segundo, realizado em baixa velocidade, com 2 pesos e refrigeração a água (Figura 4).



Figura 4 - Polimento dos espécimes.

4.4 Mensuração da microdureza inicial da superfície e distribuição dos espécimes em grupos

A medida da microdureza *Knoop* foi realizada na região central da superfície de esmalte dos espécimes em microdurômetro FM-700 (Future-Tech, Tóquio, Japão), com carga de 25 g por 10 s. Os espécimes foram acoplados ao aparelho e foram realizadas 3 indentações separadas entre si em 100 μm (0,1 mm), e a média dos valores calculada (KHN_1 = média de microdureza inicial da superfície) (Figura 5; APÊNDICE A, Quadro 1). Posteriormente, os espécimes foram distribuídos de forma estratificada em 6 grupos, pelo programa Microsoft Office Excel 2007 (APÊNDICE A, Quadro 2). Optou-se pela distribuição estratificada para que todos os grupos apresentassem espécimes de maior e menor média de microdureza, permitindo uma maior homogeneidade entre os grupos (Gomez et al., 2014). A descrição do método da realização da distribuição estratificada encontra-se no item Apêndice A.

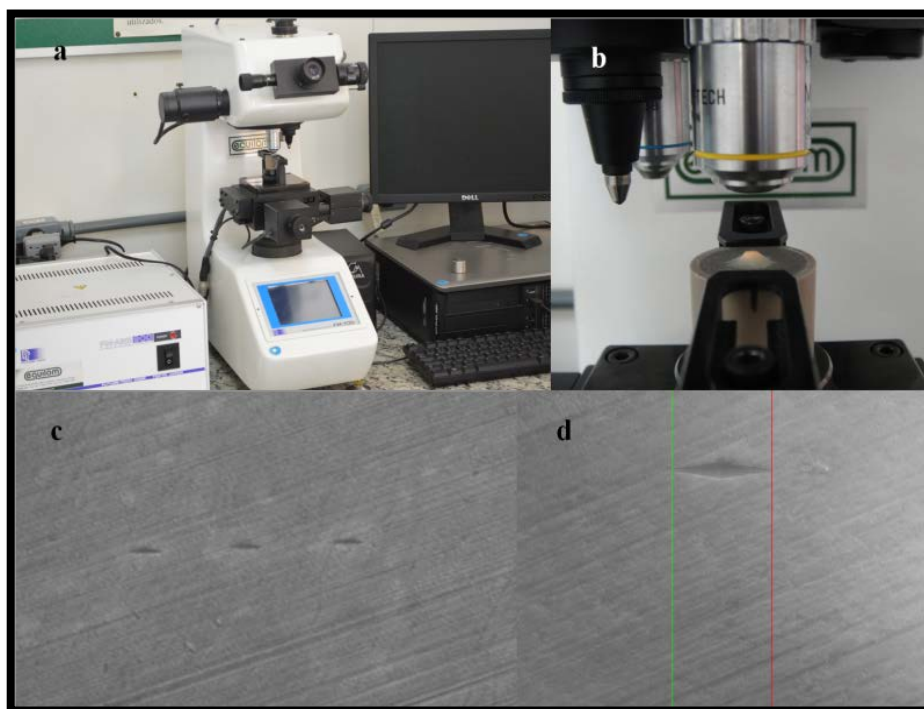


Figura 5 - Mensuração da microdureza inicial; a = microdurômetro; b = espécime acoplado ao microdurômetro; c = três medidas/impressões iniciais; d = mensuração da impressão.

4.5 Desenvolvimento da lesão de cárie dentária artificial no esmalte (lesão incipiente/ subsuperficial)

Setenta e sete espécimes (75 de GS a GB e 2 para MLP) foram armazenados no interior de um recipiente plástico vedado com filme de PVC (Majipack, Inproco Ind. e Com. Ltda., Campinas, SP, Brasil), permanecendo totalmente imersos em 2 L da solução tampão desmineralizante (aproximadamente 26 mL por espécime), durante 10 dias, sob agitação moderada (40 rpm) e constante em agitador orbital (Gyro Twister 3D, Labnet International Inc., NJ, EUA), a temperatura ambiente (Figura 6). A mesma

quantidade de solução foi substituída a cada 24 h, com o auxílio de uma proveta graduada. Os espécimes do grupo GH não foram submetidos à formação de cárie artificial (parâmetro de comparação com o esmalte hígido). Diariamente, um espécime aleatório foi removido da solução e visualizado em microdurômetro para assegurar a ausência de erosão (Buskes et al., 1985). A solução desmineralizante utilizada neste estudo consiste num tampão de acetato contendo hidroxi-metildifosfonato (MHDP), composta de 3 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mM de KH_2PO_4 , 50 mM de CH_3COOH , 10 M de KOH (ajuste do pH) e 2-5 μM (0,5 a 12,5 ppm) de MHDP (Buskes et al., 1985), ajustada a pH 4,8. Esta solução foi preparada no Laboratório de Dentística do ICT-UNESP.



Figura 6 - Espécimes sendo submetidos à formação de lesão de cárie artificial durante 10 dias.

4.6 Mensuração da microdureza da superfície após a formação da lesão de cárie dentária artificial

Após a formação da lesão de cárie dentária artificial, a mensuração da microdureza *Knoop* foi realizada na região central da superfície de esmalte dos espécimes em microdurômetro FM-700 (Future-Tech, Tóquio, Japão), com carga de 10 g por 10 s. Foram efetuadas 3 impressões separadas entre si em 100 μm , situadas inferiormente às impressões iniciais (Figura 7), obtendo-se uma média dos valores (KHN_2 = média de microdureza da superfície após a formação da lesão de cárie artificial) (APÊNDICE A, Quadro 3).

A partir das novas médias de microdureza da superfície (KHN_2), os espécimes submetidos ao processo de cárie artificial foram novamente distribuídos de forma estratificada em 5 grupos ($n = 15$) pelo programa Microsoft Office Excel 2007 (APÊNDICE A, Quadro 4), com exceção de GH (esmalte hígido e saliva artificial):

- GS: esmalte cariado e saliva artificial (controle positivo);
- GA: esmalte cariado e água deionizada (controle negativo);
- GF: esmalte cariado e solução aquosa de NaF 0,05%
- GC: esmalte cariado e tintura de *Camellia sinensis* (chá verde);
- GB: esmalte cariado e tintura de *Aloe arborescens* (babosa).

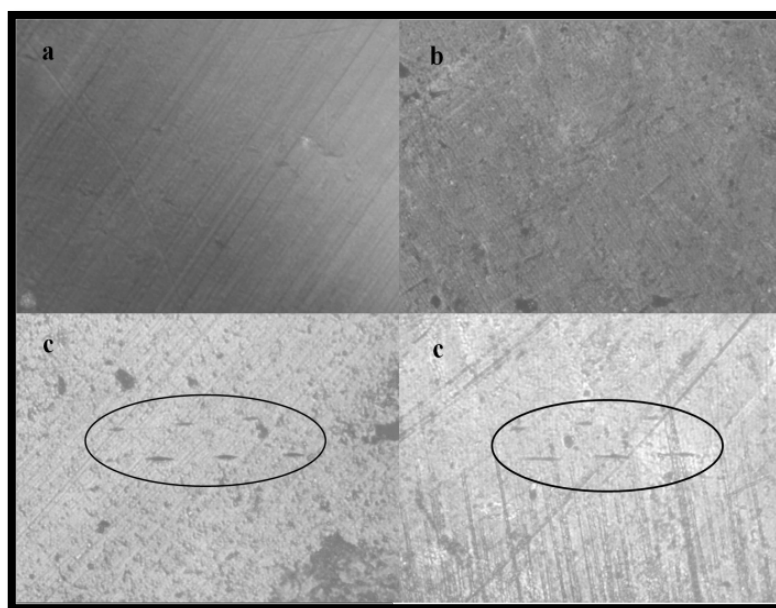


Figura 7 - Imagem da superfície de esmalte hígido e após a formação de lesão de cárie artificial (visualizados em microdurômetro); a = imagem de esmalte hígido; b = imagem de esmalte cariado artificialmente; c = indentações (1ª linha: medida no espécime hígido; 2ª linha: medida no espécime cariado).

4.7 Preparo das soluções utilizadas nos tratamentos

Os tratamentos selecionados para este estudo foram empregados na tentativa de promover a remineralização da lesão artificial de cárie dentária incipiente/subsuperficial produzida em esmalte dentário humano. As tinturas de *Camellia sinensis* (pH 5,4) e de *Aloe arborescens* (pH 5,2) foram produzidas pelo Prof. Dr. Gokithi Akisue e sua equipe, na Faculdade de Farmácia de Pindamonhangaba (FAPI), de acordo com o método descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (ANEXO C). As tinturas foram constituídas de 50%

álcool etílico e 50% água, para que ambos os componentes solúveis em água e álcool fossem extraídos das folhas das plantas. As espécies das plantas utilizadas no preparo das tinturas foram identificadas e depositadas no Herbário da Universidade de São Paulo (USP), com números de exsicata G.AKISUE 050 (*A. arborescens*) e G.AKISUE 051 (*C. sinensis*) (Figura 8).

A saliva artificial (pH 7,0) foi preparada de acordo com o método descrito por Göhring et al. (2004), sendo constituída de 22,1 mmol/L de hidrogenocarbonato, 16,1 mmol/L de potássio, 14,5 mmol/L de sódio, 2,6 mmol/L de hidrogenofosfato, 0,8 mmol/L de ácido bórico, 0,7 mmol/L de cálcio, 0,2 mmol/L de tiocianato e 0,2 mmol/L de magnésio. A solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05% (pH 7,0) e a saliva artificial foram manipuladas no Laboratório de Dentística (ICT/UNESP).



Figura 8 - Imagem das exsicatas das plantas; a = *A. arborescens*; b = *C. sinensis*.

4.8 Realização dos tratamentos

Os tratamentos foram aplicados em três etapas, nas quais cinco espécimes por grupo foram tratados (APÊNDICE A, Quadro 5). A escolha pela realização dos tratamentos dessa maneira possibilitou que os espécimes fossem submetidos às mesmas condições de treinamento do operador em cada etapa.

Os cinco espécimes de cada grupo ficaram armazenados em recipientes iguais de vidro com tampa, onde permaneceram imersos em 80 mL de saliva artificial, em temperatura ambiente e agitação moderada e constante (40 rpm) (agitador VDRL TS-2000A, Biomixer, Los Angeles, CA, EUA). Em três períodos do dia (com 5 h de intervalo entre os tratamentos), a saliva artificial foi descartada e os espécimes ficaram imersos em 80 mL da solução a ser testada durante 60 s, em temperatura ambiente e agitação moderada e constante (40 rpm). Após, os espécimes foram armazenados novamente em saliva artificial, a temperatura ambiente e agitação moderada e constante (40 rpm). Entre as trocas da solução teste e saliva, os espécimes foram lavados em água deionizada e secos com papel absorvente. A cada período de teste, as soluções testadas também foram substituídas. O tratamento compreendeu um período de duração de 30 dias. Ao término desse período, os espécimes foram armazenados em água deionizada, a temperatura ambiente.

4.9 Mensuração da microdureza da superfície e em secção transversa, após os tratamentos

Ao término dos tratamentos (após 30 dias), a mensuração da microdureza *Knoop* foi realizada na região central da superfície de esmalte dos espécimes em microdurômetro FM-700 (Future-Tech, Tóquio, Japão), com carga de 10 g por 10 s. Foram efetuadas 3 impressões separadas entre si em 100 µm, situadas inferiormente às impressões realizadas após a formação da lesão de cárie, obtendo-se uma média dos valores (KHN_3 = média de microdureza da superfície após tratamentos) (APÊNDICE A, Quadros 6 a 11). Ao final, a porcentagem do volume de conteúdo mineral foi calculada, com as médias KHN_3 de cada grupo, utilizando-se a equação: $\text{vol\% mineral} = 4,3(\sqrt{KHN})+11,3$ (Argenta et al., 2003; Souchois et al., 2008) para se verificar o ganho mineral da superfície.

Para a medida da microdureza em secção transversa, os espécimes foram removidos de seus suportes de PVC e sua posição foi invertida em 90 graus, de maneira que ambas as faces (esmalte e dentina) estivessem em contato com o suporte de PVC para serem novamente fixados com cera pegajosa. Em seguida, os espécimes foram desgastados em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica SA, São Paulo, SP, Brasil) até aproximadamente sua metade, com papel abrasivo (Al_2O_3) de granulação 1200 (Erios, Equipamentos Técnicos e Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração a água, baixa velocidade e 2 pesos. Posteriormente, essa superfície foi polida, em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica SA,

São Paulo, SP, Brasil), com papéis abrasivos nas granulações 2400 e 4000 (Erios, Equipamentos Técnicos e Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) durante 2 min. cada, em baixa velocidade e 2 pesos, sob refrigeração a água.

Foram realizadas, em triplicata, 11 impressões a partir da superfície do esmalte, distando em 10 μm (0,010 mm) entre si (essa distância foi determinada em estudo piloto). As impressões foram produzidas no sentido da superfície do esmalte à junção amelo-dentinária (JAD), totalizando uma profundidade de 100 μm (0,1 mm) (Figura 9). Esse procedimento foi executado para verificar a profundidade da lesão cariosa. Após, foram calculadas as médias dos valores obtidos para cada profundidade (KHN_D ; D = depth/profundidade) (APÊNDICE B).

Da mesma maneira como na microdureza superficial, a porcentagem do volume de conteúdo mineral foi calculada para algumas profundidades, com as médias KHN_D de cada grupo, para se verificar a profundidade da lesão formada (GA) e os efeitos de cada tratamento (demais grupos). É importante lembrar que a profundidade da lesão de cárie é definida pela distância da superfície externa à posição em que o conteúdo mineral atinge 95% do volume mineral do esmalte hígido (Souchois et al., 2008). Neste estudo, a porcentagem do volume mineral do esmalte hígido foi calculada com a média da camada superficial de GH, que corresponderia a 100% do volume mineral, para efeito de comparação com os demais grupos.

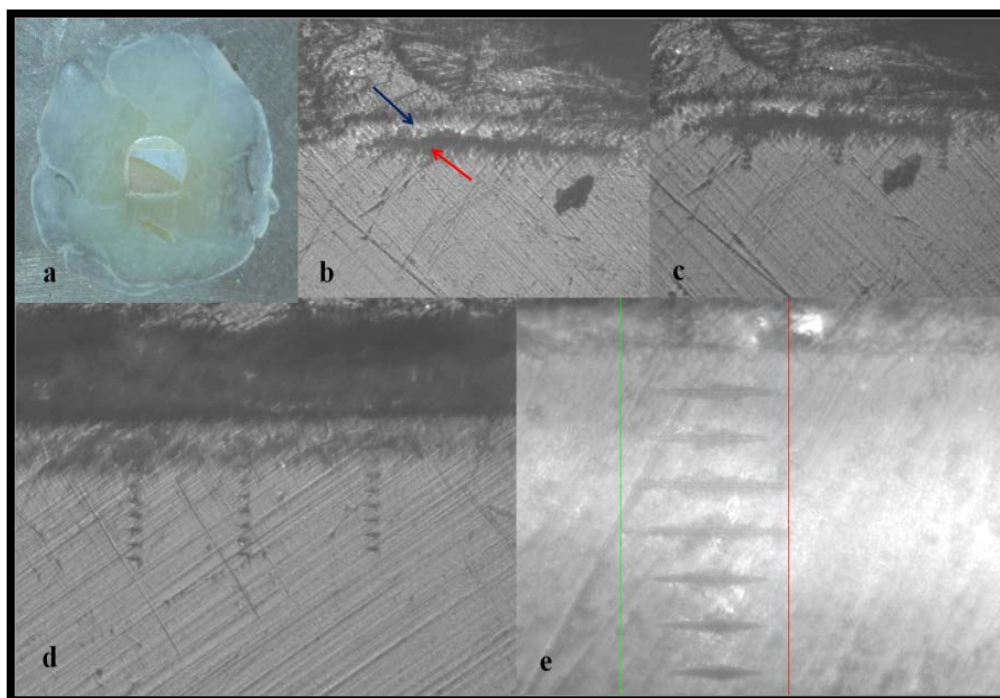


Figura 9 - Espécime preparado para a microdureza em secção transversa e indentações; a = espécime desgastado perpendicularmente à superfície; b = espécime visualizado ao microdurômetro (seta azul: zona superficial; seta vermelha: corpo da lesão); c/d = três colunas de indentações; e = coluna de indentações (1ª indentação menor que as demais).

4.10 Espectroscopia por dispersão de energia de raios-x

A análise pela espectroscopia por dispersão de energia de raios-x (EDS) foi executada no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento Materiais Odontológicos e Prótese (ICT-UNESP). Um espécime representativo de cada grupo foi desidratado pela imersão em soluções de concentrações crescentes de alcoóis: a 70% por 15 min., 80% por 15 min., 90% por 15 min. e 100% por 30 min. e secos em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 h. Posteriormente, os espécimes foram posicionados em um *stub*, sob fita de alumínio (3M

Adhesives, Ltd., EUA) e submetidos a vácuo em um metalizador (Fisions Instruments, EUA). Após, o *stub* foi colocado em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Inspect S50 (FEI) e submetido novamente a vácuo. Com a fotomicrografia do espécime disposta no monitor acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, dois *windows* de 1 mm x 1 mm foram selecionados (próximo à superfície e à JAD). A análise por área permitiu analisar a composição química de vários pontos, tornando os resultados mais precisos (Paradella, 2008).

Após a seleção da área, um feixe de elétrons de 20 keV e 20 kV de voltagem de aceleração atingiu o *window* e o *software* Isis Suíte Revision 3.35 calculou a energia liberada pelo elemento químico (resultados em keV) e a porcentagem relativa do respectivo elemento químico (Paradella, 2008). Assim, a análise por EDS forneceu o padrão químico de cálcio (Ca) e fósforo (P) de todos os grupos estudados sendo possível observar a variação na concentração de cálcio e fósforo e a razão Ca/P de cada espécime. O controle de cada espécime foi sua região mais profunda do esmalte, próxima à JAD, não atingida pela lesão de cárie artificial.

4.11 Análise em microscopia de luz polarizada

A análise em microscopia de luz polarizada (MLP) foi realizada em um espécime representativo de cada grupo, de forma

ilustrativa. Os espécimes selecionados foram visualizados em microscópio óptico (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha) no Laboratório de Patologia (ICT-UNESP). Foram avaliados: um espécime hígido, um com lesão de cárie artificial e em um de cada grupo estudado (GH: 9; GS: 13; GA: 23; GF: 11; GC: 8; GB: 7). O objetivo dessa avaliação foi exibir as alterações histológicas promovidas no esmalte dentário, a fim de confirmar a presença de lesão artificial de cárie subsuperficial, tais como as quatro zonas histológicas distintas: zona superficial, corpo da lesão, zona escura e zona translúcida (Wefel, Harless, 1984).

O microscópio utilizado possui dois filtros: polarizador e analisador. Eles se posicionam entre a fonte de luz e o condensador (filtro polarizador) e entre as lentes objetiva e a ocular (filtro analisador). Os filtros polarizadores promovem a seleção de apenas um plano de direção de vibração de ondas luminosas, conhecido por plano da luz polarizada. Sob seu efeito, os componentes macromoleculares birrefringentes (anisotrópicos) apresentam brilho colorido ou não, promovendo um realce desses materiais em detrimento a outros não birrefringentes (isotrópicos), que se distinguem em fundo escuro (Marchi, Castro, 2005).

Previamente à visualização no microscópio, os espécimes foram desgastados em politriz circular (DP-10, Panambra Industrial e Técnica SA, São Paulo, SP, Brasil), com papel abrasivo de granulação 1200 (Erios, Equipamentos Técnicos e Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e refrigeração a água, obtendo-se a espessura de aproximadamente 200 μm (verificada por meio de paquímetro digital).

Para atingir a espessura de 100 μm , adequada para que houvesse a passagem de luz através do espécime e fosse obtida uma imagem apropriada, um desgaste adicional foi executado manualmente, com papel abrasivo de mesma granulação, em água. Finalizado o desgaste, os espécimes foram lavados em água deionizada. Em seguida, foram posicionados sobre uma lâmina de vidro para microscopia, a qual foi acoplada à mesa do microscópio (Figura 10). Os espécimes foram imersos em água deionizada para a visualização das imagens.



Figura 10 – Espécime preparado para visualização em MLP.

4.12 Análise em microscopia eletrônica de varredura

Após a realização do EDS, os espécimes 3 (GH), 1 (GS), 16 (GA), 4 (GF), 5 (GC) e 6 (GB) foram metalizados com liga áurica, depositada por evaporação de auto vácuo e analisados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Inspect S50 (FEI), no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento Materiais Odontológicos e Prótese (ICT-UNESP). O objetivo dessa análise foi observar as alterações microscópicas (topográficas) da superfície do

esmalte (seccionado longitudinalmente) de um espécime de cada grupo, tratando-se de uma análise qualitativa.

4.13 Delineamento estatístico

Esta pesquisa experimental teve como objetivo avaliar o efeito de tratamentos na remineralização de lesão de cárie subsuperficial desenvolvida artificialmente em esmalte dentário humano, por meio da microdureza *Knoop* efetuada tanto na superfície dos espécimes quanto em profundidade. As análises estatísticas aplicadas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism[®] Inc. versão 6.01 (San Diego, CA, EUA).

4.13.1 Microdureza superficial

Todos os grupos foram comparados entre si após a aplicação dos tratamentos (KHN_3). Para essa finalidade, foram aplicadas as análises de variância (ANOVA) e de Tukey comparações múltiplas. Estas, ainda foram aplicadas removendo-se GH das comparações. Ademais, todos os grupos foram comparados fixando-se um controle como referência, por meio do teste de Dunnett comparações múltiplas. Para isso, os grupos GS a GB foram

comparados fixando-se GH; após, GH foi retirado das comparações e os grupos GA a GB foram comparados fixando-se GS (controle positivo) e, por fim, ainda na ausência de GH, os grupos GS, GF, GC e GB foram comparados fixando-se GA (controle negativo).

As médias obtidas após a formação da lesão cariiosa (KHN_2) foram comparadas às obtidas após os tratamentos (KHN_3), em cada grupo individualmente por meio do teste t pareado. Para GH, foram comparados KHN_1 (esmalte hígido) e KHN_3 . Todas as análises aplicadas apresentaram nível de confiança de 95%.

4.13.2 Microdureza em secção transversa

As médias dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) de todos os grupos foram comparadas, avaliando-se cada profundidade separadamente, por meio das análises de variância e de Tukey comparações múltiplas. Esta última também foi aplicada removendo-se GH das comparações. O teste de Dunnett comparações múltiplas foi aplicado para todos os grupos, em cada profundidade, do mesmo modo como descrito para a microdureza superficial: ora fixando-se GH, ora fixando-se GS ou GA ao ser removido GH das comparações. Todas as análises aplicadas apresentaram nível de confiança de 95%.

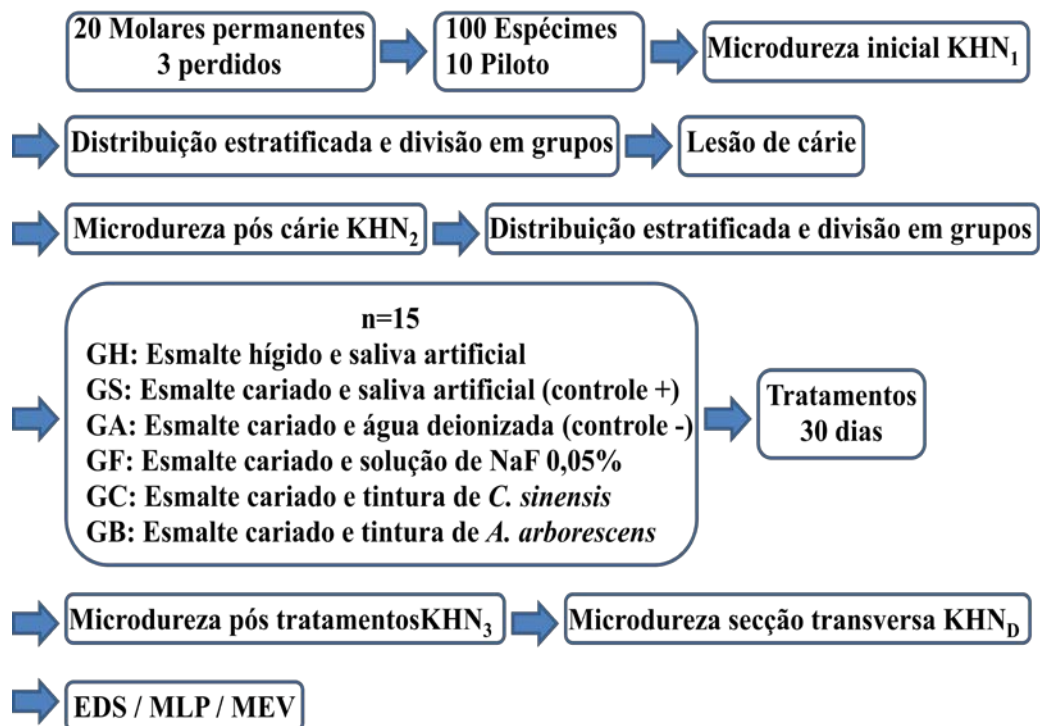


Figura 11 – Fluxograma da metodologia.

5 RESULTADO

Foram coletados 20 dentes molares humanos permanentes, irrompidos, apresentando coroas hígidias e indicados para extração devido a problemas periodontais, dos quais uma parcela foi danificada devido ao processo de esterilização (como descrito no item 4.2 de Material e Métodos). Dos dentes remanescentes, foram confeccionados 100 espécimes. Cada grupo foi composto por 15 amostras ($n = 15$), totalizando 90 espécimes, sendo o restante utilizado para a realização do estudo piloto. Todos os valores obtidos de microdureza *Knoop* (superficial e em secção transversa) estão descritos no item Apêndices (A e B).

5.1 Microdureza superficial

As médias finais (MF) e os respectivos desvios padrões (σ) dos valores de microdureza *Knoop* da superfície dos espécimes de GH a GB, quando hígidios (KHN_1), após a formação da lesão de cárie artificial (KHN_2) e após os tratamentos (KHN_3) encontram-se na tabela 1. Para GH, que não foi submetido à formação de lesão de cárie artificial, a tabela exhibe a média final e desvio padrão prévia (KHN_1) e

posteriormente ao tratamento (KHN₃). Os quatro espécimes de GA que sofreram erosão na superfície tiveram seus valores considerados como zero no cálculo da média. A média de todos os valores iniciais de microdureza superficial (KHN₁) foi de 362,17 KHN (257,10 a 488,49). Após a formação da lesão de cárie artificial (10 dias) (KHN₂), houve uma diminuição de 86,7% dessa média: 48,29 KHN (12,24 a 140).

Tabela 1- Médias finais e desvios padrões dos valores de microdureza superficial de todos os grupos quando hígidos, após a formação da lesão de cárie artificial e após a aplicação dos tratamentos

Grupos	MF KHN₁ ± σ	MF KHN₂ ± σ	MF KHN₃ ± σ
*GH	357,50 ± 5,78	-	317,12 ± 3,05
GS	360,67 ± 4,64	48,45 ± 0,26	44,40 ± 0,73
GA	366,04 ± 3,85	44,54 ± 6,52	22,62 ± 0,67
GF	363,55 ± 6,77	46,41 ± 5,06	73,04 ± 1,00
GC	360,57 ± 5,21	48,87 ± 3,23	60,04 ± 0,64
GB	366,28 ± 5,95	43,03 ± 1,55	71,33 ± 2,89

MF = média final; σ = desvio padrão; KHN₁ = microdureza *Knoop* superficial dos espécimes hígidos; KHN₂ = microdureza *Knoop* superficial após a lesão de cárie; KHN₃ = microdureza *Knoop* superficial após os tratamentos; GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*. Os espécimes de GA que sofreram erosão na superfície foram considerados como zero no cálculo da média. (*) Em GH, que não sofreu lesão de cárie estão apresentados os valores iniciais (KHN₁) e após o tratamento (KHN₃).

Após a realização das análises estatísticas para comparar os valores de microdureza superficial de GH a GB e GS a GB, após os tratamentos (KHN₃), observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$, ANOVA).

Houve diferença significativa entre GH e os demais submetidos à lesão de cárie artificial ($p < 0,0001$) (ANOVA, Tukey e Dunnett comparações múltiplas). Os menores valores de microdureza ocorreram no controle negativo (GA). Embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos instituídos (GS x GA, $p = 0,3406$; GS x GF, $p = 0,0954$; GS x GC, $p = 0,6962$; GS x GB, $p = 0,1367$; GF x GC, $p = 0,8330$; GF x GB, $p > 0,9999$ e GC x GB, $p = 0,9006$), nenhum promoveu os altos valores de microdureza como os iniciais (KHN₁) (Tukey comparações múltiplas).

A análise de Dunnett comparações múltiplas também foi aplicada excluindo-se GH. Ao se fixar o controle positivo (GS), apenas não houve diferença significativa entre GS x GC ($p = 0,2177$). Ao se fixar o controle negativo (GA), houve diferença significativa entre todos os grupos (GA x GS, $p = 0,0464$; GA x GF, $p < 0,0001$; GA x GC, $p = 0,0002$ e GA x GB, $p < 0,0001$).

Pelo teste t pareado, utilizado para comparar os valores pós-cárie x pós-tratamento (KHN₂ x KHN₃) de cada grupo individualmente (sendo para GH: KHN₁ x KHN₃), houve diferença estatisticamente significativa nos grupos GF ($p = 0,0313$) e GB ($p = 0,003$).

A figura 12 ilustra as médias finais e desvios padrões (σ) da microdureza superficial realizada após os tratamentos (KHN₃) de GH a GB. A presença de pelo menos uma letra igual em cada barra significa ausência de diferença estatisticamente significativa (Tukey comparações múltiplas de GH a GB).

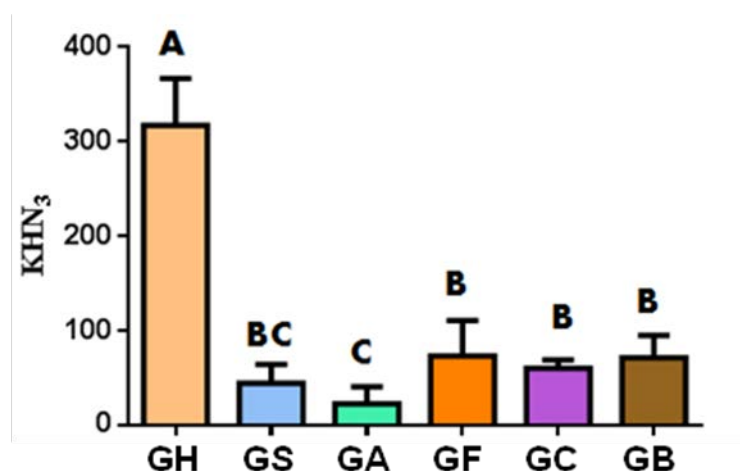


Figura 12 - Médias finais e σ dos valores de microdureza superficial após os tratamentos (KHN_3) de GH a GB. GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

A tabela 2 exibe os valores de porcentagem do volume de conteúdo mineral da superfície dos espécimes de GH a GB, os quais foram calculados com as médias de KHN_3 (presentes na tabela 1) utilizando-se a equação: $\text{vol\% mineral} = 4,3(\sqrt{\text{KHN}})+11,3$ (Argenta et al., 2003; Souchois et al., 2008). O grupo GH, por apresentar-se hígido, foi considerado 100% para efeito de comparação com os demais grupos. Dos tratamentos instituídos, nenhum proporcionou o mesmo volume de conteúdo mineral que em GH. Entretanto, comparando os demais grupos ao GA, que apresentou o menor volume de conteúdo mineral, todos os outros apresentaram aumento de conteúdo mineral.

Tabela 2 - Valores de porcentagem do volume de conteúdo mineral (vol % mineral) da superfície de GH a GB

Grupo	Vol % mineral	Porcentagens
GH	87,84	100%
GS	39,93	45,45%
GA	31,72	36,11%
GF	48,04	54,69%
GC	44,61	50,78%
GB	47,61	54,20%

Para GH, a porcentagem do volume de conteúdo mineral foi considerado 100% para efeito de comparação com os demais grupos (porcentagens).

5.2 Microdureza em secção transversa

As médias finais e respectivos desvios padrões (σ) dos valores de microdureza *Knoop* em secção transversa (KHN_D) de todos os grupos, nas diferentes profundidades (a partir da superfície até 100 μm), encontram-se na tabela 3. Todos os valores estão descritos no item Apêndice B.

A figura 13 ilustra as médias finais e desvios padrões da microdureza em secção transversa (KHN_D) realizada na superfície de GH a GB (Tukey comparações múltiplas). A presença de pelo menos uma letra igual em cada barra representa ausência de diferença estatisticamente significativa.

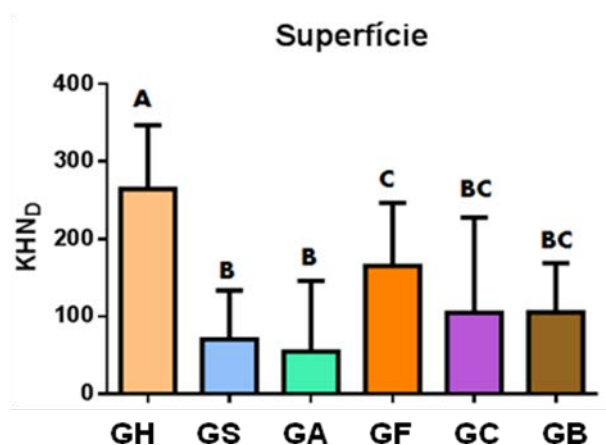


Figura 13 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) da superfície (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significante.

A partir dos dados obtidos na superfície, observou-se diferença significativa entre GH e os demais grupos submetidos à lesão de cárie artificial ($p < 0,0001$, ANOVA; Tukey e Dunnett comparações múltiplas). Esse comportamento foi mantido até a profundidade de 30 μm . O grupo GF destacou-se de GS ($p = 0,0410$) e GA ($p = 0,0094$), porém não apresentou diferença estatística de GC ($p = 0,4005$) e GB ($p = 0,4143$). Os grupos GS e GA apresentaram as menores médias, sem diferença significativa entre si ($p = 0,9957$) (Tukey comparações múltiplas).

Tabela 3 - Médias finais e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa de GH a GB (após os tratamentos)

(µm) Profundidade	MF KHN _D ± σ		
	GH	GS	GA
Superfície	264,37 ± 82,40	70,51 ± 62,92	54,38 ± 91,53
10	337,65 ± 80,73	38,64 ± 34,93	21,27 ± 23,54
20	348,61 ± 70,97	87,40 ± 97,10	70,40 ± 77,40
30	353,15 ± 64,64	149,15 ± 106,07	106,58 ± 114,03
40	346,66 ± 72,51	203,61 ± 95,08	137,49 ± 114,62
50	352,65 ± 69,65	256,97 ± 62,09	175,63 ± 125,68
60	369,60 ± 71,58	293,21 ± 72,80	205,09 ± 140,11
70	365,58 ± 78,57	310,16 ± 83,57	221,41 ± 144,19
80	362,22 ± 73,25	327,13 ± 71,59	224,66 ± 143,56
90	378,43 ± 65,40	336,26 ± 82,84	231,83 ± 147,98
100	384,66 ± 72,71	345,40 ± 75,90	246,13 ± 154,89
Profundidade	GF	GC	GB
Superfície	165,13 ± 81,48	104,56 ± 123,27	105,29 ± 63,64
10	95,98 ± 59,25	57,73 ± 88,78	66,77 ± 47,49
20	121,77 ± 69,21	99,08 ± 127,31	98,32 ± 82,62
30	184,82 ± 85,70	166,07 ± 127,55	129,88 ± 96,60
40	258,43 ± 100,84	219,02 ± 113,23	165,24 ± 100,55
50	311,27 ± 113,14	243,39 ± 86,08	213,86 ± 89,82
60	334,73 ± 106,01	262,45 ± 80,22	240,59 ± 68,74
70	356,92 ± 101,75	292,01 ± 56,73	258,57 ± 61,81
80	368,15 ± 98,27	301,43 ± 55,93	282,73 ± 61,68
90	385,15 ± 85,38	324,56 ± 57,56	298,05 ± 58,05
100	399,25 ± 76,47	349,22 ± 55,31	316,96 ± 54,27

KHN_D = microdureza em secção transversa; σ = desvio padrão. GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão. Os espécimes de GA que sofreram erosão na superfície foram considerados como zero no cálculo da média.

Embora na profundidade de 10 µm o mesmo perfil apresentado pela superfície tenha sido mantido ($p < 0,0001$, ANOVA; Tukey e Dunnet comparações múltiplas), houve diminuição das

médias de microdureza nos grupos submetidos à lesão cariada, em comparação à profundidade anterior. Este fato decorre, provavelmente, por tratar-se da região do corpo da lesão, onde a dureza é naturalmente menor que a da zona superficial. A figura 14 ilustra as médias finais e desvios padrões de GH a GB na profundidade de 10 μm . A presença de pelo menos uma letra igual em cada barra representa ausência de diferença estatística.

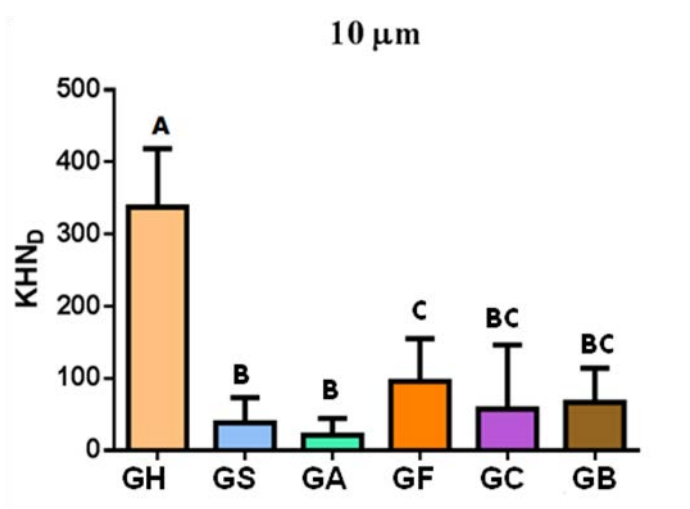


Figura 14 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) da profundidade de 10 μm (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

Nas profundidades de 20 e 30 μm houve diferença estatisticamente significativa apenas entre GH e os demais grupos ($p < 0,0001$, ANOVA; Tukey e Dunnett comparações múltiplas). A partir de 20 μm , as médias de microdureza começaram a aumentar em todos os grupos, quando comparadas às da profundidade de 10 μm . A figura

15 ilustra as médias finais e desvios padrões de GH a GB nas profundidades de 20 e 30 μm .

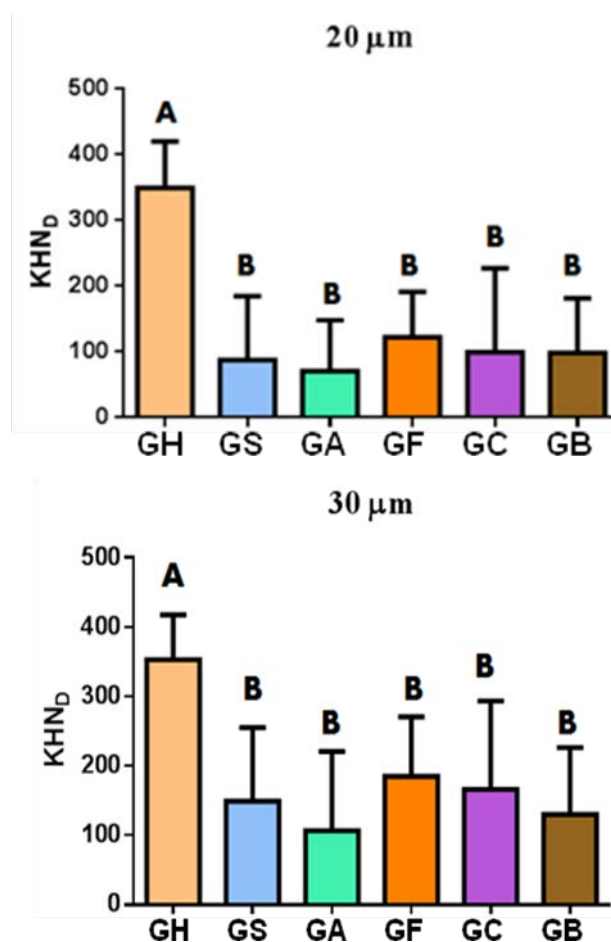


Figura 15 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) das profundidades de 20 e 30 μm (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

A partir das profundidades de 40 e 50 μm , GF não diferiu estatisticamente de GH, GS, GC e GB (Tukey e Dunnett

comparações múltiplas). A figura 16 ilustra as médias finais e desvios padrões de GH a GB em 40 e 50 μm .

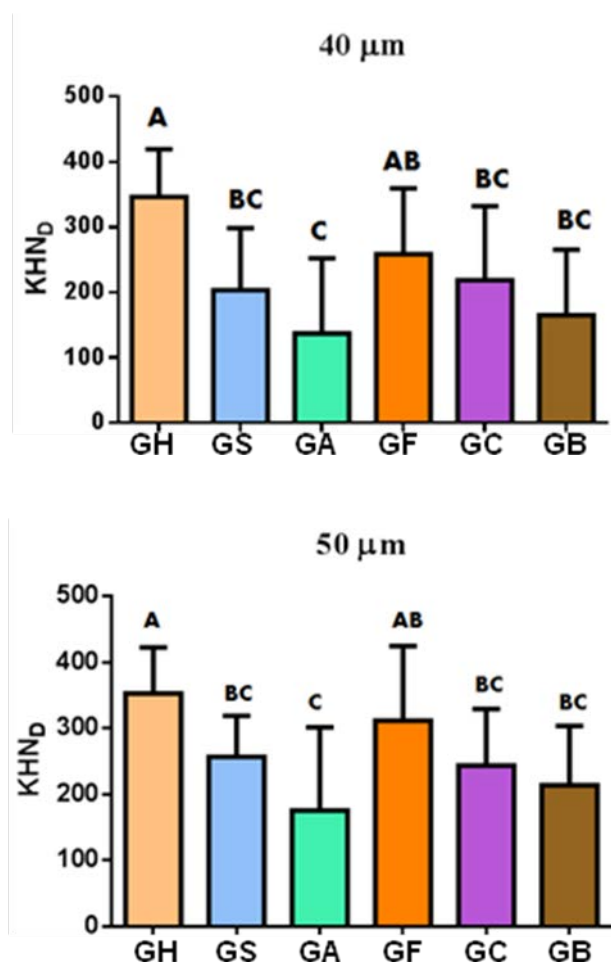


Figura 16 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) das profundidades de 40 e 50 μm (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

Na Profundidade de 60 μm , GS não diferiu estatisticamente de GH, GF, GC, GB e GA (Tukey e Dunnett comparações múltiplas). A figura 17 ilustra as médias finais e desvios padrões de GH a GB em 60 μm .

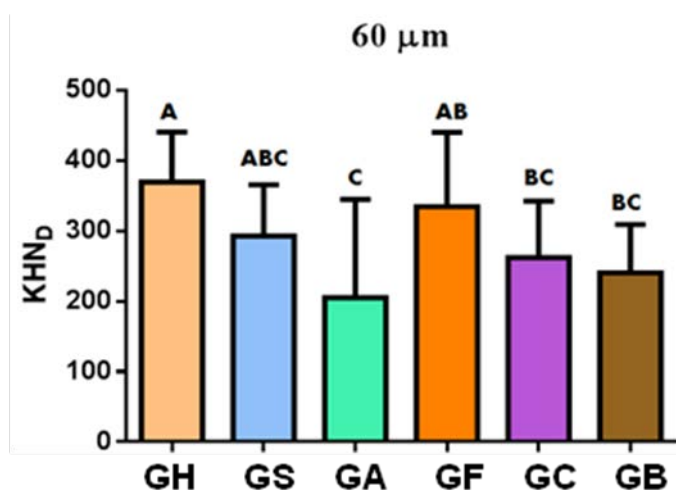


Figura 17 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) da profundidade de 60 μm (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

Na profundidade de 70 μm , GS, GF e GC não diferiram estatisticamente de GH e GB (Tukey e Dunnett comparações múltiplas). A figura 18 ilustra as médias finais e desvios padrões de microdureza em 70 μm .

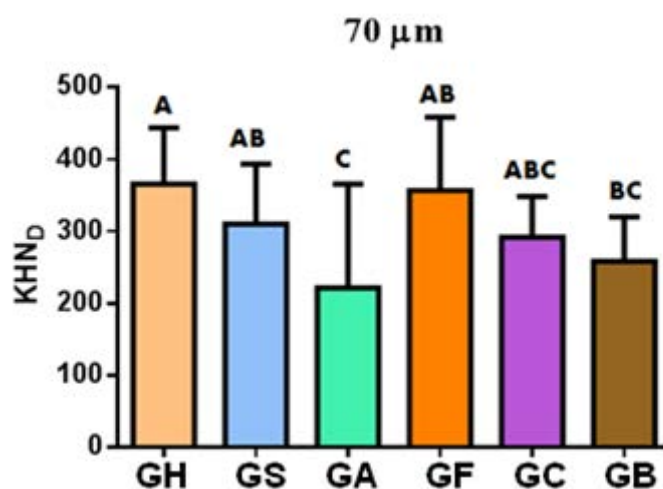


Figura 18 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) da profundidade de 70 μm (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

Nas profundidades de 80 e 90 μm, GS, GF, GC e GB não diferiram estatisticamente de GH (Tukey e Dunnett comparações múltiplas). A figura 19 ilustra as médias finais e desvios padrões de GH a GB em 80 e 90 μm.

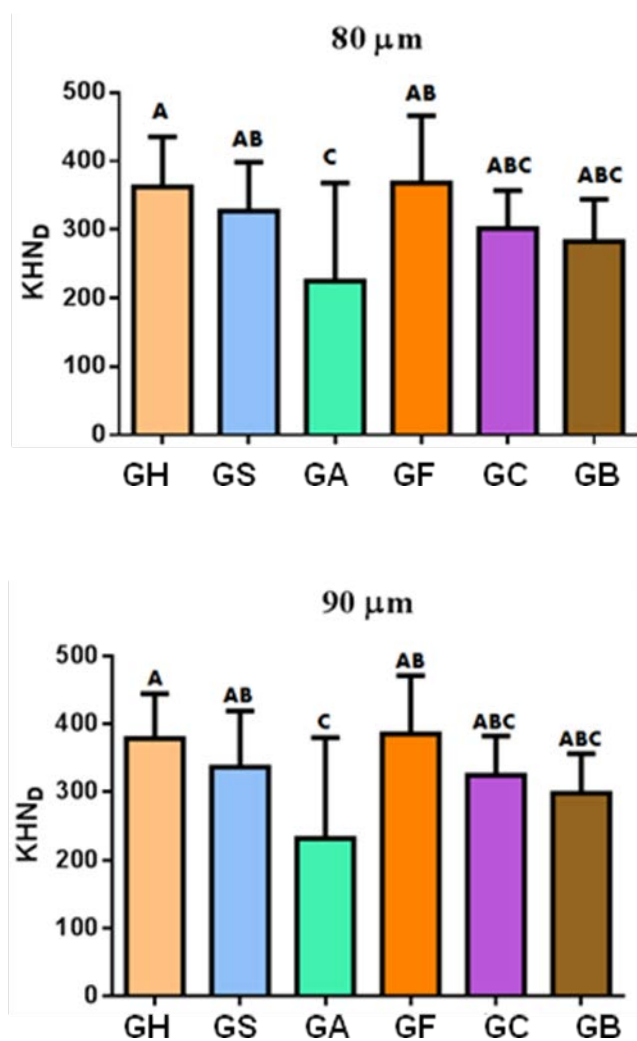


Figura 19 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) das profundidades de 80 e 90 μm (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

Por fim, na profundidade de 100 μm, o único grupo que diferiu significativamente de GH foi GA, que apresentou a menor média em todas as profundidades ($p < 0,0001$, ANOVA; Tukey e

Dunnett comparações múltiplas). A figura 20 ilustra as médias finais e desvios padrões de GH a GB em 100 μm .

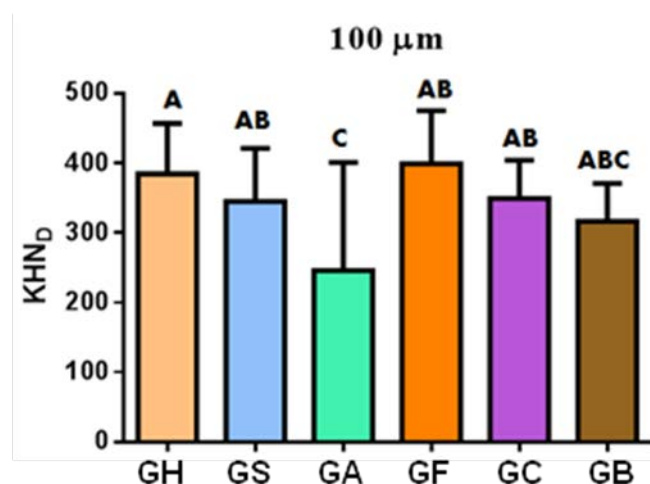


Figura 20 - Médias e desvios padrões dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) da profundidade de 100 μm (GH a GB). GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; σ = desvio padrão; a presença de pelo menos uma letra igual = sem diferença estatisticamente significativa.

Os valores de porcentagem do volume de conteúdo mineral (vol % mineral), de algumas profundidades de GH a GB: da superfície à profundidade em que essa porcentagem atingiu 95% da revelada no esmalte hígido (representado pela superfície de GH), foram calculados para se verificar o ganho mineral proporcionado por cada tratamento, além da profundidade da lesão cariada (Profundidade da lesão = distância da superfície à posição de conteúdo mineral que corresponde a 95% do volume mineral do esmalte hígido). As médias KHN_D (presentes na tabela 3) foram aplicadas na equação: vol%

mineral = $4,3(\sqrt{\text{KHN}})+11,3$ (Argenta et al., 2003; Souchois et al., 2008).

A superfície de GH foi considerada a superfície de um esmalte hígido (100%) para efeito de comparação com os demais grupos cariados. Na tabela 4, em cada coluna, à esquerda do hífen, encontram-se os valores de porcentagem do volume de conteúdo mineral, enquanto que à direita, encontram-se as porcentagens calculadas com base em GH (100%). No grupo GA, a porcentagem do volume de conteúdo mineral atingiu 95% da encontrada no esmalte hígido (representado pela superfície de GH) na profundidade de 100 μm . Dessa forma, pode-se deduzir que a lesão cariada desenvolvida neste estudo apresenta uma profundidade de 100 μm . Nos demais grupos, as profundidades das lesões foram: GF = 40 μm ; GS = 50 μm ; GC = 50 μm e GB = 60 μm . Esses valores evidenciam o ganho mineral proporcionado pelos tratamentos.

Tabela 4 - Valores de porcentagem do volume de conteúdo mineral (vol % mineral) das profundidades de GH a GB

Prof.	Vol % mineral – porcentagem referente ao esmalte hígido					
	GH	GS	GA	GF	GC	GB
Sup.	81,21 – 100	47,40 – 58,37	43,00 – 52,96	66,55 – 81,95	55,26 – 68,05	55,42 – 68,24
10	-	38,02 – 46,82	31,13 – 38,33	53,42 – 65,78	43,97 – 54,14	46,43 – 57,18
20	-	51,49 – 63,40	47,37 – 58,34	58,75 – 72,34	54,10 – 66,61	53,93 – 66,41
30	-	63,81 – 78,54	55,69 – 68,57	69,75 – 85,89	66,71 – 82,14	60,30 – 74,25
40	-	72,65 – 89,45	61,72 – 76,00	80,42 – 99,03	74,93 – 92,27	66,57 – 81,97
50	-	80,23 – 98,79	68,28 – 84,80	-	78,38 – 96,52	74,18 – 91,34
60	-	-	72,88 – 89,74	-	-	77,99 – 96,04
70	-	-	75,28 – 92,70	-	-	-
80	-	-	75,75 – 93,27	-	-	-
90	-	-	76,77 – 94,53	-	-	-
100	-	-	78,76 – 96,98	-	-	-

Para GH, a porcentagem do volume de conteúdo mineral da superfície foi considerada 100% para efeito de comparação com os demais grupos. Prof. = profundidade em μm ; Sup. = superfície; (-) ausência de cálculo. Em cada coluna, à esquerda do hífen encontram-se os valores de porcentagem do volume de conteúdo mineral, enquanto que à direita, encontram-se as porcentagens calculadas com base em GH. GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*.

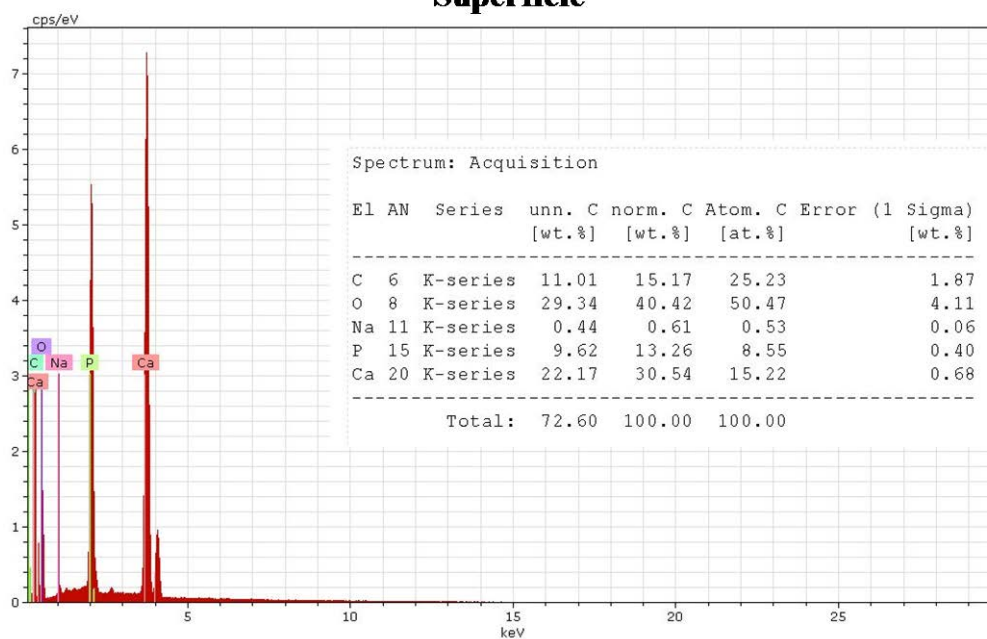
5.3 Espectroscopia por dispersão de energia de raios-x

Para a realização desta etapa, os espécimes de número 3 (GH), 1(GS), 16(GA), 4(GF), 5(GC) e 6(GB) foram selecionados aleatoriamente e preparados conforme descrito no item 4.10 de Material e Métodos. Foram feitas duas leituras: na área da superfície do esmalte (para determinar a influência do tratamento) e na área da junção amelo-dentinária (JAD) (controle) do espécime seccionado longitudinalmente. Os espécimes foram submetidos ao EDS após a realização da microdureza em secção transversa.

A avaliação pelo EDS teve como objetivo mensurar a razão cálcio/fósforo (Ca/P) da superfície e JAD do espécime, após os tratamentos. A literatura relata que a razão Ca/P da hidroxiapatita é de 1,67 (ten Cate, Duijsters, 1982). Deve-se destacar que uma leitura confiável pelo EDS é realizada na existência de uma porcentagem superior a 5% de cada elemento químico. Dessa forma, a constatação do íon fluoreto, por este método, tornou-se inviável.

A seguir, estão apresentadas as figuras de picos referentes aos espécimes 3, 1, 16, 4, 5 e 6 (Figuras 21 a 26). Os picos indicam as porcentagens dos elementos químicos que estiveram presentes nos espécimes numa faixa superior a 5%. Elementos abaixo desse valor, não foram evidenciados pelo referido teste.

Superfície



JAD

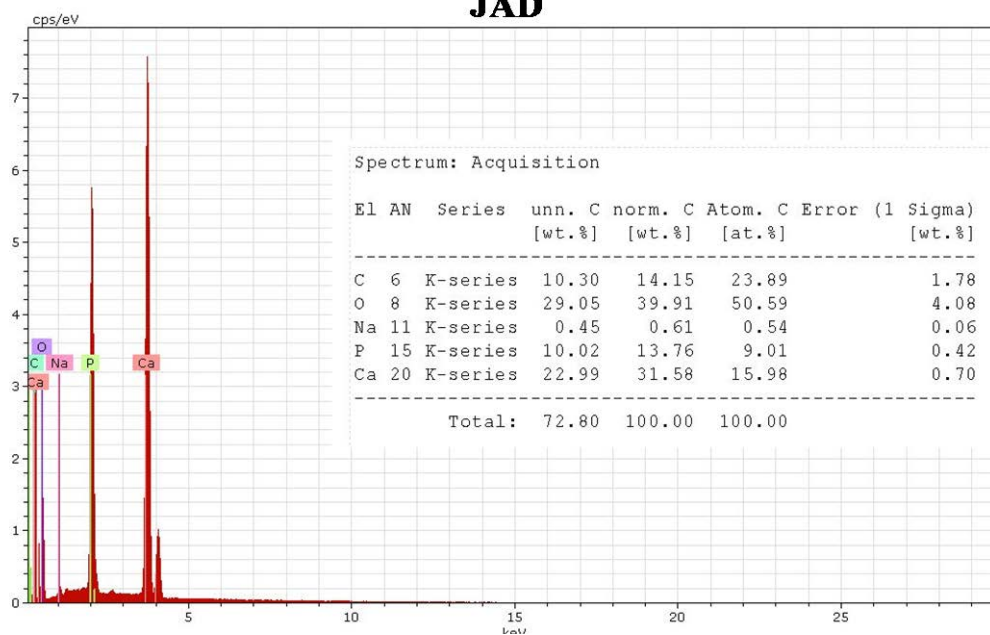
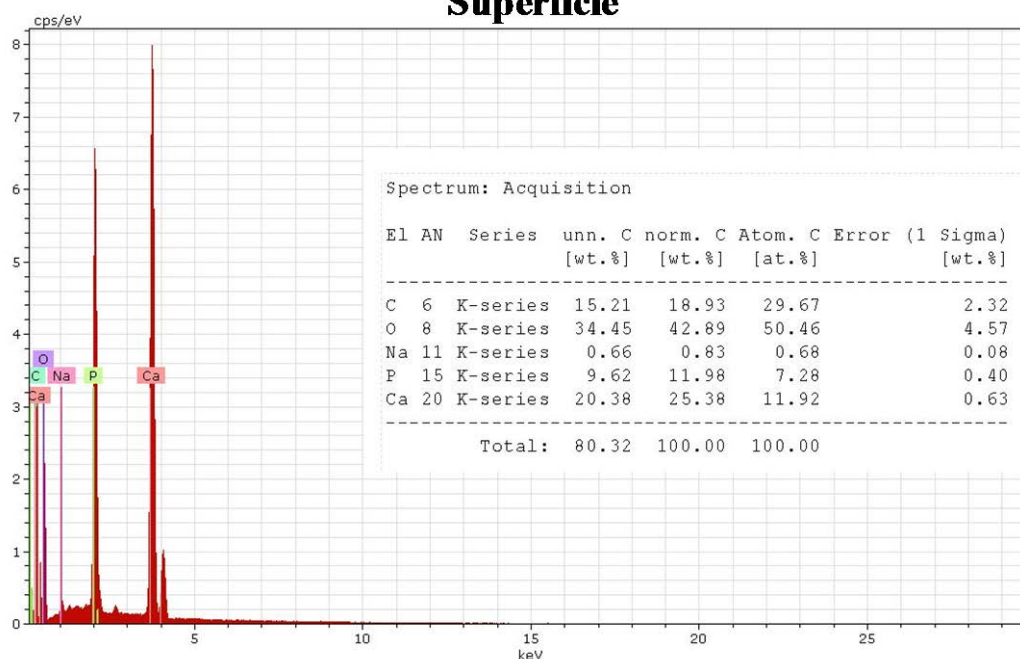


Figura 21 - EDS realizado na área da superfície de esmalte e na área da junção amelo-dentinária do espécime 3 (GH) seccionado longitudinalmente; at% = porcentagem atômica; wt% = porcentagem em peso; wt% (extremidade direita) = porcentagem de erro; cps = counts per second; JAD = junção amelo-dentinária.

Superfície



JAD

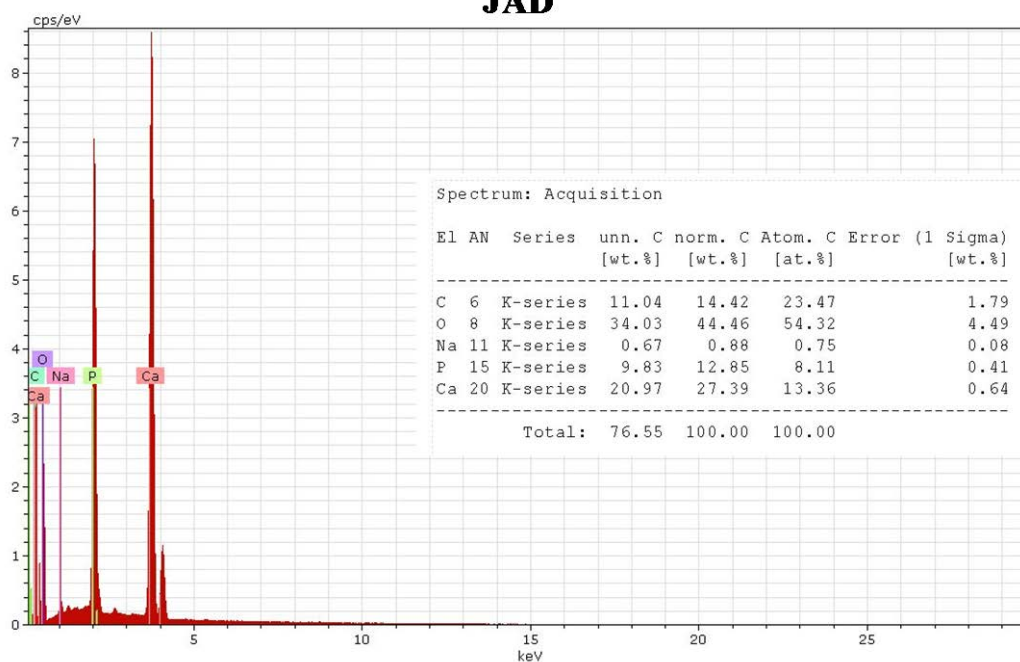
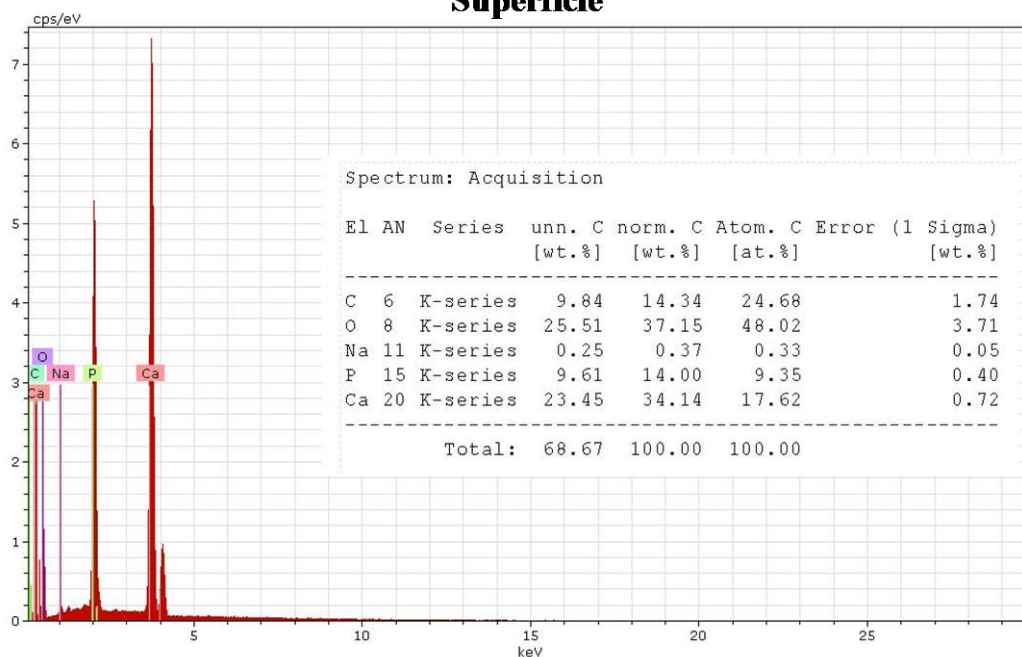


Figura 22 - EDS realizado na área da superfície de esmalte e na área da junção amelodentinária do espécime 1 (GS) seccionado longitudinalmente; at% = porcentagem atômica; wt% = porcentagem em peso; wt% (lado direito) = porcentagem de erro; cps = counts per second; JAD = junção amelo-dentinária.

Superfície



JAD

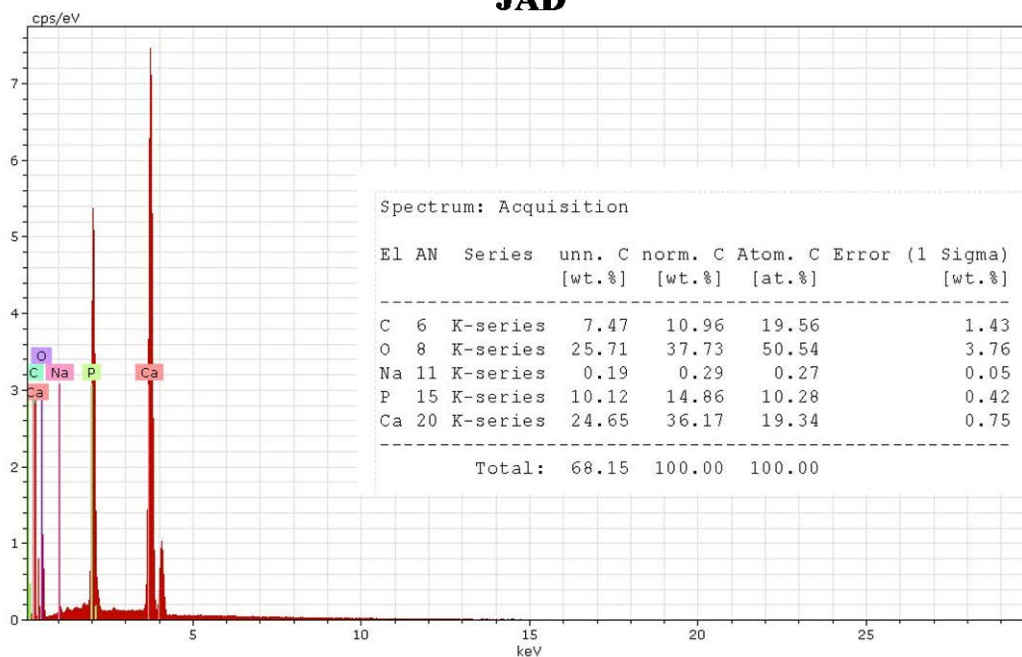


Figura 23 - EDS realizado na área da superfície de esmalte e na área da junção amelodentinária do espécime 16 (GA) seccionado longitudinalmente; at% = porcentagem atômica; wt% = porcentagem em peso; wt% (lado direito) = porcentagem de erro; cps = counts per second; JAD = junção amelo-dentinária.

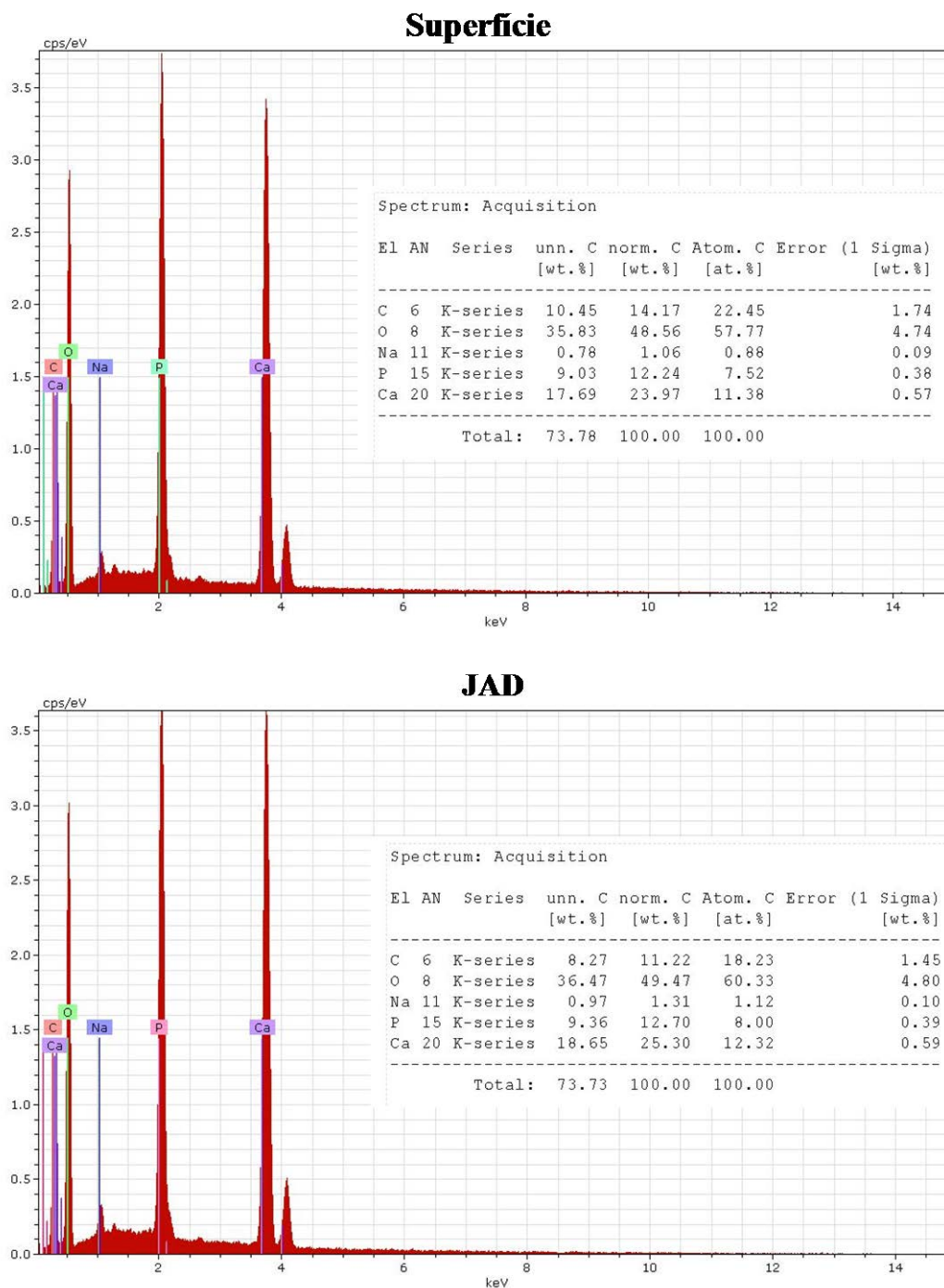
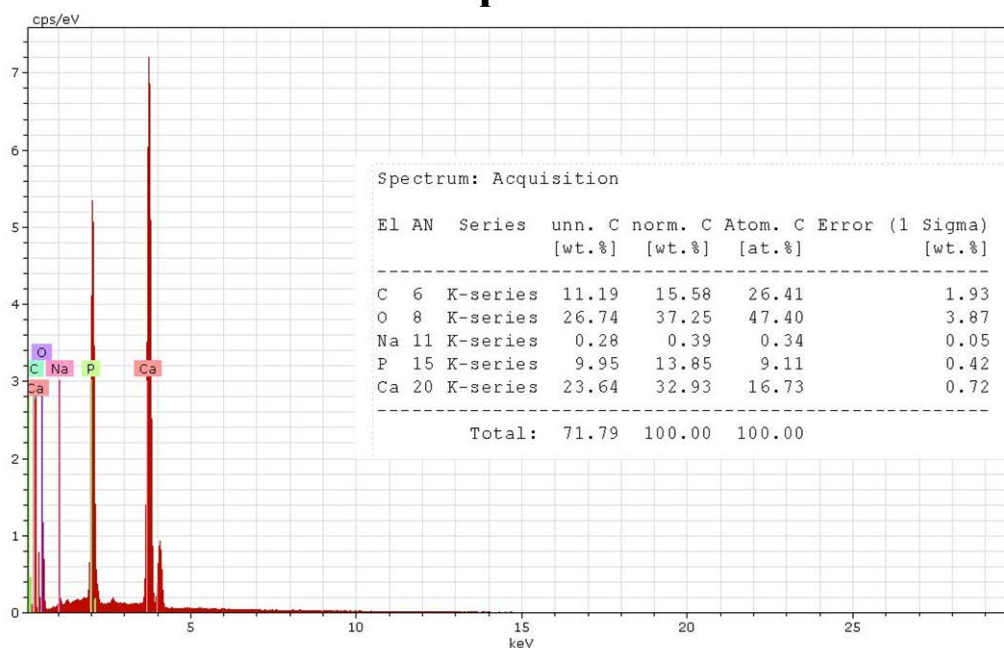


Figura 24 - EDS realizado na área da superfície de esmalte e na área da junção amelodentinária do espécime 4 (GF) seccionado longitudinalmente; at% = porcentagem atômica; wt% = porcentagem em peso; wt% (lado direito) = porcentagem de erro; cps = counts per second; JAD = junção amelo-dentinária.

Superfície



JAD

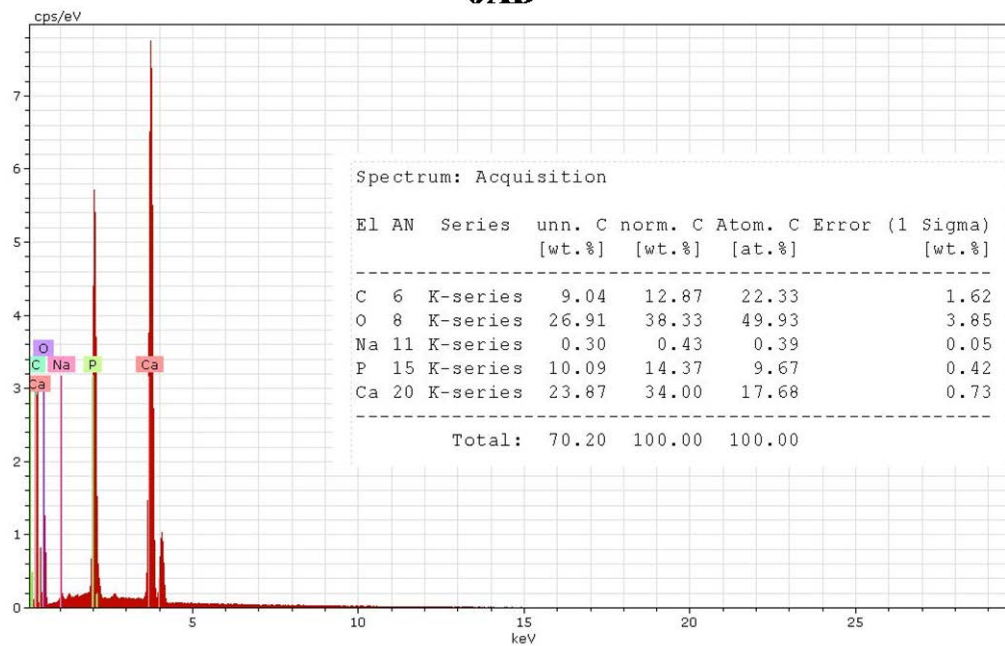


Figura 25 - EDS realizado na área da superfície de esmalte e na área da junção amelodentinária do espécime 5 (GC) seccionado longitudinalmente; at% = porcentagem atômica; wt% = porcentagem em peso; wt% (lado direito) = porcentagem de erro; cps = counts per second; JAD = junção amelo-dentinária.

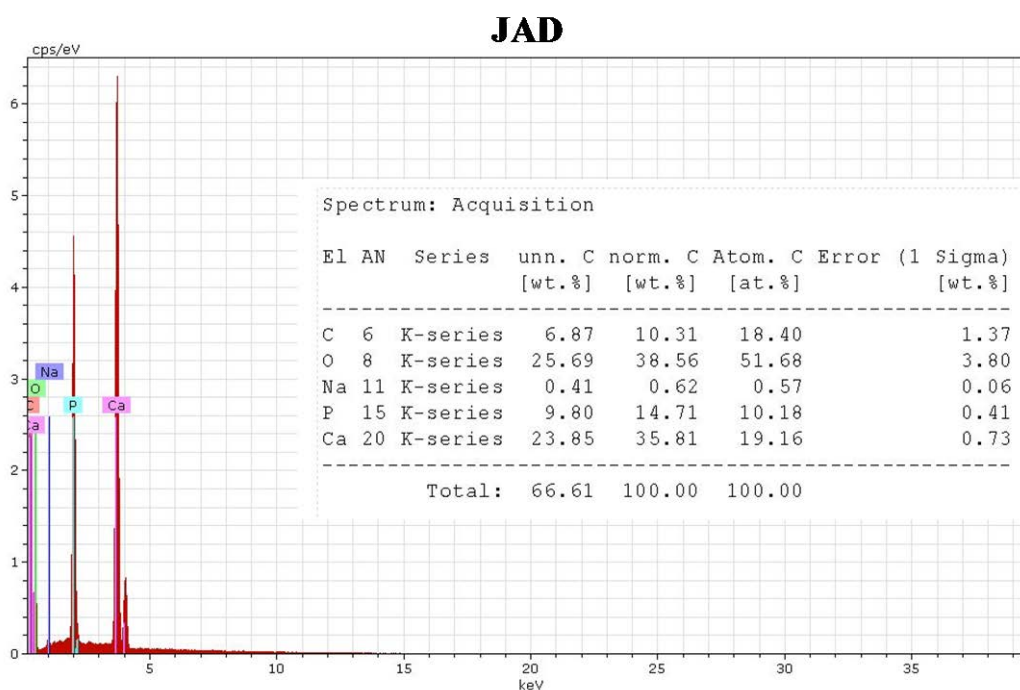
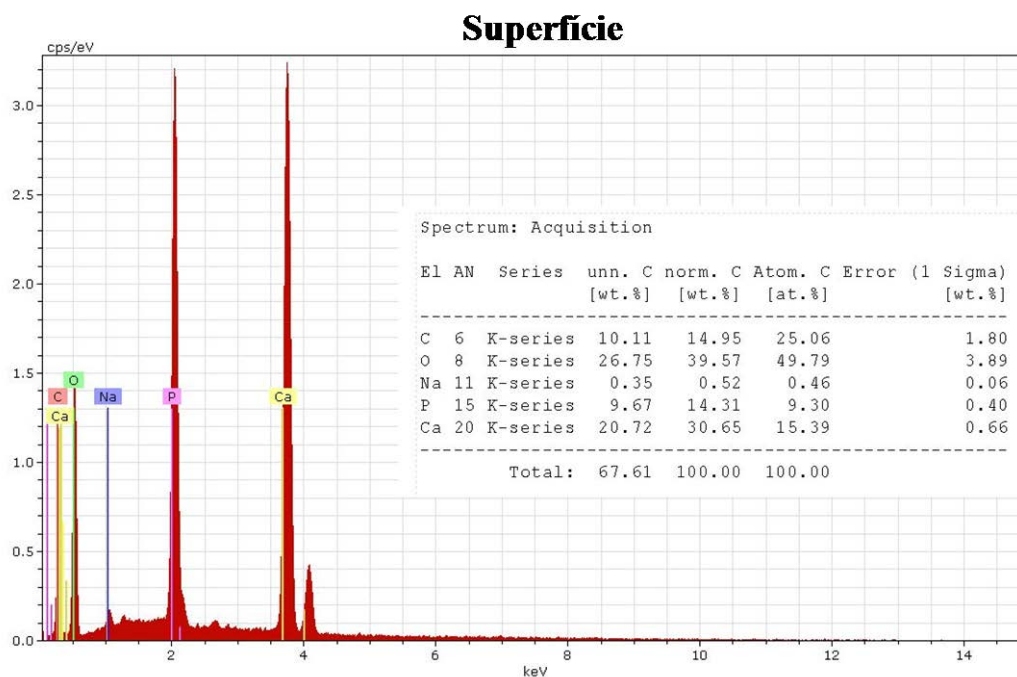


Figura 26 - EDS realizado na área da superfície de esmalte e na área da junção amelodentinária do espécime 6 (GB) seccionado longitudinalmente; at% = porcentagem atômica; wt% = porcentagem em peso; wt% (lado direito) = porcentagem de erro; cps = counts per second; JAD = junção amelo-dentinária.

Baseando-se nos dados numéricos presentes nas figuras 21 a 26, foi possível obter-se a razão Ca/P dos espécimes por meio da divisão entre a porcentagem em peso (wt%) de ambos os elementos químicos (Paradella, 2008). Todas as razões Ca/P obtidas estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5- Razão Ca/P presente nos espécimes de GH a GB, nas regiões da superfície do esmalte e na região da JAD

Espécime (grupo)	Superfície	JAD
3 (GH)	2,30	2,29
1 (GS)	2,11	2,13
16 (GA)	2,43	2,43
4 (GF)	1,96	1,99
5 (GC)	2,37	2,36
6 (GB)	2,14	2,43

JAD = junção amelo-dentinária. GH = esmalte hígido e saliva; GS = esmalte cariado e saliva; GA = esmalte cariado e água; GF = esmalte cariado e NaF 0,05%; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*.

5.4 Análise em microscopia de luz polarizada

As figuras 27 e 28 exibem as características de esmalte hígido e com lesão de cárie artificial respectivamente, analisados pela microscopia de luz polarizada (MLP). Os espécimes foram imersos em água deionizada e visualizados. Nos espécimes que foram submetidos à formação de lesão cariada, é possível visualizar duas das quatro zonas histológicas distintas presentes na lesão subsuperficial de cárie: a zona superficial e o corpo da lesão, características que

comprovam a formação de lesão artificial de cárie subsuperficial no esmalte dentário. As figuras de 29 a 34 apresentam a microscopia de um espécime de cada grupo estudado (GH a GB), sendo, portanto, uma análise qualitativa.

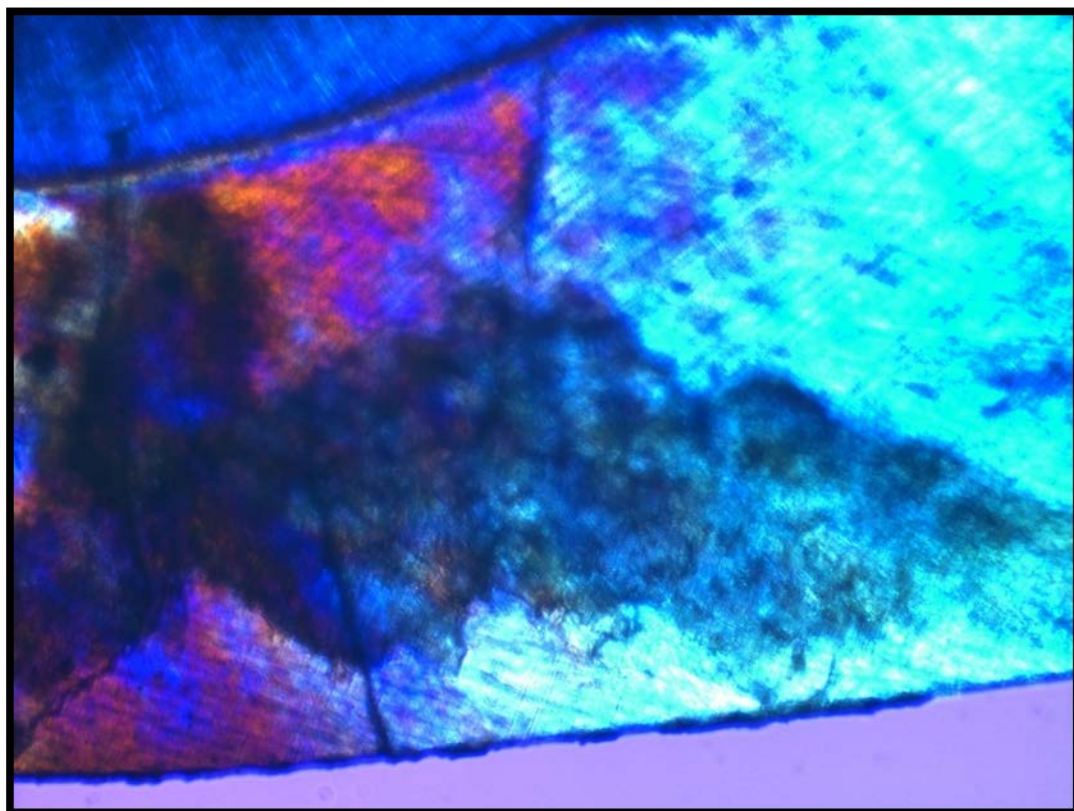


Figura 27 – Imagem ilustrativa de espécime de esmalte hígido visualizado pela microscopia de luz polarizada; aumento de 100 vezes.

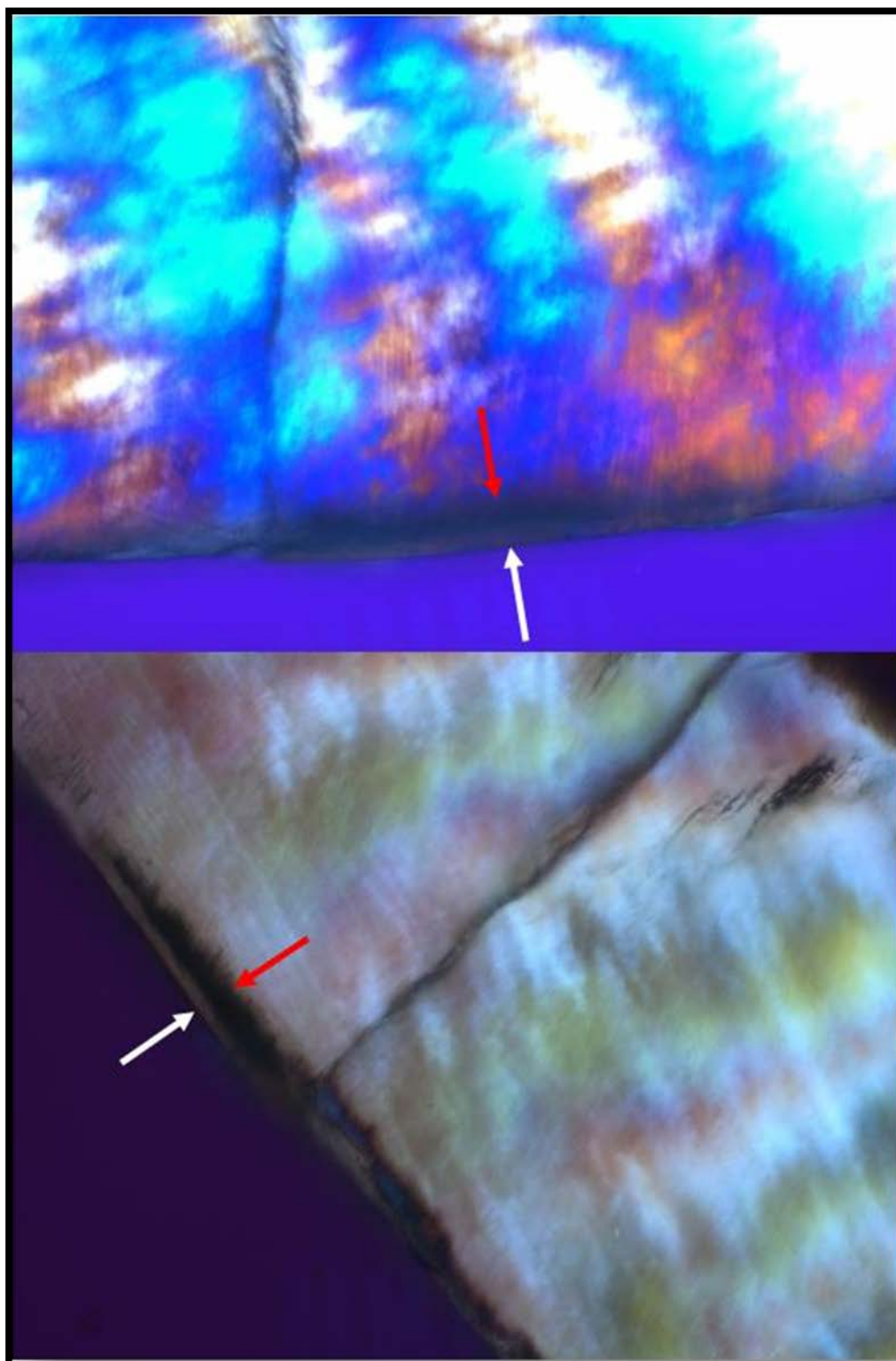


Figura 28 - Imagens ilustrativas de lesão de cárie artificial dentária em esmalte indicando a zona superficial e o corpo da lesão, visualizados pela microscopia de luz polarizada. Seta branca = zona superficial; seta vermelha = corpo da lesão; aumento de 200 vezes.

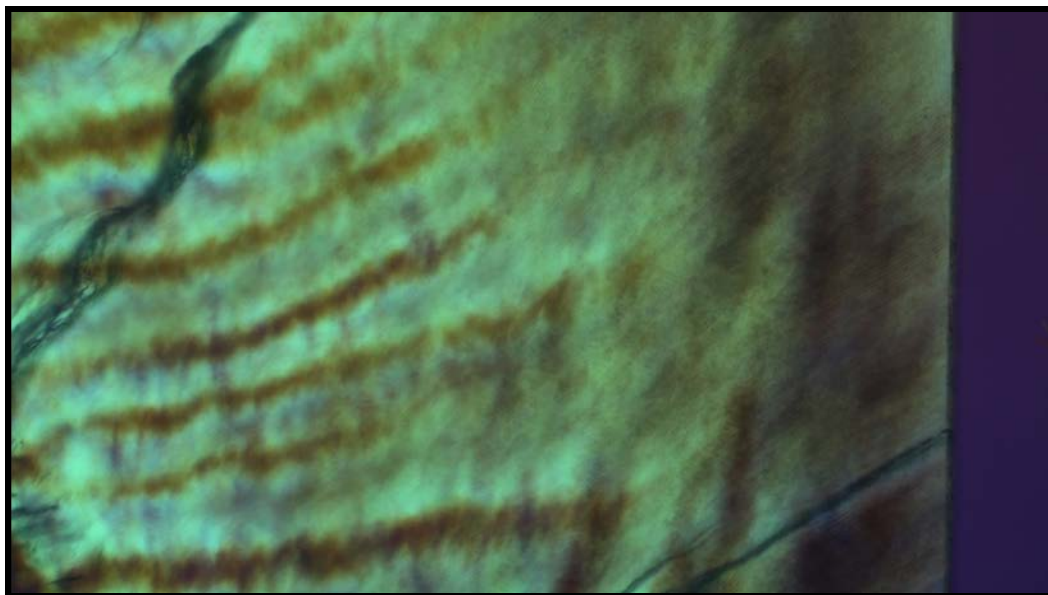


Figura 29 - Imagem ilustrativa do espécime 9 (GH), visualizado pela microscopia de luz polarizada. GH = esmalte hígido e saliva artificial; aumento de 100 vezes.

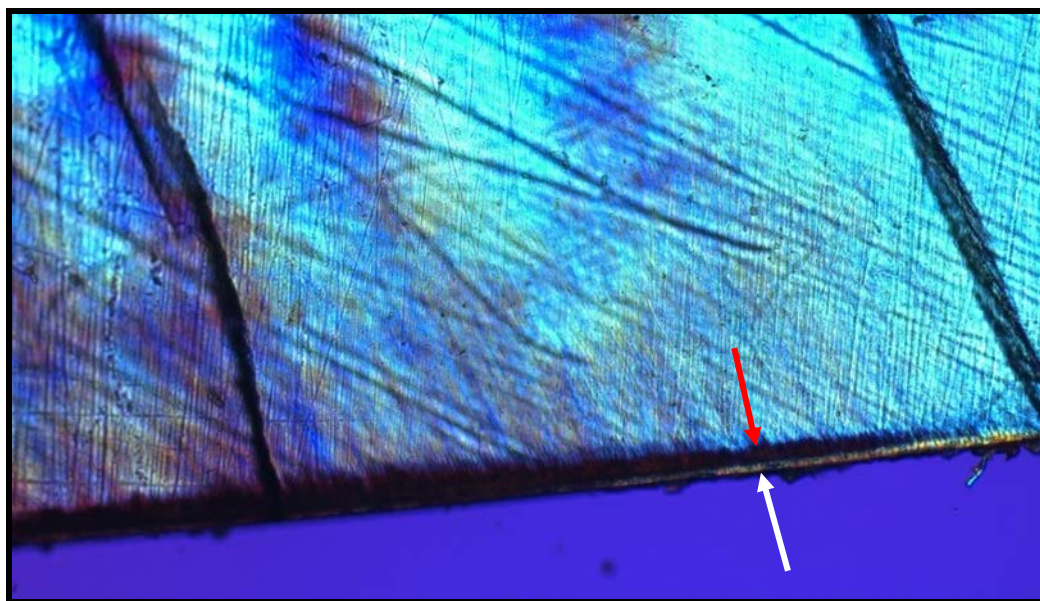


Figura 30 - Imagem ilustrativa do espécime 13 (GS), visualizado pela microscopia de luz polarizada. Seta branca = zona superficial; seta vermelha = corpo da lesão; GS = esmalte cariado e saliva artificial; aumento de 100 vezes.

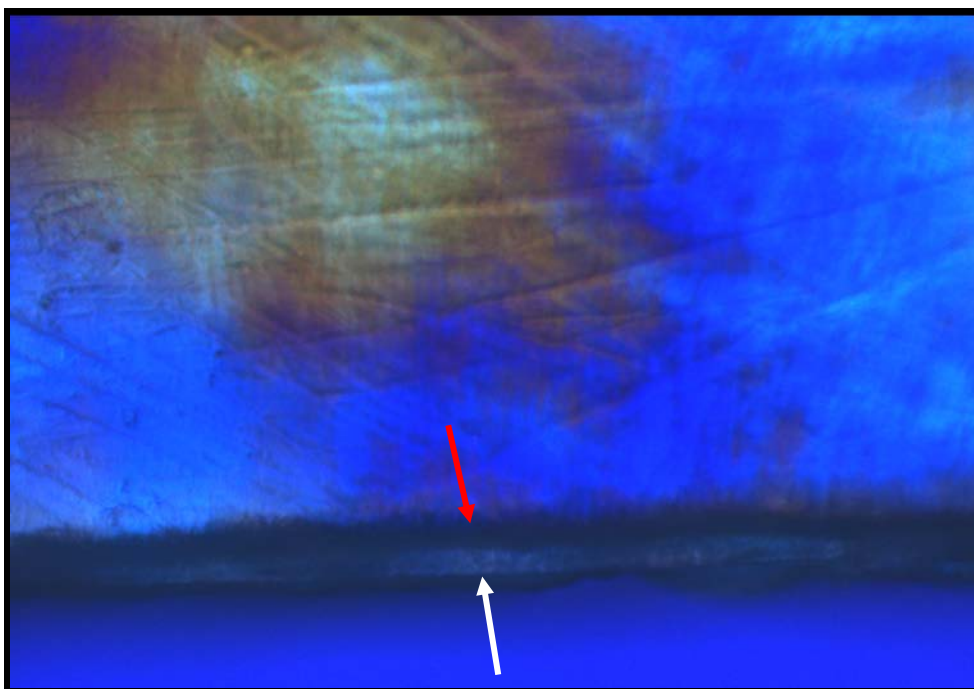


Figura 31 - Imagem ilustrativa do espécime 61 (GA), visualizado pela microscopia de luz polarizada. Seta branca = zona superficial; seta vermelha = corpo da lesão; GA = esmalte cariado e água deionizada; aumento de 200 vezes.

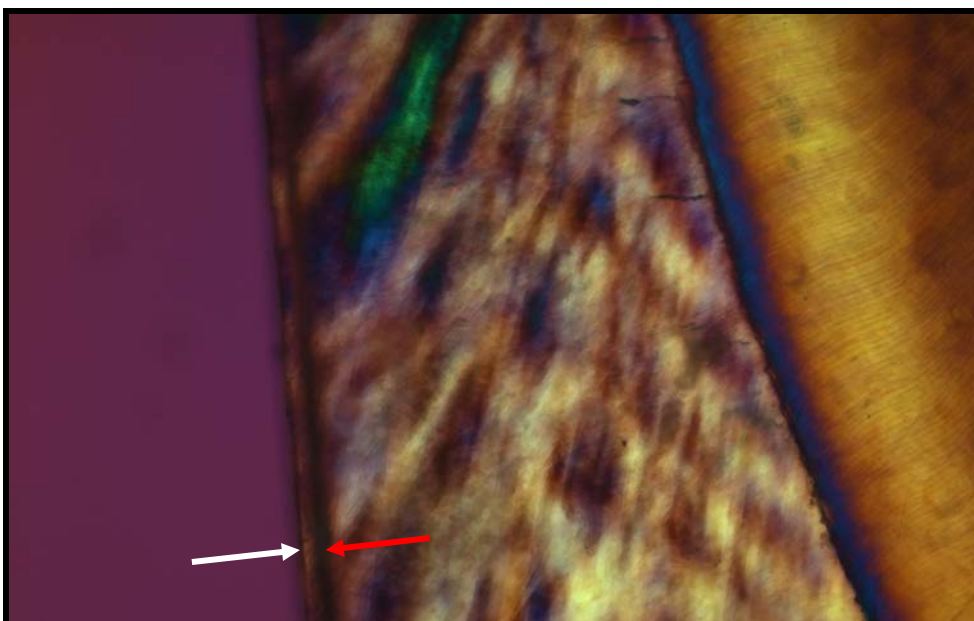


Figura 32 - Imagem ilustrativa do espécime 11 (GF), visualizado pela microscopia de luz polarizada. Seta branca = zona superficial; seta vermelha = corpo da lesão; GF = esmalte cariado e solução de NaF 0,05%; aumento de 100 vezes.

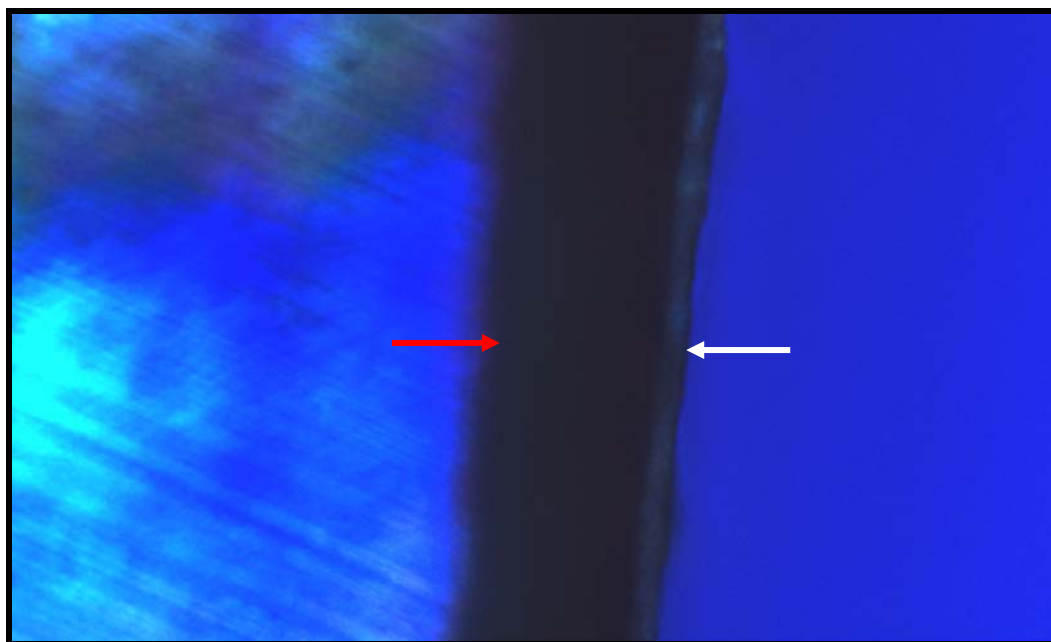


Figura 33 - Imagem ilustrativa do espécime 67 (GC), visualizado pela microscopia de luz polarizada. Seta branca = zona superficial; seta vermelha = corpo da lesão; GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*; aumento de 400 vezes.

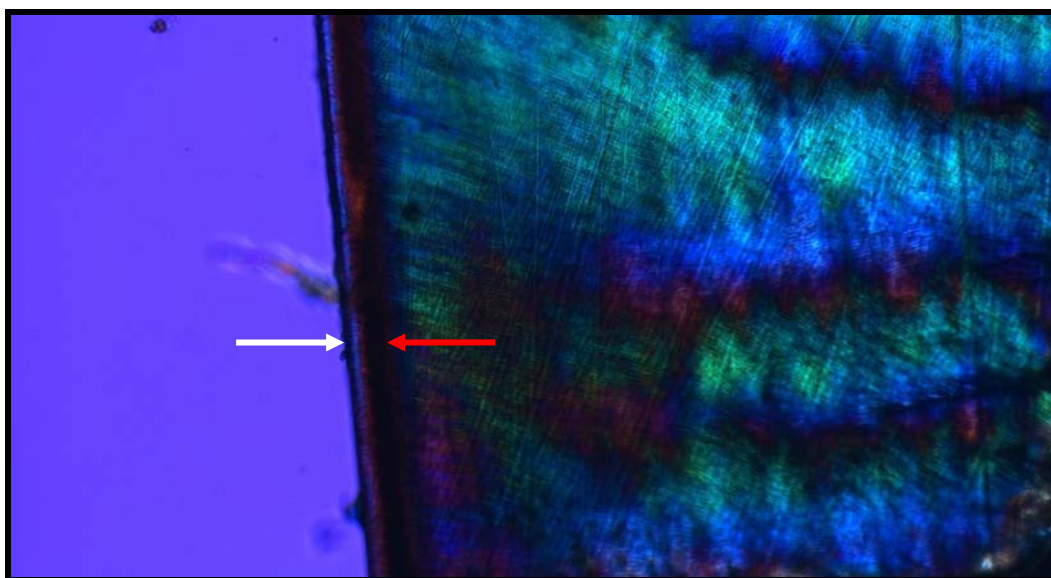


Figura 34 - Imagem ilustrativa do espécime 7 (GB), visualizado pela microscopia de luz polarizada. Seta branca = zona superficial; seta vermelha = corpo da lesão; GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*; aumento de 100 vezes.

5.5 Análise em microscopia eletrônica de varredura

As figuras 35 a 40 ilustram as alterações dos espécimes 3 (GH), 1 (GS), 16 (GA), 4 (GF), 5 (GC) e 6 (GB) visualizados pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). É interessante observar que o espécime do grupo GH, bem como de GF e GB apresentou a superfície de esmalte mais plana comparada à do espécime de GS, GA e GC (análise apenas ilustrativa).

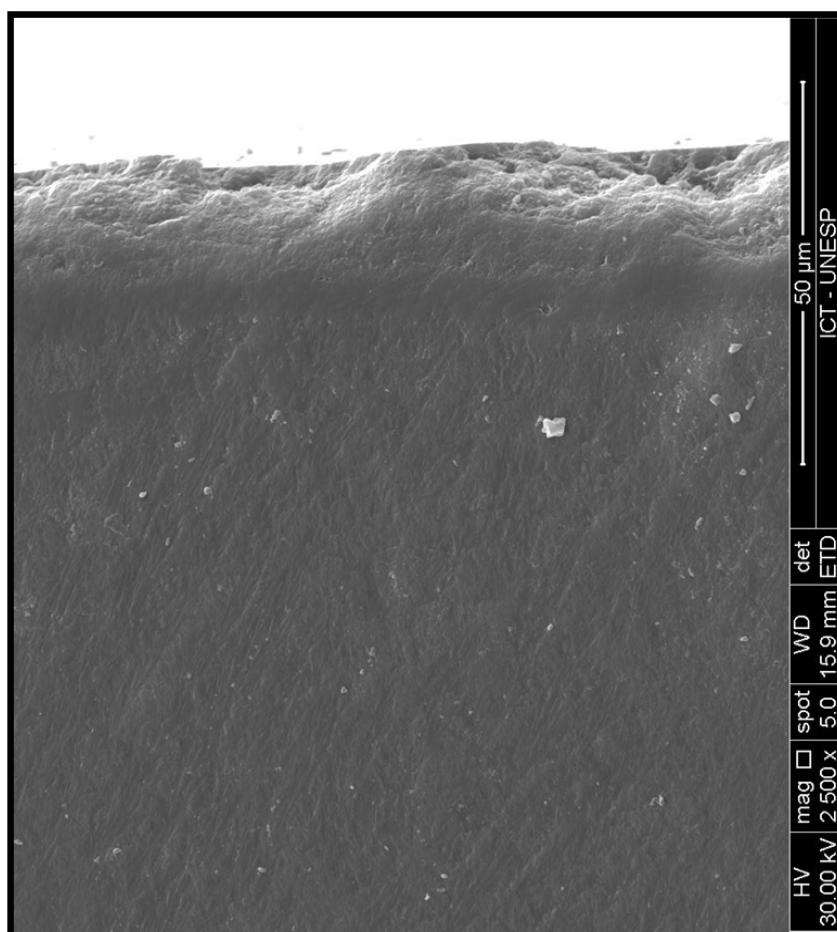


Figura 35 - Imagem ilustrativa do espécime 3 (GH) visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2500 vezes). GH = esmalte hígido e saliva artificial.

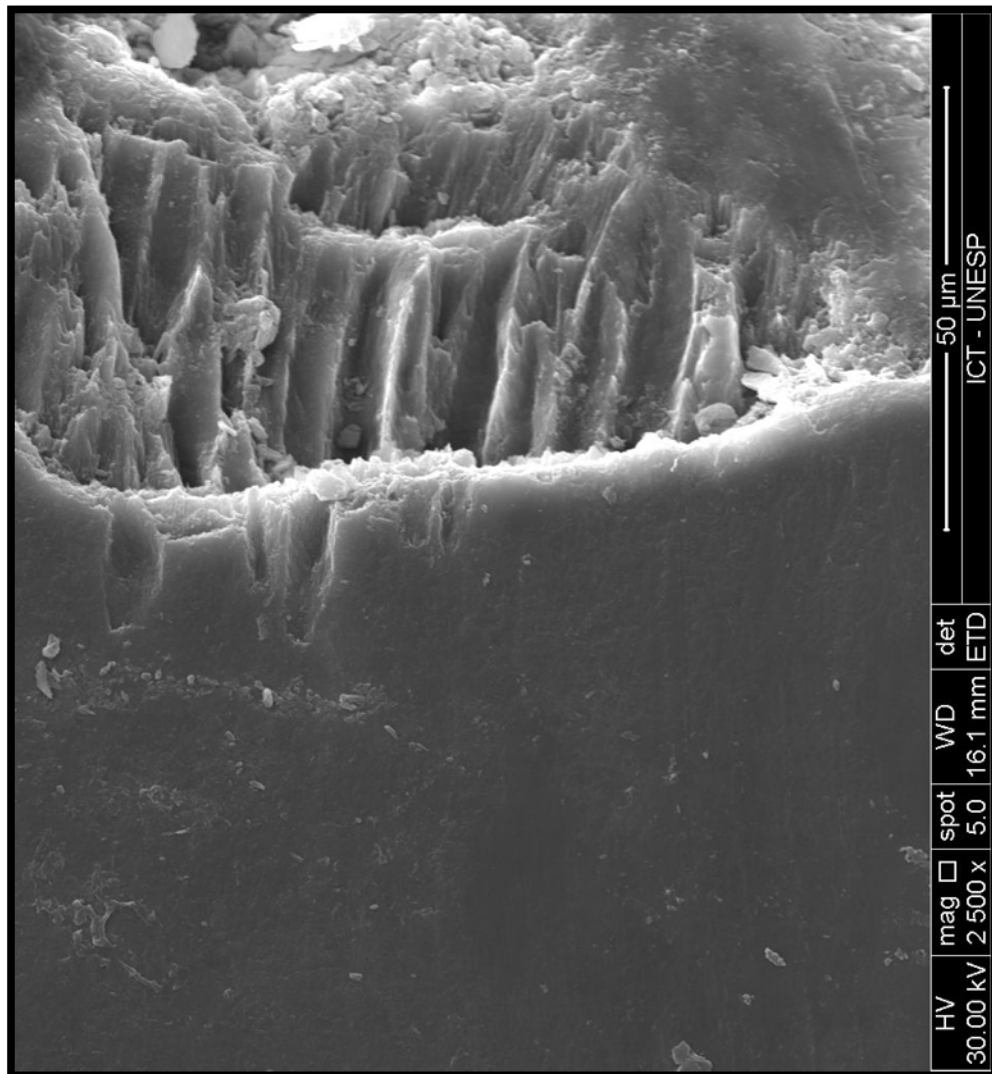


Figura 36 - Imagem ilustrativa do espécime 1 (GS) visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2500 vezes). GS = esmalte cariado e saliva artificial.

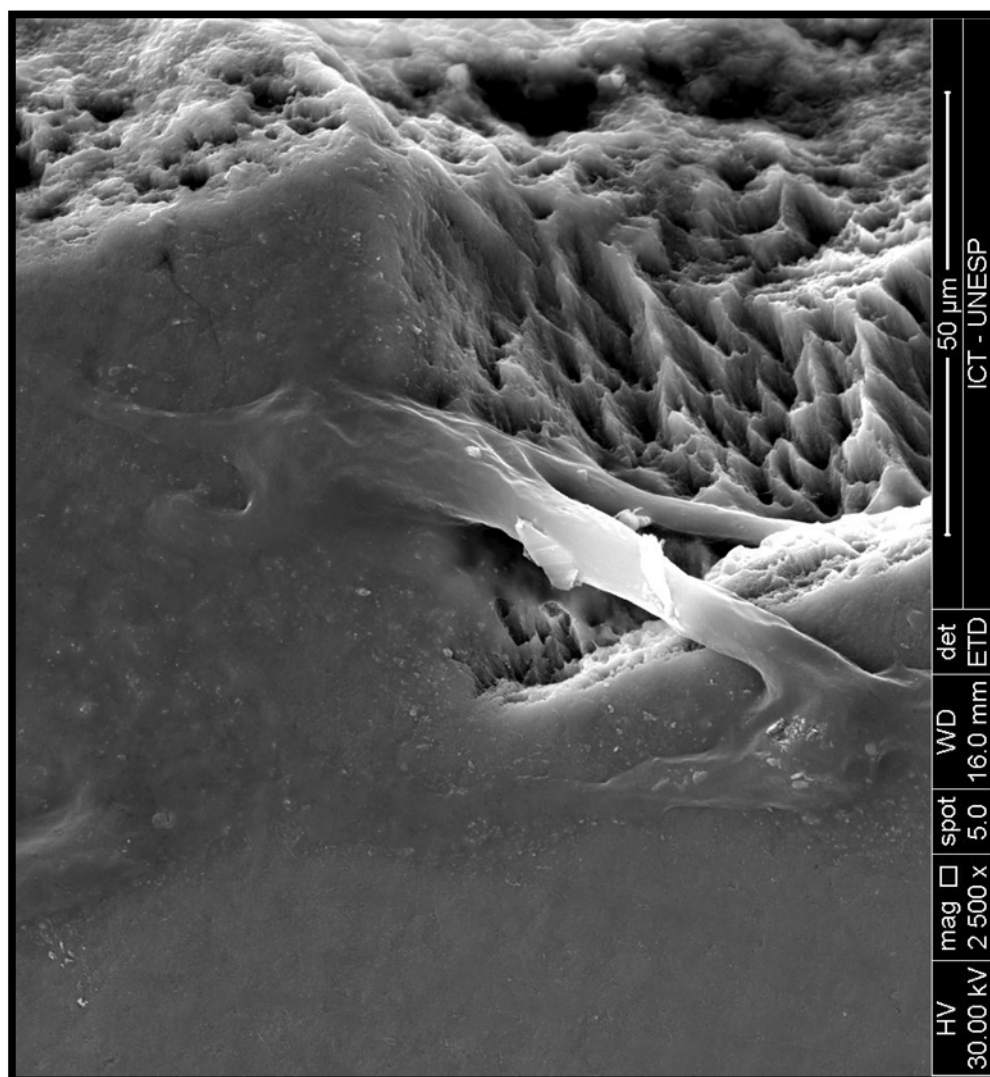


Figura 37 - Imagem ilustrativa do espécime 16 (GA) visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2500 vezes). GA = esmalte cariado e água deionizada.

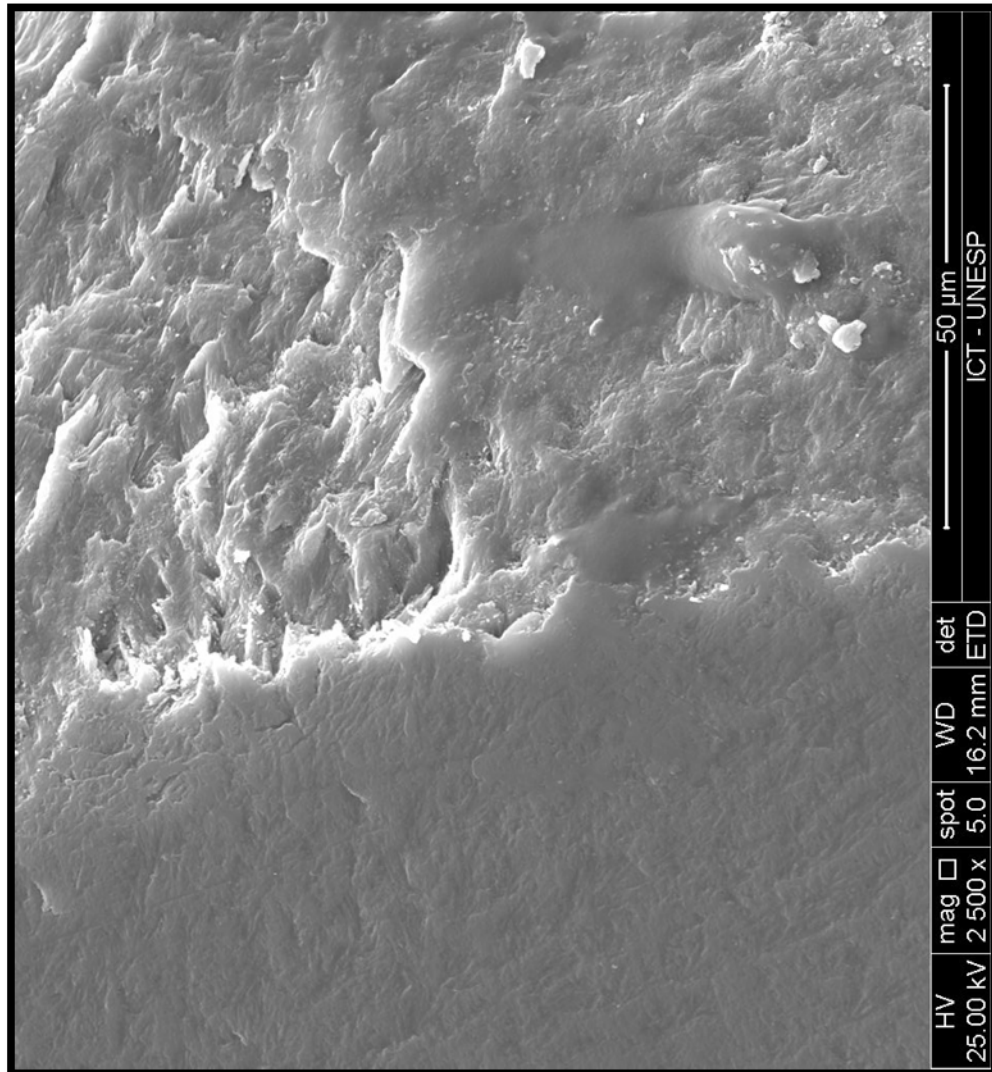


Figura 38 - Imagem ilustrativa do espécime 4 (GF) visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2500 vezes). GF = esmalte cariado e solução de NaF 0,05%.

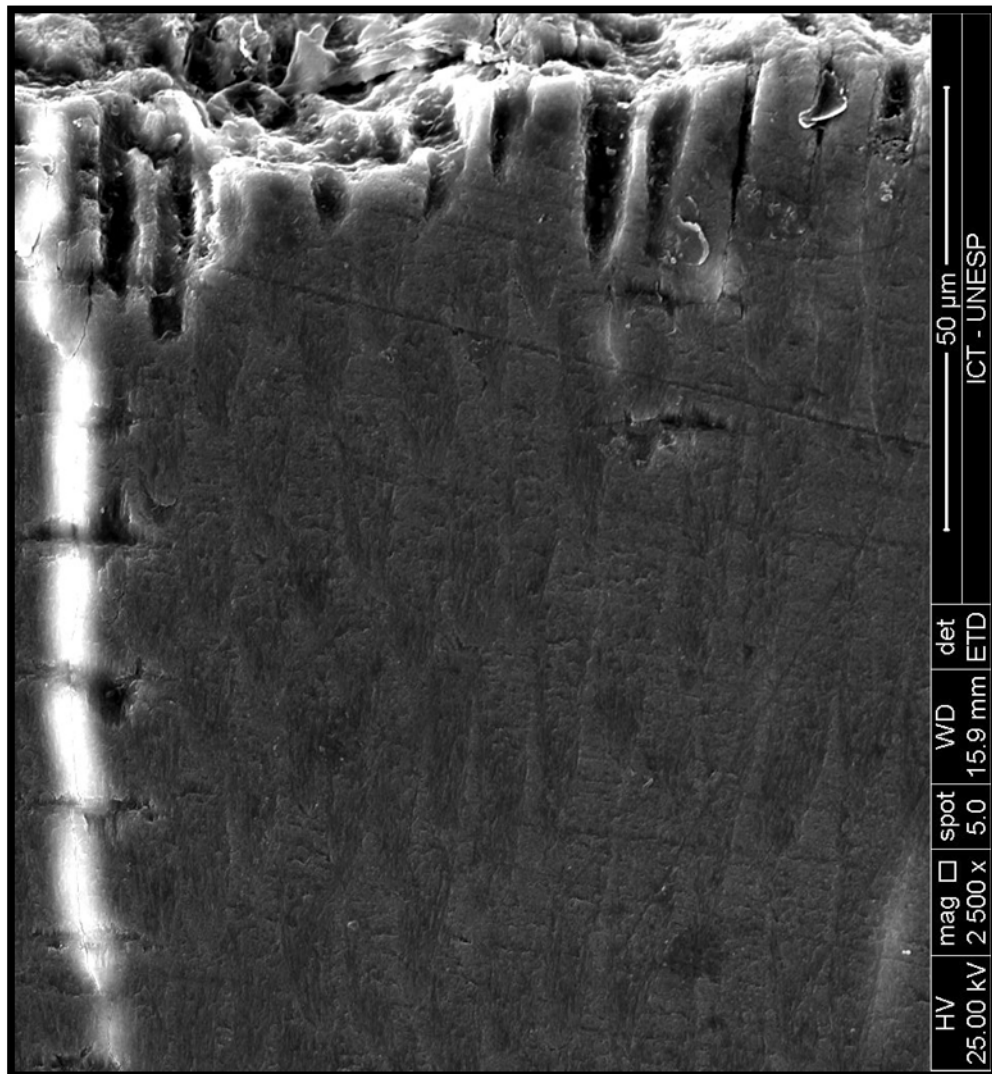


Figura 39 - Imagem ilustrativa do espécime 5 (GC) visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2500 vezes). GC = esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*.

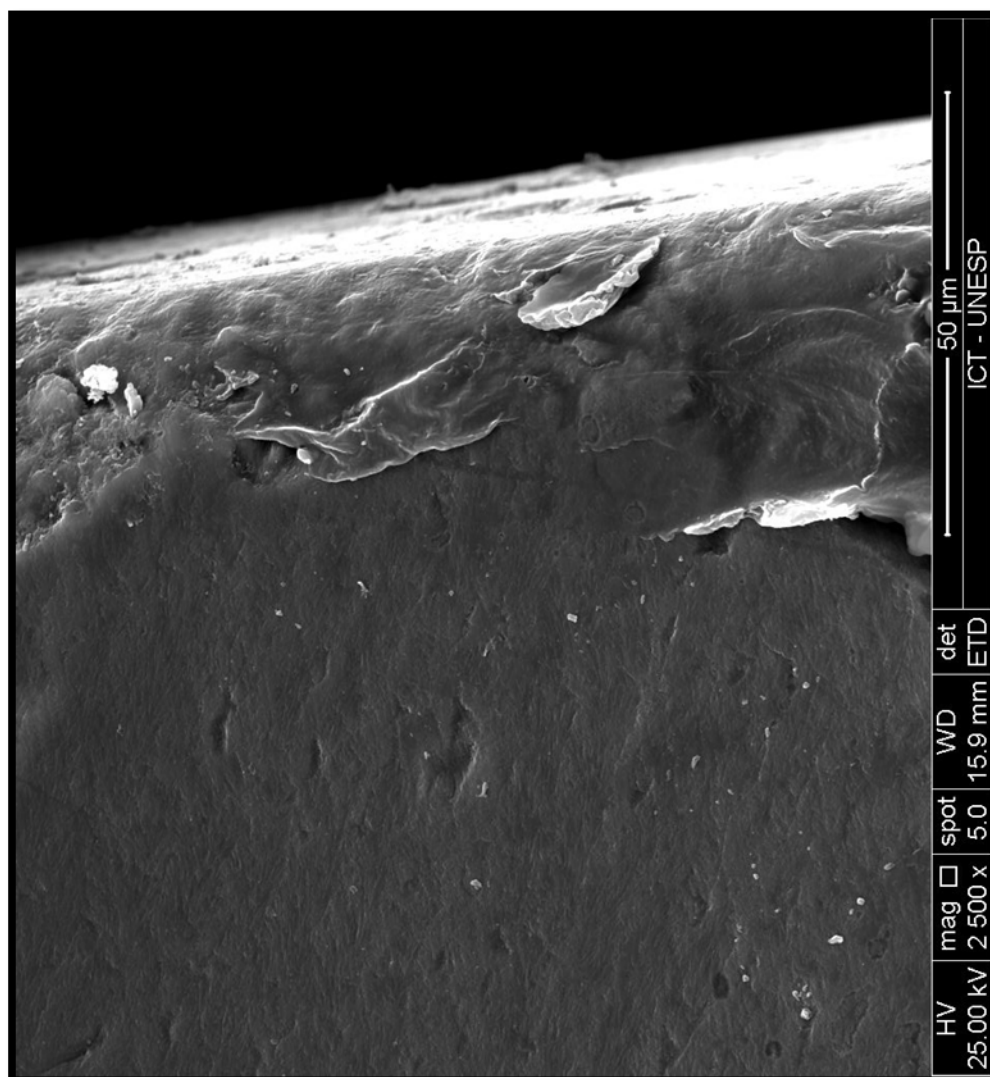


Figura 40 - Imagem ilustrativa do espécime 6 (GB) visualizado pela microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2500 vezes). GB = esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*.

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos gerais

Este estudo *in vitro* avaliou a efetividade das tinturas de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens* na remineralização de lesão de cárie incipiente/subsuperficial desenvolvida artificialmente em esmalte dentário humano permanente. A seleção deste tema foi baseada na alta prevalência de cárie dentária ainda existente em países subdesenvolvidos e com grande desigualdade social como o Brasil, devendo ser considerado um problema de saúde pública (Kramer et al., 2014; Suga et al., 2014).

É oportuno ressaltar que o Brasil é conhecido mundialmente por possuir uma ampla diversidade vegetal, a qual é empregada em pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de doenças (Brandão et al., 2008; Balbani et al., 2009). Neste estudo, as plantas *C. sinensis* e *A. arborescens* foram selecionadas devido a sua ampla disseminação em diversos países como medicina popular ou alopática para tratamento de diferentes doenças (Faria et al., 2011; Bastian et al., 2013). Embora com conhecida ação fitoterápica, não há relatos na literatura com relação à efetividade dessas plantas na microdureza do esmalte

dentário cariado. Contudo, um estudo divulgou o efeito de *C. sinensis* no aumento da microdureza de dentina erodida (Mirkarimi, Toomarian, 2012).

A escolha pela utilização das plantas na forma de tintura hidroalcoólica (constituída de 50% álcool e 50% água) consistiu no fato de apresentar-se na forma líquida, ao contrário do extrato (de consistência pastosa), favorecendo sua utilização no estudo para simular uma solução para bochecho. Ademais, é importante destacar que as plantas possuem componentes que são mais solúveis em álcool, enquanto outros são mais solúveis em água. Dessa forma, essa formulação favoreceu a extração de componentes das plantas solúveis tanto em álcool quanto em água.

Desde a constatação de seus benefícios na odontologia na década de 1930 à época presente, preconiza-se a utilização do fluoreto tópico como padrão na diminuição da incidência de cárie dentária (Dean, 1938; Knutson, Wallace, 1943) e no tratamento de lesões incipientes (Cury, Tenuta, 2009). Dessa forma, a solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05% (pH 7,0), amplamente prescrita pelos cirurgiões-dentistas para bochecho diário caseiro, foi designada para este estudo. Para o controle positivo a saliva artificial foi selecionada, visto que na cavidade bucal os dentes são naturalmente umidificados pela saliva, responsável por diversas funções, incluindo sua capacidade remineralizante devido à presença de íons cálcio e fosfato (Dawes, Jenkins, 1964; Koulourides et al., 1965; Lamkin, Oppenheim, 1993). A água deionizada foi utilizada como controle

negativo, uma vez que não promoveria qualquer efeito sobre os espécimes.

A metodologia descrita por Buskes et al. (1985) para promover a desmineralização *in vitro* de espécimes de esmalte dentário consiste num mecanismo simples, de baixo custo, em que certos requisitos devem ser obedecidos, como a permanência constante da atividade iônica da solução tampão, o envolvimento da superfície dos espécimes pela solução e a possibilidade de remoção de alguns espécimes da mesma, durante o experimento, para a mensuração do progresso das lesões. Em seu estudo, foram obtidas lesões com 118 a 145 μm de profundidade (microscopia de luz associada a micrometro), em espécimes submetidos a 115 h de processo de formação de cárie. Por meio da microradiografia e da microscopia de luz observou-se uma morfologia típica de lesão de cárie subsuperficial, com uma camada superficial cobrindo uma profunda lesão de subsuperfície e alta perda mineral.

No presente estudo, a superfície dos espécimes permaneceu relativamente intacta (ausência de cavitação) após 10 dias de imersão na solução tampão para a formação de lesão de cárie artificial, ao serem visualizados pelo microdurômetro (Figuras 7b a 7c; Figuras 9b a 9e). Além disso, ao serem visualizados pela microscopia de luz polarizada, observou-se nitidamente a formação de zona superficial e corpo da lesão (Figura 28; Figuras 30 a 34). A literatura menciona falhas numa diversidade de sistemas de ácido orgânico/MHDP (0,1 mmol/L) para a formação de lesão artificial de cárie subsuperficial. Os ácidos hidrolórico (pH 3,8 a 5,0) e tartárico

(pH 4,0) provocaram o condicionamento da superfície; os ácidos acético (pH 4,0) e láctico (pH 3,6) promoveram cavitação na camada superficial, aparentemente iniciada nos dois primeiros dias, enquanto que o ácido tartárico (pH 6,0) não promoveu nenhum efeito de dissolução visível (Featherstone, Rodgers, 1981b).

A mensuração da microdureza *Knoop* é considerada apropriada para materiais que possuem uma delgada microestrutura, não homogênea ou propensa a fratura, como o esmalte dentário (Featherstone et al., 1983; Souchois et al., 2008; Lata et al., 2010). É utilizada para fornecer uma medida quantitativa das alterações superficiais (Silverstone, 1977; Gomez et al., 2014), destinada para se determinar os efeitos da desmineralização e remineralização no tecido dentário, podendo fornecer uma evidência indireta de perda ou ganho mineral, mostrada pela alteração do tamanho e forma das indentações (Silverstone, 1977; Souchois et al., 2008): se o comprimento da indentação aumenta, o tecido perdeu mineral; se o seu comprimento diminui, o tecido ganhou mineral (Arends, ten Bosch, 1992). Neste estudo, as alterações de dureza sofridas pelo processo carioso e pelos tratamentos instituídos foram medidas por meio da microdureza *Knoop* na superfície e em secção transversa.

A remineralização é definida como o processo pelo qual os íons cálcio e fosfato são fornecidos ao dente, a partir de uma fonte externa a ele, para promover reparação cristalina pela deposição dos íons nas lacunas do esmalte desmineralizado, produzindo ganho mineral (Cochrane et al., 2010; Elkassas, Arafa, 2014). Portanto, a remineralização é a redeposição de minerais perdidos pelo esmalte,

podendo ser utilizada como sinônimo de reparação ou reendurecimento do esmalte dentário (Silverstone, 1977; Cury, Tenuta, 2009). Essa redeposição de minerais sobre a superfície do esmalte ocorre quando os fluidos bucais (saliva, fluido do biofilme) possuem cálcio e fósforo em concentrações supersaturadas em relação à composição mineral do esmalte e quando o pH aumenta (Cury, Tenuta, 2009; Lata et al., 2010).

6.2 Microdureza superficial

Com base nos resultados obtidos na superfície do esmalte, nenhum dos grupos submetidos à lesão de cárie artificial atingiu o mesmo padrão de microdureza do grupo de esmalte hígido, após serem submetidos aos tratamentos, como ilustram a tabela 1 e a figura 11. Este fato pode ser explicado em virtude da significativa desmineralização provocada na superfície do esmalte, com uma diminuição de aproximadamente 87% da média inicial de microdureza. Essas lesões podem ser consideradas lesões cariosas não cavitadas com perda mineral avançada, conforme estudo de Gonzalez-Cabezas et al. (2012), cujas lesões de cárie artificial em dentes humanos permanentes apresentaram uma diminuição de aproximadamente 88% da microdureza do esmalte hígido. Dessa forma, no presente estudo, o período no qual os espécimes estiveram submetidos aos tratamentos não foi suficiente para que houvesse uma

reposição de minerais que atingisse a microdureza do esmalte hígido. Ademais, é importante destacar que um completo reendurecimento não ocorre se o processo de amolecimento foi realizado demasiadamente (Silverstone, 1977).

Os controles positivo (saliva artificial) e negativo (água deionizada) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, de acordo com o teste Tukey comparações múltiplas, entretanto o contrário foi observado pelo teste Dunnett comparações múltiplas. A informação revelada pelo teste Dunnett parece ser mais consistente, visto que a capacidade da saliva remineralizar os cristais de esmalte desmineralizados deriva da sua capacidade de fornecer íons cálcio e fosfato ao dente (Koulourides et al., 1965; Silverstone, 1972; Göhring et al., 2004; Cury, Tenuta, 2009; Cochrane et al., 2010). Em contrapartida, a água deionizada é desprovida de qualquer elemento que favoreça essa atividade.

É importante destacar que 26,7% dos espécimes de GA desenvolveram erosão na superfície, observada ao microdurômetro. Provavelmente esse fato deveu-se ao gradiente de concentração, onde os minerais presentes no esmalte dentário (meio de maior concentração) difundiram-se para a água deionizada (meio de menor concentração), na tentativa de manter um equilíbrio iônico entre os meios. Em virtude da substituição periódica da água deionizada, os minerais transferidos do esmalte para o meio líquido eram descartados. Dessa forma, a falta de reposição de minerais sobre os espécimes favoreceu o desenvolvimento de erosão, particularmente

naqueles que possuíam um esmalte menos mineralizado (espécimes com menor dureza).

Comparando-se as médias de microdureza pós-cárie (KHN₂) com as pós-tratamento (KHN₃) de cada grupo individualmente, pôde-se constatar que os tratamentos de destaque foram a solução de NaF 0,05% e a tintura de *A. arborescens* (teste t pareado). Entretanto, comparando-se apenas as médias pós-tratamento (KHN₃) de GF, GC e GB, é interessante ressaltar que todos promoveram aumento na microdureza superficial do esmalte, sem diferença estatisticamente significativa entre esses grupos ($p = 0,3451$, ANOVA, Tukey comparações múltiplas).

O resultado obtido neste estudo, com o uso do fluoreto, concorda com estudos prévios que comprovaram sua eficácia sobre o esmalte dentário humano cariado artificialmente, nas suas diversas formulações. Soluções contendo 1 ppm de fluoreto promoveram uma taxa de reendurecimento mais rápida que as sem fluoreto, após diversos tempos de exposição em espécimes de pré-molares, indicando seu efeito acelerador no processo de reendurecimento, verificado por meio da microscopia de luz polarizada (Silverstone, 1982). Uma aplicação de fina camada de verniz fluoretado sobre espécimes de pré-molares promoveu aumento da microdureza do esmalte (de $\approx 172,5$ para 218,30 Vickers) (Lata et al., 2010). A solução de NaF 2% (pH neutro e acidulado) aumentou a microdureza de espécimes de dentes permanentes com lesão de cárie (de 36,4 para 56,2 Vickers), principalmente em pH acidulado (González-Cabezas et al., 2012). O fluoreto associado ao trifosfato de cálcio como verniz

(22600 ppm F), ou agregado ao fosfato de cálcio amorfo (1100 ppm F), ou à caseína fosfopeptídeo-fosfato de cálcio amorfo (900 ppm F) ou o verniz a base de ionômero de vidro modificado por resina foi efetivo no aumento da microdureza superficial após uma única aplicação sobre espécimes de molares, remineralizados em saliva artificial durante 4 semanas (entre 233,33 a 293,10 KHN) (Elkassas, Arafa, 2014).

Todos os relatos sobre o efeito benéfico do fluoreto baseiam-se na sua capacidade de remineralização, sendo ele considerado o agente remineralizante mais comumente utilizado na administração não invasiva de lesões cariosas não cavitadas, responsável pelo aumento da concentração de CaF_2 na superfície do esmalte e pela diminuição da incidência de cárie dentária (Larsen, Richards, 2001; Moi et al., 2008; Cochrane et al., 2010; Lata et al., 2010). Ademais, é responsável pela formação de cristais novos e maiores que contém fluoreto (fluorapatita), aumentando a remineralização (Lata et al., 2010). Porém, sua capacidade remineralizante é limitada pela disponibilidade de íons cálcio e fosfato da saliva quando o fluoreto é aplicado (Cochrane et al., 2010).

C. sinensis é uma planta reconhecida por apresentar propriedade anti-cariogênica em decorrência de sua atividade contra microrganismos. O extrato de chá verde (6,25 a 50 mg/mL) diminuiu a contagem de 100% dos isolados de *Streptococcus mutans* de dentes cariados (Araghizadeh et al., 2013). Um enxaguatório bucal preparado com a planta diminuiu os níveis salivares de *S. mutans* e *Lactobacillus* ($<10^5$ UFC/mL) (Ferrazzano et al., 2011). A epigallocatequina-galato

(5 mg/mL) diminuiu a produção de ácidos do biofilme dentário e de *S. mutans*, porém não diminuiu a contagem de *S. mutans* e *S. sobrinus* em meio de cultura sacarosado (Hirassawa et al., 2006). No presente estudo, existe grande probabilidade da efetividade da tintura de *C. sinensis* ser atribuída à presença de íons fluoreto, cálcio e fosfato na sua composição (Lu et al., 2004; Reto et al., 2007; Malinowska et al., 2008; Daglia et al., 2011; Izuora et al., 2011), uma vez que há comprovação científica de que esses íons promovem a remineralização do esmalte cariado. Contudo, não se pode excluir a possível influência de outros elementos dessa planta, visto que até o presente momento, não há na literatura comprovação da ação dos polifenóis (catequinas) no aumento da microdureza do esmalte cariado. Dessa forma, talvez a efetividade dessa tintura possa também ser atribuída à ação do fitocomplexo. De acordo com esse conceito, todos os componentes de uma planta medicinal, e não apenas seu ingrediente ativo, podem influenciar a sua ação terapêutica, porém como apenas geralmente o ingrediente ativo é padronizado, os outros ingredientes acabam por influenciar a qualidade das preparações de uma forma que é desconhecida (Bianchi, 1999). Portanto, não necessariamente um componente da planta, isoladamente, tenha promovido o aumento da microdureza, mas a efetividade da tintura tenha sido promovida pela ação do fitocomplexo.

A babosa possui atividade antisséptica, antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, imuno-reguladora, detoxificante, cicatrizante, antimicrobiana e antiviral (Ali et al., 1999; Araújo et al., 2002; Lissoni et al., 2009; Bisi-Johnson et al., 2011, Bastian et al.,

2013; Coopoosamy, Naidoo, 2013; Di Luccia et al., 2013). É amplamente utilizada para o tratamento de queimaduras, úlceras e diabetes (Gutterman, Chauser-Volfson, 2008; Di Luccia et al., 2013). Entretanto, seu possível efeito anti-cariogênico tem sido pouco investigado. A adição de *A. vera* ao dentifrício resultou na diminuição do índice de placa, porém sem diferença significativa do dentifrício fluoretado convencional (Oliveira et al., 2008). A polpa de *A. vera* (12,5 µg/mL) foi efetiva contra isolados de *S. mutans* de dentes cariados (Fani, Kohanteb, 2012). *Aloe* contém substâncias denominadas antranóides, aloína A e B, aloemodina, alquil cromonas, pironas, heteropolisacarídeos, poliaminas, carboxipeptidase e proteína (Beppu et al., 2004; Bastian et al., 2013), além de minerais como o cálcio (18,6 mg/L), carbonato de potássio (31,4 mg/L), ferro, sódio, magnésio, manganês, cromo e zinco (Martins, 2010).

No presente estudo, a tintura de *A. arborescens* foi tão efetiva quanto a de *C. sinensis* e a solução de NaF 0,05% (Tukey comparações múltiplas). Possivelmente, pode-se atribuir a efetividade dessa tintura à presença de minerais, principalmente o cálcio. É importante ressaltar que, mesmo sem o fluoreto na sua composição, a efetividade da tintura de *A. arborescens* foi semelhante à de *C. sinensis* e à solução de NaF. Pode-se considerar, portanto, que o fitocomplexo dessa planta tenha promovido um efeito benéfico na remineralização do esmalte cariado, da mesma forma como pode ter ocorrido com a tintura de *C. sinensis*.

As porcentagens do volume de conteúdo mineral (vol % mineral) da superfície do esmalte, calculadas com as médias de

microdureza superficial após os tratamentos (KHN₃), mostraram o conteúdo mineral adquirido ou perdido pela superfície do espécime após cada tratamento (Tabela 2), sugerindo que a solução de NaF 0,05% proporcionou o maior aumento de conteúdo mineral (valor 51,45% superior a GA), seguido em ordem decrescente, pela tintura de *A. arborescens* (50,09% superior a GA), tintura de *C. sinensis* (40,63% superior a GA) e saliva artificial (25,88% superior a GA). Embora nenhum tratamento tenha promovido um aumento de conteúdo mineral semelhante ao do esmalte hígido, é importante destacar que todos os tratamentos proporcionaram aumento do conteúdo mineral, quando comparados à água deionizada.

6.3 Microdureza em secção transversa

A microdureza em secção transversa foi realizada para verificar a profundidade da lesão cáriosa subsuperficial desenvolvida artificialmente no esmalte dentário e o efeitos dos tratamentos instituídos no ganho mineral, sendo este método empregado em diversos estudos (Karlinsky et al., 2011; Souchois et al., 2013; Alcântara et al., 2014).

Para a realização desta etapa, determinados detalhes foram estabelecidos no estudo piloto. As indentações foram efetuadas a partir da superfície do esmalte de forma que estivessem completamente inseridas no espécime, sem promover rupturas na

região da superfície do esmalte ou que estivessem localizadas na região da cera pegajosa utilizada para sua fixação nos suportes de PVC (Figura 9e). Essa imagem ilustra a primeira indentação realizada na superfície (além das demais), a qual apresentou menor comprimento com relação à situada na profundidade de 10 μm , mostrando que a zona superficial apresentou microdureza maior que a do corpo da lesão, fato característico desse tipo de lesão. Ademais, a escolha pela distância de 10 μm entre cada indentação (da superfície a 100 μm) foi a menor adquirida para que não houvesse sobreposição das mesmas, evitando-se imprecisão nas leituras.

A lesão cariiosa subsuperficial em esmalte dentário é caracterizada pela perda parcial de minerais na superfície (zona superficial) e uma perda mais acentuada subjacente a ela, no corpo da lesão (Featherstone et al., 1978). Neste estudo, em todos os grupos submetidos à formação de lesão cariiosa, a região da superfície apresentou diminuição da microdureza, quando comparada à do esmalte hígido de GH (Figura 13). Este fato revelou a ocorrência de uma perda mineral parcial nessa região. Embora as lesões cariosas iniciais apresentem superfície relativamente intacta, elas possuem um baixo conteúdo mineral na zona superficial quando comparadas ao esmalte hígido, mostrando um valor de dureza menor que o do esmalte hígido (Lata et al., 2010).

Na profundidade de 10 μm , houve uma diminuição da microdureza ainda maior que a apresentada na superfície. Possivelmente, a profundidade de 10 μm corresponda ao corpo da lesão. As figuras 13 e 14 ilustram esse comportamento. Nas

profundidades de 20 a 100 μm , verificou-se um aumento progressivo da microdureza em todos os grupos cariados, como ilustram as figuras 15 a 20. Essa característica de aumento progressivo da microdureza manifestada nos grupos cariados pode ser atribuída à ação dos tratamentos instituídos.

Em todas as profundidades analisadas, foi notório o efeito da solução aquosa de NaF 0,05%, sendo o primeiro grupo a atingir média de microdureza semelhante à de GH (a partir de 40 μm), seguido pelos grupos GS (a partir de 60 μm), GC (a partir de 70 μm) e GB (a partir de 80 μm). Entretanto, desde a primeira profundidade (superfície) até 100 μm , não houve diferença estatisticamente significativa entre GF, GC e GB (Figuras 13 a 20).

Deve-se também considerar os efeitos produzidos pelos controles positivo e negativo. Os resultados mostraram que os controles GS e GA atuaram de maneira esperada. Em GS (controle positivo) ocorreu aumento da microdureza, evidentemente pelo efeito remineralizante da saliva, enquanto que em GA (controle negativo), o aumento da microdureza não ocorreu em função de uma possível ação remineralizante da água deionizada, contudo em função do aumento da profundidade, atingindo o nível das zonas escura e translúcida da lesão cariosa, que naturalmente apresentam valores de microdureza maiores que os apresentados na região do corpo da lesão (Silverstone et al., 1981; Silverstone, 1982).

A equação proposta para o cálculo da porcentagem do volume de conteúdo mineral e a profundidade da lesão cariosa revelou resultados importantes, como informa a tabela 4. Na profundidade de

100 μm , a porcentagem do volume de conteúdo mineral de GA (78,76) atingiu 95% da apresentada na superfície do esmalte hígido (81,21), representada pela superfície de GH. Portanto, pode-se deduzir que a profundidade da lesão cariiosa subsuperficial desenvolvida neste estudo apresente uma profundidade de 100 μm .

É interessante ressaltar que, da mesma forma como ocorrido na microdureza superficial (ilustrada pela Tabela 2), na primeira profundidade da microdureza em secção transversa (superfície), GF apresentou valor da porcentagem do volume de conteúdo mineral 54,76% superior ao de GA, seguido por GB (28,88% superior a GA), GC (28,51% superior a GA) e GS (10,23% superior a GA).

Analisando-se as demais profundidades, observa-se que GF exibiu a maior regressão da lesão, apresentando uma profundidade de 40 μm , seguido por GC e GS (50 μm) e GB (60 μm). Considerando-se o ganho mineral ocorrido em cada profundidade, GF foi o grupo que proporcionou o maior aumento da porcentagem do volume de conteúdo mineral em todas as profundidades. O grupo GC apresentou maior conteúdo mineral que GS nas cinco primeiras profundidades (superfície a 40 μm), apenas sendo inferior à GS na profundidade de 50 μm (diferença de 1,85 percentual). O grupo GB apresentou maior conteúdo mineral que GS apenas nas três primeiras profundidades (superfície a 20 μm).

Embora todos os tratamentos, com exceção da água deionizada, tenham promovido aumento do conteúdo mineral do esmalte cariado em todas as profundidades e ocasionado diminuição

da profundidade da lesão, a solução de NaF 0,05% destacou-se dos demais. Os resultados deste estudo concordam com relato prévio de Alcântara et al. (2014), em que o gel de NaF 2% mostrou-se efetivo no aumento da microdureza em secção transversa de espécimes de terceiros molares cariados após 15 dias (estudo *in situ*).

Segundo Cochrane et al. (2010), a remineralização superficial propicia precária melhora da estética e das propriedades estruturais da lesão cariosa profunda. Idealmente, um processo de remineralização deve fornecer íons cálcio, fosfato e fluoreto que favoreçam o ganho mineral subsuperficial, em vez de uma deposição apenas na camada superficial. Os resultados do presente estudo revelaram a ocorrência de remineralização da lesão artificial de cárie subsuperficial em esmalte dentário tanto na superfície quanto em profundidade.

6.4 Análises qualitativas: EDS, MEV, MLP

Os valores da razão Ca/P obtidos pelo EDS foram semelhantes tanto na superfície quanto próximo à JAD em todos os grupos (Tabela 5). Todos os valores encontram-se acima da razão Ca/P da hidroxiapatita (1,67), provavelmente a análise tenha captado o cálcio e o fósforo das regiões que apresentaram menor perda de minerais (superfície e próximo à JAD). Resultado semelhante ao espécime de GF foi obtido com o gel de NaF 2%, cuja razão Ca/P

presente nas profundidades de 25 e 225 μm foi, respectivamente, 1,89 e 1,93 (Alcântara et al., 2014).

As imagens (de caráter apenas ilustrativo) fornecidas pela MEV (Figuras 35 a 40), de espécimes seccionados longitudinalmente, revelaram áreas desmineralizadas apresentando fendas devido à dissolução de cristais intercaladas com estreitas áreas de lisura, localizadas na região superior das imagens. Esse aspecto ficou evidente nos grupos tratados com saliva artificial (Figura 36), água deionizada (Figura 37) e tintura de *C. sinensis* (Figura 39). Entretanto, os grupos tratados com a solução de NaF 0,05% (Figura 38) e tintura de *A. arborescens* (Figura 40) apresentaram extensas áreas de aparência plana, semelhantes ao espécime hígido tratado com saliva artificial (Figura 35), revelando a formação de um novo revestimento que preencheu progressivamente as fendas, as quais se tornaram ocultas devido a deposição de minerais (Elkassas, Arafa, 2014).

A visualização de espécimes pela MLP permitiu a observação de aspectos histológicos da lesão cariiosa subsuperficial (Figuras 28, 30 a 34). Examinados em água, foi possível observar a zona superficial relativamente intacta e, adjacente a ela, uma região apresentando birrefringência positiva, que corresponde ao corpo da lesão. As figuras 27 e 29 ilustram o aspecto histológico do esmalte hígido, desprovido de alterações. As zonas escura e translúcida, que correspondem à frente de avanço da lesão, seriam evidenciadas em quinolina. Contudo, essas características histológicas não são universais, portanto algumas lesões podem não apresentar as zonas

escura, translúcida e até mesmo a superficial (de Medeiros et al., 2012).

6.5 Considerações finais

Evidentemente, por tratar-se de um estudo *in vitro* preliminar, limitações freqüentemente são encontradas. Neste estudo, pode-se mencionar o escurecimento de alguns espécimes em tons de marrom, provavelmente devido à presença de pigmentos inerentes das tinturas, os quais foram absorvidos pela superfície do esmalte dentário desmineralizado (mais poroso). Certamente, outras análises devem ser realizadas previamente à utilização dessas tinturas na cavidade bucal de humanos.

7 CONCLUSÃO

Os tratamentos propostos mostraram-se efetivos na remineralização da lesão artificial de cárie incipiente em esmalte dentário humano tanto na microdureza superficial quanto em secção transversa, quando comparados à ação da água deionizada. A solução de NaF exibiu as médias de microdureza mais elevadas que os demais tratamentos, porém sem diferença estatisticamente significativa da saliva e das tinturas. Todos os tratamentos diminuíram a profundidade da lesão, com destaque para a solução de NaF, seguido pela tintura de *C. sinensis*, saliva e tintura de *A. arborescens*.

8 REFERÊNCIAS*

Alcântara PC, Alexandria AK, Souza IP, Maia LC. *In situ* effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on artificially decayed human enamel. *Braz Dent J.* 2014 Jan-Feb;25(1):28-32.

Ali MI, Shalaby NM, Elgamal MH, Mousa AS. Antifungal effects of different plant extracts and their major components of selected aloe species. *Phytother Res.* 1999 Aug;13(5):401-7.

Antunes DP, Salvia ACRD, de Araújo RM, Di Nicoló R, Koga Ito CY, de Araujo MA. Effect of green tea extract and mouthwash without alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. *Gerodontology.* 2014 May 21. doi: 10.1111/ger.12132. [Epub ahead of print]

Aoba T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):136-53.

Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM. Inhibitory activity of green tea (*Camellia sinensis*) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *Med Princ Pract.* 2013;22(4):368-72.

Araújo PS, Silva JMOD, Neckel CA, Ianssen C, Oltramari AC, Passos R, et al. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - *Liliaceae*). *Biotecnol Ciênc Desenvol.* 2002 Mar-Apr; 25:54-7.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res*. 1992 Apr; 71 Spec No:924-28.

Argenta RM, Tabchoury CP, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Jul-Sep;17(3):241-6.

Arnold WH, Haase A, Hacklaender J, Gintner Z, Bánóczy J, Peter Gaengler. Effect of pH of amine fluoride containing toothpastes on enamel remineralization *in vitro*. *BMC Oral Health*. 2007 Oct 17;7:14.

Awadalla HI, Ragab MH, Bassuoni MW, Fayed MT, Abbas MO. A pilot study of the role of green tea use on oral health. *Int J Dent Hyg*. 2011 May;9(2):110-6.

Balbani AP, Silva DH, Montovani JC. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. *Expert Opin Ther Pat*. 2009 Apr;19(4):461-73.

Bastian P, Fal AM, Jambor J, Michalak A, Noster B, Sievers H, et al. Candelabra aloe (*Aloe arborescens*) in the therapy and prophylaxis of upper respiratory tract infections: traditional use and recent research results. *Wien Med Wochenschr*. 2013 Feb;163(3-4):73-9.

Beighton D, Al-Haboubi M, Mantzourani M, Gilbert SC, Clark D, Zoitopoulos L, et al. Oral Bifidobacteria: caries-associated bacteria in older adults. *J Dent Res*. 2010 Sep;89(9):970-4.

Beppu H, Kawai K, Shimpo K, Chihara T, Tamai I, Ida C, et al. Studies on the components of *Aloe arborescens* from Japan-monthly variation and differences due to part and position of the leaf. *Biochem System Ecol*. 2004 Sep;32(9):783-95.

Bertol HC. Determinação de critérios para aceitação de medições de dureza realizadas com durômetros portáteis em regiões de soldas [dissertação]. Porto Alegre (RS): Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

Bhat SS, Hegde KS, Habibullah MA, Bernhardt V. Incipient enamel lesions remineralization using casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate cream with and without fluoride: a laser fluorescence study. *J Clin Pediatr Dent*. 2012 Summer;36(4):353–6.

Bianchi A. Phytotherapy between traditional medicine and alternative practices: how much safety and how much efficacy? *Ann Ist Super Sanita*. 1999;35(4):505-8.

Bisi-Johnson MA, Obi CL, Hattori T, Oshima Y, Li S, Kambizi L, et al. Evaluation of the antibacterial and anticancer activities of some South African medicinal plants. *BMC Complement Altern Med*. 2011 Feb 17;11:14. doi: 10.1186/1472-6882-11-14.

Brandão MG, Zanetti NN, Oliveira P, Graef CF, Santos AC, Monte-Mór RL. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol*. 2008 Nov;120(2):141-8.

Brauer DS, Saeki K, Hilton JF, Marshall GW, Marshall SJ. Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth. *Dent Mater*. 2008 Aug;24(8):1137-40.

Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res*. 1985;19(6):490-6.

Castilho AR, Murata RM, Pardi V. Natural products in Dentistry. *Rev Saúde*. 2007;1(1):11-9.

Chinaglia CR, Correa CA. Análise de falhas em materiais através de técnicas avançadas de microscopia. *Polímeros*. 1997;7(3):19-23.

Cicccone-Nogueira JC. Influência de métodos de esterilização nas propriedades físicas do substrato dental [tese]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP - Universidade de São Paulo; 2009.

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

Coopoosamy RM, Naidoo KK. A comparative study of three *Aloe* species used to treat skin diseases in South African rural communities. *J Altern Complement Med*. 2013 May;19(5):425-8.

Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*. 2009;23 Suppl 1:23-30.

Daglia M, Papetti A, Mascherpa D, Grisoli P, Giusto G, Lingström P, et al. Plant and fungal food components with potential activity on the development of microbial oral diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:274578.

Dawes C, Jenkins GN. The effects of different stimuli on the composition of saliva in man. *J Physiol*. 1964 Jan;170:86-100.

Dean HT. Endemic fluorosis and its relation to dental caries. *Public Health Rep*. 1938 Aug;53:1443-52.

Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico]*. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2007.

De Medeiros RC, Soares JD, De Sousa FB. Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. *J Microsc*. 2012 May;246(2):177-89.

Di Luccia B, Manzo N, Vivo M, Galano E, Amoresano A, Crescenzi E, et al. A biochemical and cellular approach to explore the antiproliferative and prodifferentiative activity of *Aloe arborescens* leaf extract. *Phyther Res*. 2013 Dec;27(12):1819-28.

Elkassas D, Arafa A. Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *J Dent.* 2014 Apr;42(4):466-74.

Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J Oral Sci.* 2012 Mar;54(1):15-21.

Faria RL, Cardoso LM, Akisue G, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO, et al. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars. *J Appl Oral Sci.* 2011 Oct;19(5):476-82.

Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. Sao Paulo: Graf. Siqueira; 1959.

Featherstone JDB, Duncan JF, Cutress TW. Surface layer phenomena in *in-vitro* early caries-like lesions of human tooth enamel. *Arch Oral Biol.* 1978;23(5):397-404.

Featherstone JDB, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res.* 1981a;15(1):109-14.

Featherstone JDB, Rodgers BE. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesions. *Caries Res.* 1981b;15(5):377-85.

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(5):385-91.

Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. *Austr Dent J.* 2008 Sep; 53(3):286–91.

Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, Cantile T, Sangianantoni G, Ingenito A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an in vivo study. *J Med Food*. 2011 Sep;14(9):907-11.

Francisco KSF. Fitoterapy: an option in odontological treatment. *Rev Saúde*. 2010;4(1):18-24.

Freitas AR. Análise da manutenção de integridade estrutural de órgãos dentários e a influência de diferentes métodos de descontaminação e armazenamento [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia, USP - Universidade de São Paulo; 2011.

García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc*. 2008 May;139 Suppl 2:25S-34S.

Göhring TN, Zehnder M, Sener B, Schmidlin PR. *In vitro* microleakage of adhesive-sealed dentin with lactic acid and saliva exposure: a radio-isotope analysis. *J Dent*. 2004 Mar;32(3):235-40.

Gomez J, Pretty IA, Santarpia RP 3rd, Cantore B, Rege A, Petrou I, et al. Quantitative light-induced fluorescence to measure enamel remineralization *in vitro*. *Caries Res*. 2014;48(3):223-7.

González-Cabezas C, Jiang H, Fontana M, Eckert G. Effect of low pH on surface rehardening efficacy of high concentration fluoride treatments on non-cavitated lesions. *J Dent*. 2012 Jun;40(6):522-6.

Gutterman Y, Chauser-Volfson E. The content of secondary phenol metabolites in pruned leaves of *Aloe arborescens*, a comparison between two methods: leaf exudates and leaf water extract. *J Nat Med*. 2008 Oct;62(4):430-5.

Hirasawa M, Takada K, Otake S. Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res*. 2006;40(3):265-70.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Buzalaf MA, Machado MA. Effects of erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges on human enamel: an *in situ/ex vivo* study. *Caries Res*. 2008 Oct 16;42(6):454-9.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Delbem AC, Buzalaf MA, et al. Cross-sectional microhardness of human enamel subjected to erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges. *Caries Res*. 2010 Jan 15; 44(1):29-32.

Hopkins SA. Bacteria and dental caries. (Preliminary report). *J Boston Soc Med Sci*. 1899 Jun 20;3(12):335-9.

Izuora K, Twombly JG, Whitford GM, Demertzis J, Pacifici R, Whyte MP. Skeletal fluorosis from brewed tea. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Aug;96(8):2318-24.

Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Santos; 1995.

Karlinsey RL, Mackey AC, Walker TJ, Frederick KE, Blanken DD, Flaig SM, et al. *In vitro* remineralization of human and bovine white-spot enamel lesions by NaF dentifrices: A pilot study. *J Dent Oral Hyg*. 2011 Feb;3(2):22-9.

Koulourides T, Feagin F, Pigman W. Remineralization of dental enamel by saliva *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci*. 1965 Sep 30;131(2):751-7.

Knutson JW, Wallace DA. The effect of topically applied sodium fluoride on dental caries experience. *Public Health Rep*. 1943 Nov;58(47):1701-15.

Kramer PF, Chaffee BW, Bertelli AE, Ferreira SH, Béria JU, Feldens CA. Gains in children's dental health differ by socioeconomic position: evidence of widening inequalities in southern Brazil. *Int J Paediatr Dent*. 2014 Oct 17. doi: 10.1111/ipd.12140.

Kumar VL, Itthagarun A, King NM. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Aust Dent J*. 2008 Mar;53(1):34-40.

Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(3-4):251-9.

Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. *Caries Res*. 2001 Jan-Feb;35(1):57-60.

Lata S, Varghese NO, Varughese JM. Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *J Conserv Dent* 2010 Jan;13(1):42-6.

Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ERS. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*. 2006;25(2):239-52.

Lima JD, Mazzafera P, Moraes WS, Silva RB. Tea: aspects related to the quality and prospects. *Ciência Rural*. 2009 Jul;39(4):1270-78.

Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Zago R, Colciago M, Messina G, et al. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In vivo*. 2009 Jan-Feb;23:171-5.

Lu Y, Guo WF, Yang XQ. Fluoride content in tea and its relationship with tea quality. *J Agric Food Chem*. 2004 Jun 12;52(14):4472-6.

Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res*. 2009 Dec 10;43(6):474-83.

Mainjot AK, Douillard T, Gremillard L, Sadoun MJ, Chevalier J. 3D-characterization of the veneer–zirconia interface using FIB nanotomography. *Dent Mater*. 2013 Feb;29(2):157-65.

Malinowska E, Inkielewicz I, Czarnowski W, Szefer P. Assessment of fluoride concentration and daily intake by human from tea and herbal infusions. *Food Chem Toxicol*. 2008 Mar;46(3):1055-61.

Marchi ECS, Castro DM. Revisão de Microscopia. Ministério da Educação e do Desporto. Universidade Federal de Lavras. Departamento de Agricultura; 2005.

Martins JM. Uso da babosa (*Aloe vera*) na reparação de feridas abertas provocadas cirurgicamente em cães [monografia]. Patos (PB): Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande; 2010.

Meharry MR, Dawson D, Wefel JS, Harless JD, Kummert CM, Xiao X. The effect of surface defects in early caries assessment using quantitative light-induced fluorescence (QLF) and micro-digital-photography (MDP). *J Dent*. 2012 Nov;40(11):955-61.

Mirkarimi M, Toomarian L. Effect of green tea extract on the treatment of dentin erosion: an in vitro study. *J Dent (Tehran)*. 2012 Oct;9(4):224-8.

Moi GP, Tenuta LM, Cury JA. Anticaries potential of a fluoride mouthrinse evaluated in vitro by validated protocols. *Braz Dent J*. 2008;19(2):91-6.

Mummery SP. Some experiments on the relative susceptibility of different teeth to dental caries. *Proc R Soc Med*. 1910;3(Odontol Sect):71-84.

Neckel IT. Crescimento e morfologia de ligas de Co₂Fe_{100-x} eletrodepositadas sobre Si(111) tipo-n [dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2009.

Nishio C. Formação do esmalte dentário, novas descobertas, novos horizontes. R Dental Press Ortodon Ortop Facial. 2008 Jul-Aug;13(4):17-18.

Oliveira SMA, Torres TC, Pereira SLS, Mota OML, Carlos MX. Effect of a dentifrice containing *Aloe vera* on plaque and gingivitis control. A double-blind clinical study in humans. J Appl Oral Sci. 2008 Jul-Aug;16(4):293-6.

Paradella TC. Aderência de *Streptococcus mutans* em materiais restauradores e seus efeitos em cárie secundária *in vitro* e *in situ* avaliados por microscopia de luz polarizada e espectroscopia por dispersão de raios-x (EDS) [tese]. São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2008.

Reto M, Figueira ME, Filipe HM, Almeida CM. Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. Plant Foods Hum Nutr. 2007 Dec;62(4):139-44.

Rocha RSF. Estudo de propriedades físico-químicas de resinas odontológicas: grau de conversão, dureza e expansão térmica [dissertação]. Ilha Solteira (SP): Faculdade de Engenharia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2006.

Rodrigues LK, Cury JA, Nobre dos Santos M. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization *in vitro*. J Oral Sci. 2004 Dec;46(4):215-20.

Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. Acta Med Acad. 2013 Nov;42(2):179-88.

Sano H, Nakashima S, Songpaisan Y, Phantumvanit P. Effect of a xylitol and fluoride containing toothpaste on the remineralization of human enamel *in vitro*. J Oral Sci. 2007 Mar;49(1):67-73.

Silverstone LM. Remineralization of human enamel *in vitro*. Proc R Soc Med. 1972 Oct;65(10):906-8.

Silverstone LM. Remineralization phenomena. *Caries Res.* 1977;11 Suppl 1:59-84.

Silverstone LM, Wefel JS, Zimmerman BF, Clarkson BH, Featherstone MJ. Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel *in vitro*. Effect of calcium concentration of the calcifying fluid. *Caries Res.* 1981;15(2):138-57.

Silverstone LM. The effect of fluoride in the remineralization of enamel caries and caries-like lesions *in vitro*. *J Public Health Dent.* 1982 Winter;42(1):42-53.

Soares LA. Propriedades analíticas e eletroanalíticas de um silsesquioxano nanoestruturado organofuncionalizado [dissertação]. Ilha Solteira (SP): Faculdade de Engenharia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

Soprano V. Estudo de parâmetros para ensaios de microdureza em amálgama de prata, resina composta, dentina e esmalte bovinos [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Odontologia, USP – Universidade de São Paulo; 2007.

Souchois MWM, Delbem ACB, Vieira R de S. Effect of time in hardness test on artificially demineralized human dental enamel. *Braz J Oral Sci.* 2008 Jan-Mar;7(24):1507-11.

Souchois MWM, Vieira R de S. Assesment of artificial caries lesions through scanning electron microscopy and cross-sectional microhardness test. *Indian J Dent Res.* 2013 Mar-Apr;24(2):249-54.

Stewart A. Why dental caries is so general, and how to prevent it. *Br Med J.* 1877 Oct 20;2(877):560-2.

Suga US, Terada RS, Ubaldini AL, Fujimaki M, Pascotto RC, Batilana AP, et al. Factors that drive dentists towards or away from dental caries preventive measures: systematic review and metasummary. *PLoS One.* 2014 Oct;9(10):e107831.

ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res.* 1982;16(3):201-10.

ten Cate JM, Duijsters PPE. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. *Caries Res.* 1983;17(3):193-9.

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

Torres CR, Rosa PC, Ferreira NS, Borges AB. Effect of caries infiltration technique and fluoride therapy on microhardness of enamel carious lesions. *Oper Dent.* 2012 Jul-Aug;37(4):363-9.

Wefel JS, Harless JD. Comparison of artificial white spots by microradiography and polarized light microscopy. *J Dent Res.* 1984 Nov;63(11):1271-5.

APÊNDICE A - Valores de microdureza da superfície

Quadro 1- Valores iniciais de microdureza da superfície (KHN₁) obtidos dos espécimes hígidos

(continua)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
1	250	262,49	265,1	259,19
2	378,73	341,4	257,39	325,84
3	369,93	326,56	302,82	333,10
4	333,86	387,86	357,28	359,66
5	287,41	349,21	330,18	322,26
6	392,55	402,18	383,26	392,66
7	252,44	242,96	275,92	257,10
8	357,28	412,17	422,54	397,33
9	219,48	247,64	219,48	228,86
10	319,5	353,21	278,72	317,14
11	319,5	422,54	312,67	351,57
12	337,6	433,3	438,84	403,24
13	361,42	387,86	374,29	374,52
14	326,56	302,82	330,18	319,85
15	427,87	474,41	487,23	463,17
16	427,87	402,18	417,31	415,78
17	365,64	357,28	397,32	373,41
18	330,18	326,56	361,42	339,38
19	422,54	422,54	392,55	412,54
20	387,86	312,67	319,5	340,01
21	326,56	330,18	323	326,58
22	337,6	383,26	349,21	356,69
23	422,54	427,87	392,55	414,32
24	365,64	341,4	417,31	374,78
25	487,23	450,24	427,87	455,11
26	245,28	257,39	225,54	242,73
27	361,42	349,21	345,27	351,96
28	349,21	312,67	306,05	322,64
29	433,3	361,42	412,17	402,29
30	369,93	365,64	365,64	367,07

Parâmetros adotados: (Carga: 25gf; *Dwell time*: 10s; Distância: 0,1mm/100µm)

Quadro 1- Valores iniciais de microdureza da superfície (KHN₁) obtidos dos espécimes hígidos

(continuação)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
31	387,86	383,26	284,47	351,86
32	361,42	365,64	349,21	358,75
33	375,28	422,54	392,55	373,01
34	387,86	407,13	374,29	389,76
35	323	353,21	392,55	356,25
36	330,18	275,92	275,92	294,00
37	392,55	407,13	427,87	409,18
38	369,93	357,28	349,21	358,80
39	383,26	383,26	357,28	374,6
40	361,42	319,5	374,29	351,73
41	397,32	383,26	422,54	401,04
42	361,42	374,29	387,86	374,52
43	319,5	281,58	265,1	288,72
44	302,82	357,28	407,13	355,74
45	397,32	262,49	407,13	355,64
46	374,29	365,64	319,5	353,14
47	353,21	402,18	392,55	382,64
48	326,56	397,32	378,73	367,53
49	378,73	383,26	374,29	378,76
50	387,86	345,27	392,55	375,22
51	319,5	337,6	456,11	371,07
52	326,56	309,33	238,42	291,43
53	365,64	374,29	412,17	384,03
54	296,51	309,33	337,6	314,48
55	299,64	259,92	259,92	273,16
56	365,64	378,73	361,42	368,59
57	361,42	357,28	345,27	354,65
58	412,17	365,64	369,93	382,58
59	333,86	374,29	369,93	359,36
60	333,86	250,02	387,86	323,91
61	407,13	353,21	374,29	378,21

Parâmetros adotados: (Carga: 25gf; *Dwell time*: 10s; Distância: 0,1mm/100µm)

Quadro 1-Valores iniciais de microdureza da superfície (KHN₁) obtidos dos espécimes hígidos

(conclusão)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
62	392,55	365,64	223,49	327,22
63	302,82	270,42	275,92	283,05
64	387,86	374,29	422,54	394,89
65	284,47	326,56	392,55	334,52
66	374,29	392,55	402,18	389,67
67	493,84	427,87	407,13	442,94
68	412,17	397,32	387,86	399,11
69	402,18	402,18	299,64	368
70	357,28	357,28	450,24	388,26
71	330,18	341,4	293,43	321,67
72	422,54	456,11	412,17	430,27
73	462,09	474,41	528,97	488,49
74	487,23	514,48	438,84	480,18
75	374,29	349,21	383,26	368,92
76	433,3	402,18	433,3	422,92
77	402,18	374,29	349,21	375,22
78	365,64	361,42	365,64	364,23
79	353,21	369,93	402,18	375,10
80	323	383,26	392,55	366,27
81	378,73	374,29	387,86	380,29
82	365,64	349,21	337,6	350,81
83	357,28	365,64	397,32	373,41
84	369,93	319,5	316,06	335,16
85	383,26	374,29	383,26	380,27
86	337,6	323	333,86	331,48
87	383,26	407,13	365,64	385,34
88	392,55	397,32	387,86	392,57
89	374,29	349,21	422,54	382,01
90	402,18	152,88	374,29	309,78

Parâmetros adotados: (Carga: 25gf; *Dwell time*: 10s; Distância: 0,1mm/100µm)

Quadro 2- Distribuição estratificada dos espécimes em grupos

	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
Número dos espécimes	9	26	63	7	1	55
	10	54	90	36	52	43
	14	82	71	5	28	60
	3	86	11	62	21	2
	65	84	77	61	18	20
	57	46	27	31	40	64
	45	44	35	22	32	38
	80	69	78	89	4	59
	30	48	56	75	51	33
	24	39	42	13	83	17
	79	50	49	85	81	58
	34	66	70	87	53	47
	88	6	8	68	41	29
	76	16	23	19	37	12
	72	67	25	15	74	73

Descrição do método de distribuição estratificada pelo programa Microsoft Office Excel 2007:

1. Organizar duas colunas: uma com o número dos espécimes e outra com o valor de microdureza dureza de cada um;
2. Selecionar as duas colunas;
3. Ativar o botão “classificar”. Classificar – personalizar classificação (dureza; do menor para o maior / crescente). O programa fará a classificação crescente da dureza.

Quadro 3- Valores de microdureza da superfície após a formação da lesão de cárie artificial (KHN₂) (exceto GH)

(continua)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
1	51,2	53,27	50,06	51,51
2	35,73	30,12	31,95	32,60
4	37,21	23,84	19,26	26,77
5	51,45	55,99	62,55	56,66
6	83,97	67,6	81,79	77,78
7	32,3	39,73	37,43	36,48
8	158,93	136,56	126,42	140,63
11	100,98	76,39	77,03	84,80
12	38,55	41,99	49,05	43,19
13	75,12	96,27	93,6	88,33
15	65,51	45,32	58,06	56,29
16	40,46	28,74	25,99	31,73
17	76,39	83,23	75,75	78,45
18	48,08	22,97	35,93	35,66
19	62,08	74,5	75,12	70,56
20	39,73	48,4	34,72	40,95
21	16,9	15,46	17,1	16,48
22	31,1	38,55	31,44	33,69
23	58,06	76,39	79,02	71,15
25	43,33	37,87	41,22	40,80
26	85,47	69,23	66,02	73,57
27	16,13	23,95	25,49	21,85
28	44,16	38,33	36,56	39,68
29	51,8	66,54	48,72	55,68
31	29,04	55,59	21,56	35,39
32	40,71	44,16	25,37	36,74
33	31,78	26,12	20,72	26,20
35	61,15	39,25	35,93	45,44
36	68,13	79,02	99,05	82,06
37	57,63	66,54	58,92	61,03
38	34,92	46,51	30,93	37,45

Parâmetros adotados: (Carga: 10gf; *Dwell time*: 10s; Distância: 0,1mm/100µm)

Quadro 3-Valores de microdureza da superfície após a formação da lesão de cárie artificial (KHN₂) (exceto GH)

(continuação)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
39	41,99	43,06	51,1	45,38
40	18,75	17,17	17,17	17,69
41	41,47	64,5	65	56,99
42	15,46	15,4	23,84	18,23
43	24,88	27,18	30,28	27,44
44	151,49	113,79	62,55	109,27
46	112,63	97,19	81,09	96,97
47	72,08	46,21	46,21	54,83
48	56,8	59,35	54,02	56,72
49	46,21	44,16	43,33	44,56
50	58,48	153,3	133,54	115,10
51	20,63	22,05	27,04	23,24
52	19,02	14,57	16,83	16,80
53	45,91	40,46	49,05	45,14
54	100,01	57,63	92,74	83,46
55	39,49	26,64	31,95	32,69
56	57,21	60,69	51,8	56,56
58	27,45	26,64	28,45	27,51
59	55,99	52,17	81,79	63,31
60	45,32	53,27	40,46	46,35
61	57,21	67,6	54,41	59,74
62	27,59	43,33	42,52	37,81
63	66,02	93,6	100,01	86,54
64	24,41	38,1	27,59	30,03
66	31,78	37,43	76,39	48,53
67	53,65	64,01	54,8	57,48
68	44,45	51,8	48,08	48,11
69	66,02	146,25	130,62	114,29
70	35,73	45,61	45,02	42,12
71	15,82	14,23	16,09	15,38

Parâmetros adotados: (Carga: 10gf; *Dwell time*: 10s; Distância: 0,1mm/100µm)

Quadro 3- Valores de microdureza da superfície após a formação da lesão de cárie artificial (KHN₂) (exceto GH)

(conclusão)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
73	35,12	61,61	48,4	48,37
74	10,4	15,51	11,3	12,40
75	13,75	11,98	11	12,24
77	67,07	60,24	36,14	54,48
78	12,77	22,76	37,21	24,24
81	20,27	14,46	13,51	16,08
82	40,96	110,37	28,3	59,87
83	45,61	32,3	50,4	42,77
84	16,06	15,12	15,46	15,54
85	37,87	27,31	35,93	33,70
86	31,61	30,28	27,87	29,92
87	34,92	40,71	28,3	34,64
89	10,83	16,86	12,95	13,54
90	12,10	16,31	19,59	16

Parâmetros adotados: (Carga: 10gf; *Dwell time*: 10s; Distância: 0,1mm/100µm)

Quadro 4- Distribuição estratificada dos espécimes em grupos após a formação da lesão de cárie artificial

	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
Número dos espécimes	9	1	2	4	5	6
	10	13	12	11	8	7
	14	15	16	17	18	19
	3	25	23	22	21	20
	65	26	27	28	29	31
	57	37	36	35	33	32
	45	38	39	40	41	42
	80	48	47	46	44	43
	30	49	50	51	52	53
	24	59	58	56	55	54
	79	60	61	62	63	64
	34	70	69	68	67	66
	88	71	73	74	75	77
	76	84	83	82	81	78
	72	85	86	87	89	90

O grupo H não foi submetido à formação de lesão de cárie.

Quadro 5- Divisão dos espécimes de cada grupo em três etapas para a realização dos tratamentos

Grupos	Etapas		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a
1	3, 9, 10, 14, 65	24, 30, 45, 57, 80	34, 72, 76, 79, 88
2	1, 13, 15, 25, 26	37, 38, 48, 49, 59	60, 70, 71, 84, 85
3	2, 12, 16, 23, 27	36, 39, 47, 50, 58	61, 69, 73, 83, 86
4	4, 11, 17, 22, 28	35, 40, 46, 51, 56	62, 68, 74, 82, 87
5	5, 8, 18, 21, 29	33, 41, 44, 52, 55	63, 67, 75, 81, 89
6	6, 7, 19, 20, 31	32, 42, 43, 53, 54	64, 66, 77, 78, 90

Os espécimes foram distribuídos em três etapas para a distribuição do erro.

Abaixo estão apresentados os valores de microdureza da superfície após a realização dos tratamentos durante 30 dias (KHN_3) (Parâmetros adotados: Carga: 10gf; *Dwell time*: 10s; Distância: 0,1mm/100 μm).

Quadro 6- Espécimes do grupo H: Esmalte hígido e saliva artificial (controle negativo)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
3	387,86	412,17	378,73	392,92
9	229,71	284,47	240,68	251,62
10	287,41	337,6	349,21	324,74
14	316,06	323	369,93	336,33
65	296,51	349,21	290,4	312,04
24	362,79	338,10	401,43	367,44
30	371,91	367,02	373,03	370,65
45	389,42	260,42	381,28	343,70
57	358,05	361,30	341,02	353,46
80	328,23	381,71	387,07	365,67
34	295,53	227,20	244,60	255,78
72	230,53	281,40	208,66	240,20
76	268,26	300,47	295,53	288,09
79	281,40	260,01	248,32	263,24
88	300,47	295,53	276,92	290,97
Média	313,61	318,64	319,12	317,12

Quadro 7- Espécimes do grupo S: Esmalte cariado e saliva artificial (controle positivo)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
1	17,38	20,18	23,95	20,50
13	87,79	73,88	75,75	79,14
15	59,79	73,27	79,02	70,69
25	11,51	27,31	22,55	20,45
26	70,92	49,72	44,73	55,12
37	49,05	44,73	41,22	45
38	19,59	27,04	22,05	22,89
48	35,73	37,65	39,49	37,62
49	49,72	50,4	50,75	50,29
59	48,08	36,56	33,39	39,34
60	63,03	61,61	58,48	61,04
70	78,35	68,13	70,35	72,28
71	31,44	39,25	34,72	35,14
84	21,27	19,59	18,09	19,65
85	34,53	33,02	42,79	36,78
Média	45,21	44,16	43,82	44,40

Quadro 8- Espécimes do grupo A: Esmalte cariado e água deionizada

(continua)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
2	Erosão	Erosão	Erosão	0
12	Erosão	Erosão	Erosão	0
16	16,13	12,1	10,76	12,99
23	12,69	12,51	14,67	13,29
27	Erosão	Erosão	Erosão	0
36	33,57	28,16	29,81	30,51
39	22,55	21,08	27,59	23,74
47	Erosão	Erosão	Erosão	0

Quadro 8- Espécimes do grupo A: Esmalte cariado e água deionizada

(conclusão)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
50	43,06	41,47	24,18	36,23
58	40,87	34,15	42,28	39,1
61	16,83	18,86	15,70	17,13
69	42,25	59,35	56,39	52,66
73	52,17	43,88	37,43	44,49
83	26,12	28,16	26,12	26,8
86	35,73	50,40	40,96	42,36
Média	22,80	23,34	21,73	22,62

Os espécimes com erosão foram considerados como zero no cálculo da média.

Quadro 9- Espécimes do grupo F: Esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
4	73,27	73,88	66,54	71,23
11	95,37	85,47	108,17	96,33
17	84,71	72,08	82,51	79,76
22	73,27	42,79	66,02	60,69
28	27,87	20,36	25,49	24,57
35	42,79	45,02	41,73	43,18
40	29,50	33,95	38,21	33,89
46	29,96	40,96	40,71	37,21
51	54,80	55,59	53,65	54,68
56	98,11	116,16	92,74	102,34
62	73,27	69,79	73,88	72,31
68	44,16	40,96	49,05	44,72
74	62,08	93,60	83,23	79,64
82	160,87	147,97	110,37	139,74
87	157,02	162,85	146,25	155,37
Média	73,80	73,43	71,90	73,04

Quadro 10- Espécimes do grupo C: Esmalte cariado e tintura de *Camellia sinensis*

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
5	70,35	72,08	75,75	72,72
8	69,23	73,27	78,35	73,61
18	54,02	43,33	58,48	51,94
21	51,45	86,23	64,01	67,23
29	82,51	69,79	54,02	68,77
33	48,40	45,91	48,08	47,46
41	55,99	58,06	51,80	55,28
44	59,79	66,54	69,23	65,19
52	48,72	49,05	51,20	49,66
55	75,75	40,71	72,68	63,05
63	65,00	54,80	57,21	59
67	67,07	66,02	54,80	62,63
75	62,08	62,55	58,06	60,90
81	46,21	49,05	45,32	46,86
89	54,41	61,61	52,90	56,31
Média	60,73	59,93	59,46	60,04

Quadro 11- Espécimes do grupo B. Esmalte cariado e tintura de *Aloe arborescens*

(continua)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
6	84,71	121,13	103,97	103,27
7	83,97	74,5	66,54	75,00
19	54,8	61,15	65,51	60,48
20	67,07	72,68	79,02	72,92
31	32,3	56,39	81,79	56,82
32	58,66	62,95	63,78	61,80
42	56,32	65,99	55,12	59,14
43	58,73	57,5	67,55	61,26
53	57,44	65,1	57,2	59,91
54	61,43	64,16	76,39	67,33

Quadro 11- Espécimes do grupo B. Esmalte cariado e tintura de *Aloe Arborescens*

(conclusão)

Valores de Microdureza				
Espécime	1	2	3	Média
64	79,7	73,27	52,9	68,62
66	55,99	59,35	56,8	57,38
77	79,7	73,27	52,9	68,62
78	147,97	155,14	129,2	144,10
90	52,17	54,02	53,65	53,28
Média	68,73	74,44	70,82	71,33

APÊNDICE B - Valores de microdureza em secção transversa

Abaixo estão apresentados os valores e as médias de microdureza em secção transversa (KHN_D) de cada espécime de todos os grupos estudados. Para todos os espécimes medidos foi adotado o seguinte parâmetro: Carga: 10 gf; *Dwell time*: 10 s e Distância: 0,015 mm/15 μ m

Quadro 12- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 3, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 3 Profundidade (μ m)	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
	1	2	3	Média
Superfície	407	351,17	415,88	391,35
10	432	321,55	392,88	382,14
20	400,04	500,27	469,49	456,60
30	351,17	377,92	441,46	390,18
40	327,17	233,93	479,42	346,84
50	459,86	424,15	441,46	441,82
60	432,68	351,17	285,99	356,61
70	459,86	166,92	441,46	356,08
80	357,59	338,85	407,84	368,09
90	295,53	272,54	295,53	287,86
100	305,06	289,15	311	301,73

Quadro 13- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 9, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 9	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	211,59	285,53	276,92	258,01
10	370,95	327,17	260,01	319,37
20	351,17	321,55	327,17	333,29
30	338,85	338,85	332,93	336,87
40	321,55	214,58	192,30	242,81
50	260,01	281,40	285,99	275,80
60	223,94	400,04	268,26	297,41
70	364,18	244,60	364,18	324,32
80	272,54	173,32	285,99	243,95
90	310,74	392,45	237,41	313,53
100	293,85	301,04	274,28	289,72

Quadro 14- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 10, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 10	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	223,94	184,83	211,59	206,78
10	295,53	357,59	441,46	364,86
20	400,04	351,17	364,18	371,79
30	385,08	392,45	377,92	385,15
40	424,15	344,93	459,86	409,64
50	392,45	407,84	240,97	347,08
60	260,01	424,15	316,08	333,41
70	364,18	321,55	400,04	361,92
80	415,88	332,93	370,95	373,25
90	344,93	432,68	450,52	409,37
100	338,70	402,21	391	377,30

Quadro 15- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 14, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 14	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	192,30	200,23	202,98	198,50
10	357,59	300,47	351,17	336,41
20	316,08	316,08	300,47	310,87
30	268,26	407,84	558,73	411,61
40	272,54	264,09	260,01	265,54
50	316,08	469,49	237,41	340,99
60	344,93	571,65	377,92	431,50
70	351,17	357,59	571,65	426,80
80	272,54	344,93	327,17	314,88
90	332,93	357,59	377,92	356,14
100	400,02	398,15	375,41	391,19

Quadro 16- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 65, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 65	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	194,89	233,93	223,94	217,58
10	157,02	489,68	585,02	410,57
20	364,18	332,93	558,73	418,61
30	169,02	370,95	450,52	330,16
40	351,17	407,84	489,68	416,23
50	415,88	385,08	392,45	397,80
60	357,59	479,42	459,86	432,29
70	316,08	285,99	392,45	331,50
80	385,08	351,17	424,15	386,80
90	392,45	377,92	500,27	423,54
100	357,59	370,95	469,49	399,34

Quadro 17- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 24, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 24	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	321,55	272,54	264,09	286,06
10	338,85	344,93	385,08	356,29
20	377,92	357,59	392,45	375,99
30	370,95	459,86	377,92	402,91
40	469,49	392,45	415,88	425,94
50	511,20	385,08	364,18	420,15
60	469,49	459,86	415,88	448,41
70	432,68	511,20	370,95	438,28
80	415,88	489,68	441,46	449,01
90	400,04	441,46	415,88	419,13
100	489,68	479,42	546,24	505,11

Quadro 18- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 30, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 30	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	118,60	98,11	122,42	113,04
10	227,20	260,01	223,94	237,05
20	310,74	285,99	351,17	315,97
30	370,95	264,09	415,88	350,31
40	305,54	281,40	344,93	310,62
50	310,74	272,54	351,17	311,48
60	338,85	310,74	479,42	376,34
70	300,47	281,40	295,53	292,47
80	252,13	327,17	357,59	312,3
90	332,93	357,59	344,93	345,15
100	300,74	290,70	344,93	312,12

Quadro 19- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 45, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 45	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	338,85	344,93	256,02	313,27
10	344,93	415,88	392,45	384,42
20	281,40	295,53	338,85	305,26
30	223,94	327,17	237,41	262,84
40	321,55	305,54	321,55	316,21
50	244,60	217,63	268,26	243,5
60	272,54	244,60	285,99	267,71
70	237,41	240,97	264,09	247,49
80	338,85	227,20	230,53	265,53
90	400,04	364,18	202,98	322,4
100	338,85	357,59	357,59	351,34

Quadro 20- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 57, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 57	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	441,46	469,49	415,88	442,28
10	558,73	546,24	469,49	524,82
20	400,04	424,15	479,42	434,54
30	424,15	450,52	500,27	458,31
40	432,68	415,88	522,50	457,02
50	500,27	441,46	424,15	455,29
60	558,73	432,68	500,27	497,23
70	469,49	585,02	585,02	546,51
80	522,50	534,17	522,50	526,39
90	628,07	643,49	377,92	549,83
100	479,42	613,21	546,24	546,29

Quadro 21- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 80, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 80	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	321,55	351,17	316,08	329,6
10	407,84	357,59	441,46	402,3
20	500,27	534,17	385,08	473,17
30	479,42	441,46	441,46	454,11
40	441,46	400,04	558,73	466,74
50	400,04	534,17	450,52	461,58
60	459,86	450,52	489,68	466,69
70	489,68	479,42	459,86	476,32
80	407,84	441,46	432,68	427,33
90	450,52	469,49	344,93	421,65
100	469,49	489,68	392,45	450,54

Quadro 22- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 34, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 34	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	281,40	285,99	202,98	256,79
10	305,54	332,93	217,63	285,37
20	310,74	344,93	240,97	298,88
30	316,08	351,17	295,53	320,93
40	327,17	357,59	276,92	320,56
50	316,08	364,18	327,17	335,81
60	332,93	370,95	338,85	347,58
70	338,85	377,92	344,93	353,9
80	344,93	385,08	351,17	360,39
90	351,17	407,84	364,18	374,40
100	357,59	450,52	392,45	400,19

Quadro 23- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 72, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 72	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	200,23	205,79	240,97	215,66
10	220,76	227,20	268,26	238,74
20	223,94	281,40	276,92	260,75
30	240,97	285,99	281,40	269,45
40	256,02	290,70	285,99	277,57
50	281,40	295,53	295,53	290,82
60	290,70	305,54	290,70	295,65
70	300,47	295,53	305,54	300,51
80	295,53	316,08	321,55	311,05
90	310,74	321,55	332,93	321,74
100	295,53	338,85	338,85	324,41

Quadro 24- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 76, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 76	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	290,70	295,53	285,99	290,74
10	338,85	338,85	310,74	329,48
20	344,93	377,92	305,54	342,80
30	357,59	407,84	327,17	364,2
40	364,18	377,92	332,93	358,34
50	370,95	400,04	338,85	369,95
60	415,88	370,95	351,17	379,33
70	424,15	338,85	377,92	380,31
80	441,46	370,95	424,15	412,19
90	432,68	377,92	364,18	391,59
100	415,88	392,45	377,92	395,42

Quadro 25- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 79, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 79	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	281,40	233,93	214,58	243,30
10	290,70	285,99	252,13	276,27
20	310,74	268,26	285,99	288,33
30	316,08	285,99	310,74	304,27
40	321,55	295,53	327,17	314,75
50	327,17	300,47	338,85	322,16
60	332,93	310,74	344,93	329,53
70	351,17	351,17	364,18	355,51
80	357,59	370,95	377,92	368,82
90	407,84	415,88	407,84	410,52
100	392,45	377,92	400,04	390,14

Quadro 26- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 88, grupo H: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 88	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	220,76	192,30	194,89	202,65
10	252,13	197,53	200,23	216,63
20	264,09	248,32	214,58	242,33
30	281,40	256,02	230,53	255,98
40	300,47	268,26	244,60	271,11
50	305,54	272,54	248,32	275,47
60	316,08	276,92	260,01	284,34
70	321,55	281,40	272,54	291,83
80	338,85	300,47	300,47	313,26
90	351,17	321,55	316,08	329,6
100	344,93	338,85	321,55	335,11

Quadro 27- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 1, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 1	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	260,31	149,22	138	182,51
10	166,92	59,35	177,79	134,68
20	316,08	385,08	200,23	300,46
30	351,17	332,93	364,18	349,42
40	211,59	281,40	377,92	290,30
50	338,85	344,93	295,53	326,43
60	332,93	370,95	321,55	341,81
70	237,41	310,74	370,95	306,36
80	268,26	392,45	377,92	346,21
90	300,47	450,52	310,74	353,91
100	321,41	407,23	331,59	353,41

Quadro 28- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 13, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 13	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	338,19	221,63	210,39	256,73
10	123,73	123,73	71,50	106,32
20	351,17	300,47	344,93	332,19
30	370,95	400,04	316,08	362,35
40	432,68	357,59	357,59	382,62
50	479,42	233,93	424,15	379,16
60	578,02	500,27	344,93	474,40
70	558,73	424,15	598,86	527,24
80	344,93	377,92	522,50	415,11
90	415,88	571,65	558,24	515,25
100	409,75	487,02	519,73	472,16

Quadro 29- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 15, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 15	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	25,85	18,32	25,47	23,21
10	10,73	10,63	10,76	10,70
20	73,88	57,21	85,47	72,18
30	117,37	121,13	211,59	150,03
40	149,72	233,93	200,23	194,62
50	164,87	223,94	227,20	205,33
60	182,44	180,10	217,63	193,39
70	155,14	194,89	276,92	208,98
80	164,87	189,76	208,66	187,76
90	175,54	141,28	276,92	197,91
100	180,72	189,76	256,02	208,83

Quadro 30- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 25, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 25	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	77,03	70,35	54,41	67,26
10	56,39	35,52	36,78	42,89
20	70,35	35,73	41,73	49,27
30	77,69	85,47	121,13	94,76
40	192,30	123,73	127,80	147,94
50	268,26	208,66	281,40	252,77
60	295,53	321,55	432,68	349,92
70	357,59	415,88	489,68	421,05
80	432,68	392,45	441,46	422,19
90	459,86	364,18	571,65	465,23
100	413,21	400,04	477,01	430,08

Quadro 31- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 26, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 26	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	46,82	53,27	39,97	46,68
10	35,52	50,40	32,12	39,34
20	29,04	50,06	30,77	36,62
30	92,74	121,13	64,50	92,79
40	157,02	205,79	192,30	185,03
50	264,09	230,53	158,93	217,85
60	285,99	244,60	197,53	242,70
70	295,53	202,98	223,94	240,81
80	310,74	344,93	276,92	310,86
90	351,17	252,13	214,58	272,62
100	382,01	290,70	233,70	302,13

Quadro 32- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 37, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 37	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	41,22	41,99	39,73	40,98
10	16,31	23,84	19,26	19,80
20	16,90	28,59	70,35	38,61
30	77,03	103,97	95,37	92,12
40	177,79	285,99	260,01	241,26
50	220,76	321,55	364,18	302,16
60	300,47	305,54	321,55	309,19
70	260,01	377,92	344,93	327,62
80	392,45	400,04	511,20	434,56
90	370,95	256,02	489,68	372,22
100	295,53	415,88	511,20	407,54

Quadro 33- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 38, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 38	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	43,33	46,21	41,47	43,67
10	15,23	32,12	32,30	26,55
20	80,39	69,79	110,37	86,85
30	227,20	268,26	248,32	247,93
40	276,92	260,01	305,54	280,82
50	227,20	300,47	377,92	301,86
60	285,99	285,99	264,09	278,69
70	300,47	327,17	285,99	304,54
80	310,74	338,85	295,53	315,04
90	272,54	332,93	332,93	312,80
100	264,09	364,18	327,17	318,48

Quadro 34- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 48, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 48	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	53,65	51,80	50,40	51,95
10	23,18	28,01	32,12	27,77
20	36,99	91,04	133,54	87,19
30	135,04	192,30	230,53	185,96
40	268,26	252,13	260,01	260,13
50	295,53	332,93	205,79	278,083
60	344,93	357,59	240,97	314,50
70	300,47	400,04	264,09	321,53
80	248,32	338,85	305,54	297,57
90	272,54	407,84	281,40	320,59
100	295,53	316,08	264,09	291,90

Quadro 35- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 49, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 49	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	79,70	49,72	40,96	56,79
10	37,65	40,46	30,60	36,24
20	41,99	97,19	77,69	72,29
30	132,07	175,54	182,44	163,35
40	202,98	256,02	220,76	226,59
50	214,58	244,60	240,97	233,38
60	227,20	268,26	300,47	265,31
70	305,54	240,97	237,41	261,31
80	327,17	264,09	256,02	282,43
90	357,59	370,95	370,95	366,50
100	377,92	260,01	357,59	331,84

Quadro 36- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 59, grupo S: esmalte cariado e saliva artificial

Espécime 59	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	65	57,21	58,92	60,38
10	39,73	27,59	44,73	37,35
20	49,38	81,79	192,30	107,82
30	233,93	142,91	230,53	202,46
40	217,63	310,74	237,41	255,26
50	184,83	276,92	217,63	226,46
60	160,87	332,93	197,53	230,44
70	149,72	310,74	276,92	245,79
80	160,87	370,95	248,32	260,05
90	146,25	305,54	223,94	225,24
100	227,20	357,59	217,63	267,47

Quadro 37- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 60, grupo S: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 60	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	48,08	44,16	51,45	47,90
10	11,90	14,84	24,41	17,05
20	31,44	25,49	41,99	32,97
30	68,13	41,47	60,69	56,76
40	139,68	91,04	173,32	134,68
50	248,32	248,32	316,08	270,91
60	338,85	344,93	327,17	336,98
70	344,93	351,17	370,95	355,68
80	385,08	364,18	489,68	412,98
90	344,93	327,17	450,52	374,21
100	479,42	441,46	459,86	460,25

Quadro 38- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 70, grupo S: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 70	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	49,05	46,31	39,49	44,95
10	22,76	18,94	21,65	21,12
20	23,84	22,35	36,99	27,73
30	192,30	149,72	61,15	134,39
40	272,54	244,60	276,92	264,69
50	290,70	268,26	300,47	286,48
60	305,54	290,70	316,08	304,11
70	316,08	310,70	332,93	319,90
80	321,55	321,55	344,93	329,34
90	321,55	332,93	364,18	339,55
100	385,08	364,18	370,95	373,40

Quadro 39- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 71, grupo S: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 71	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	40,46	37,43	45,32	41,07
10	22,97	15,46	18,55	18,99
20	13,13	12,56	13,36	13,02
30	14,89	22,25	11,15	16,10
40	32,12	30,44	16,38	26,31
50	160,87	187,27	35,73	127,96
60	205,79	202,98	117,37	175,38
70	211,59	217,63	171,15	200,12
80	276,92	244,60	260,01	260,51
90	327,17	237,41	276,92	280,5
100	321,55	295,53	272,54	296,54

Quadro 40- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 84, grupo S: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 84	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	49,05	45,02	51,10	48,39
10	21,95	14	13,32	16,42
20	23,95	26,77	24,88	25,2
30	60,69	43,33	36,78	46,93
40	82,51	92,74	100,01	91,75
50	202,98	187,27	144,57	178,27
60	281,40	230,53	272,54	261,49
70	285,99	260,01	276,92	274,31
80	240,97	285,99	290,70	272,55
90	295,53	256,02	290,70	280,75
100	332,93	252,13	244,60	276,55

Quadro 41- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 85, grupo S: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 85	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	44,45	45,02	45,91	45,13
10	23,40	21,37	28,59	24,45
20	26,64	27,87	30,93	28,48
30	34,72	34,33	56,80	41,95
40	62,55	72,08	81,79	72,14
50	285,99	295,53	220,76	267,43
60	321,55	310,74	327,17	319,82
70	344,93	321,55	344,93	337,14
80	357,59	364,18	357,59	359,79
90	351,17	370,95	377,92	366,68
100	377,92	407,84	385,08	390,28

Quadro 42- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 2, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 2	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	10,63	10,63	12,82	11,36
10	10,94	11,23	15,18	12,45
20	11,9	11,15	13,09	12,04
30	12,26	12,02	18,55	14,27
40	32,3	30,12	26,25	29,55
50	141,28	87,79	132,07	120,38
60	208,66	248,32	260,01	238,99
70	149,72	281,4	244,6	225,24
80	111,49	338,85	264,09	238,14
90	200,23	200,23	300,47	233,64
100	198,74	211,05	297,58	235,79

Espécime que sofreu erosão na superfície.

Quadro 43- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 12, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 12	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	10,24	10,63	10,63	10,50
10	10,63	10,63	10,63	10,63
20	10,63	11,15	10,63	10,80
30	11,67	15,64	13,27	13,52
40	27,31	91,89	50,75	56,65
50	189,76	230,53	160,87	193,72
60	240,97	534,17	281,40	352,18
70	479,42	585,02	377,92	480,78
80	534,17	585,02	424,15	514,44
90	507,22	522,96	499,73	509,97
100	523,31	573,63	511,37	536,10

Espécime que sofreu erosão na superfície.

Quadro 44- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 16, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 16	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	377,92	285,99	268,26	310,72
10	43,88	60,69	33,20	45,92
20	177,79	175,54	200,23	184,52
30	344,93	321,55	321,55	329,34
40	305,54	338,85	305,54	316,64
50	469,49	285,99	281,40	345,62
60	370,95	316,08	321,55	336,19
70	415,88	316,08	276,92	336,29
80	264,09	281,40	316,08	287,19
90	281,40	281,40	310,74	291,18
100	310,74	344,93	370,95	342,20

Quadro 45- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 23, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 23	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	127,80	276,92	305,54	236,75
10	56,80	93,60	122,42	90,94
20	62,55	144,57	155,14	120,75
30	122,42	169,02	197,53	162,99
40	164,87	194,89	223,94	194,56
50	256,02	211,59	237,41	235,00
60	272,54	227,20	240,97	246,90
70	285,99	252,13	264,09	267,40
80	290,70	272,54	281,40	281,54
90	300,47	310,74	327,17	312,79
100	313,21	327,08	315,29	318,52

Quadro 46- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 27, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 27	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	10,83	11,18	11,98	11,33
10	11,90	12,02	13,18	12,36
20	11,55	12,69	12,30	12,18
30	15,17	15,17	16,97	15,77
40	39,02	33,39	29,65	34,02
50	84,71	149,72	79,02	104,48
60	202,98	248,32	162,85	204,71
70	177,79	295,53	200,23	224,51
80	248,32	327,17	217,63	264,37
90	305,54	351,17	220,76	292,49
100	322,73	347,98	299,05	323,25

Espécime que sofreu erosão na superfície.

Quadro 47- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 36, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 36	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	29,04	27,04	29,50	28,53
10	15	12,51	15,23	14,25
20	10,63	10,83	10,84	10,77
30	18,47	10,52	16,31	15,1
40	19,50	18,32	20,63	19,48
50	35,93	78,35	45,91	53,40
60	95,37	122,42	113,79	110,53
70	268,26	230,53	200,23	233,01
80	332,93	237,41	248,32	272,89
90	344,93	217,63	264,09	275,55
100	377,92	276,92	290,70	315,18

Quadro 48- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 39, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 39	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	22,55	54,41	31,61	36,19
10	19,59	30,58	19,85	23,34
20	237,41	214,58	105	185,66
30	290,70	310,74	169,02	256,82
40	321,55	338,85	194,89	285,10
50	310,74	332,93	233,93	292,53
60	316,08	344,93	276,92	312,64
70	332,93	357,59	248,32	312,95
80	364,18	385,08	332,93	360,73
90	310,74	370,95	300,47	327,39
100	450,52	407,84	276,92	378,43

Quadro 49- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 47, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 47	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	18,02	11,14	15,13	14,76
10	24,53	19,83	27,64	24
20	28,01	22,17	31,26	27,15
30	182,44	98,75	105,21	128,80
40	305,54	282,37	298,73	295,55
50	332,93	304,12	345,22	327,42
60	338,85	328,01	338,85	335,24
70	223,94	315,07	304,12	281,04
80	252,13	299,64	279,27	277,01
90	248,32	300,02	315,07	287,80
100	295,53	313,42	324,15	311,03

Espécime que sofreu erosão na superfície.

Quadro 50- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 50, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 50	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	24,41	28,45	26,25	26,37
10	19,67	16,25	20,01	18,64
20	44,16	19,10	34,33	32,53
30	93,60	21,75	84,71	66,69
40	187,27	51,45	200,23	146,32
50	230,53	164,87	240,97	212,12
60	316,08	268,26	546,24	376,86
70	364,18	338,85	558,73	420,59
80	385,08	344,93	407,84	379,28
90	316,08	281,40	511,20	369,56
100	344,93	407,84	290,70	347,82

Quadro 51- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 58, grupo A: esmalte cariado e água deionizada

Espécime 58	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	40,96	33,20	51,45	41,87
10	21,65	23,73	39,73	28,37
20	217,63	106,04	139,68	154,45
30	240,97	268,26	220,76	243,33
40	268,26	217,63	211,59	232,49
50	240,97	316,08	260,01	272,35
60	268,26	344,93	316,08	309,76
70	272,54	276,92	295,53	281,66
80	240,97	244,60	285,99	257,19
90	260,01	248,32	202,98	237,10
100	364,18	290,70	227,20	294,03

Quadro 52- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 61, grupo A: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 61	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	21,56	23,51	26,38	23,82
10	16,51	18,09	17,38	17,33
20	33,57	32,66	34,72	33,65
30	64,50	50,75	64,50	59,92
40	276,92	197,50	244,60	239,67
50	281,40	285,99	264,09	277,16
60	285,99	300,47	321,55	302,67
70	295,53	344,93	327,17	322,54
80	281,40	338,85	316,08	312,11
90	316,08	332,93	332,93	327,31
100	321,55	344,93	327,17	331,22

Quadro 53- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 69, grupo A: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 69	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	19,59	20,90	18,17	19,55
10	15,94	16,90	15,35	16,06
20	102,96	111,49	96,27	103,57
30	202,98	149,72	121,13	157,94
40	240,97	192,30	155,14	196,14
50	256,02	223,94	256,02	245,33
60	268,26	237,41	281,40	262,36
70	285,99	260,01	300,47	282,16
80	305,54	281,40	310,47	299,14
90	357,59	351,17	321,55	343,44
100	364,18	357,59	338,85	353,54

Quadro 54- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 73, grupo A: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 73	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	57,63	47,76	52,17	52,52
10	47,44	24,18	36,99	36,20
20	205,79	175,54	200,23	193,85
30	233,93	260,01	217,63	237,19
40	220,76	230,53	227,20	226,16
50	252,13	268,26	248,32	256,24
60	272,54	272,54	268,26	271,11
70	290,70	285,99	281,40	286,03
80	300,47	290,70	305,54	298,90
90	327,17	300,47	321,55	316,40
100	316,08	300,47	338,85	318,47

Quadro 55- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 83, grupo A: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 83	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	21,56	20,27	19,92	20,58
10	15,12	14,57	14,51	14,73
20	23,29	19,18	18,32	20,26
30	41,22	77,69	25,61	48,17
40	162,85	189,76	90,21	147,61
50	230,53	240,97	197,53	223,01
60	252,13	260,01	285,99	266,04
70	268,26	281,40	268,26	272,64
80	290,70	300,47	305,54	298,90
90	332,93	344,93	321,55	333,14
100	364,18	357,59	338,85	353,54

Quadro 56- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 86, grupo A: esmalte hígido e saliva artificial

Espécime 86	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	20,90	18,39	17,03	18,77
10	12,51	14,30	12,82	13,21
20	13,70	15,58	18,86	16,05
30	19,26	17,03	27,31	21,2
40	88,59	53,65	32,30	58,18
50	248,32	276,92	139,68	221,64
60	285,99	305,54	252,13	281,22
70	305,54	321,55	290,70	305,93
80	321,55	338,85	305,54	321,98
90	364,18	344,93	321,55	343,55
100	351,17	327,17	338,85	339,06

Quadro 57- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 4, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 4	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	169,37	200,78	215,02	195,05
10	84,71	142,91	81,79	103,13
20	248,32	295,53	332,93	292,26
30	344,93	377,92	385,08	369,31
40	351,17	351,17	424,15	375,49
50	364,18	300,47	407,84	357,49
60	327,17	344,93	392,45	354,85
70	351,17	432,68	370,95	384,93
80	290,70	364,18	392,45	349,11
90	407,84	316,08	424,15	382,69
100	398,95	315,13	408,07	374,05

Quadro 58- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 11, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 11	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	221,58	183,21	98,63	167,80
10	98,25	84,06	67,94	83,41
20	115,24	93,70	93,61	100,85
30	127,80	100,98	107,10	111,96
40	141,28	171,15	264,09	192,17
50	194,89	268,26	316,08	259,74
60	264,09	316,08	364,18	314,78
70	316,08	364,18	441,46	373,90
80	370,95	310,74	327,17	336,28
90	424,15	469,49	469,49	454,37
100	411,98	465,21	492,07	456,42

Quadro 59- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 17, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 17	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	351,17	424,15	310,74	362,02
10	135,04	158,93	109,26	134,41
20	138,11	121,13	117,37	125,53
30	187,27	197,53	136,56	173,78
40	220,76	260,01	256,02	245,59
50	469,49	546,24	252,13	422,62
60	546,24	628,07	364,18	512,83
70	676,06	500,27	272,54	482,95
80	546,24	659,47	264,09	489,93
90	613,21	500,27	441,46	518,31
100	609,28	513,03	475,53	532,61

Quadro 60- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 22, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 22	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	193,13	200,67	203,29	199,03
10	162,85	175,54	217,63	185,34
20	123,73	76,39	126,42	108,84
30	104,48	144,57	108,17	119,07
40	164,87	244,60	214,58	208,01
50	223,94	272,54	237,41	244,63
60	290,70	321,55	290,70	300,98
70	281,40	285,99	370,95	312,78
80	392,45	450,52	392,45	411,80
90	427,31	420,97	424,15	424,14
100	511,20	585,02	479,24	525,15

Quadro 61- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 28, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 28	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	227,20	377,92	327,17	310,76
10	205,79	252,13	272,54	243,48
20	173,32	295,53	220,76	229,87
30	214,58	310,74	364,18	296,50
40	364,18	469,49	628,07	487,24
50	534,17	500,27	769,21	601,21
60	534,17	613,21	571,65	573,01
70	511,20	643,49	729,77	628,15
80	522,50	711,18	676,06	636,58
90	571,65	285,99	858,32	571,98
100	497,21	398,07	521,03	472,10

Quadro 62- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 35, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 35	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	91,04	141,28	95,37	109,23
10	87,01	87,79	63,03	79,28
20	68,68	118,60	133,54	106,94
30	169,02	130,62	141,28	146,97
40	211,59	166,92	160,87	179,79
50	205,79	202,98	175,54	194,77
60	214,58	300,47	208,66	241,24
70	244,60	316,08	211,59	257,42
80	264,09	332,93	281,40	292,81
90	300,47	338,85	364,18	334,50
100	281,40	351,17	377,92	336,83

Quadro 63- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 40, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 40	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	74,50	127,80	111,49	104,60
10	24,07	61,15	45,02	43,41
20	41,73	66,54	47,13	51,80
30	208,66	184,83	130,62	174,70
40	264,09	240,97	357,59	287,55
50	351,17	332,93	469,49	384,53
60	400,04	370,95	441,46	404,15
70	407,84	450,52	385,08	414,48
80	400,04	407,84	400,04	402,64
90	392,45	351,17	441,46	395,03
100	459,86	432,68	522,50	471,68

Quadro 64- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 46, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 46	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	84,71	136,56	149,72	123,66
10	36,56	110,37	80,39	75,77
20	127,80	142,91	112,63	127,78
30	240,97	268,26	194,89	234,71
40	276,92	305,54	252,13	278,20
50	281,40	310,74	285,99	292,71
60	248,32	252,13	295,53	265,33
70	351,17	272,54	300,47	308,06
80	272,54	281,40	305,54	286,49
90	268,26	295,53	300,47	288,09
100	300,47	364,18	332,93	332,53

Quadro 65- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 51, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 51	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	180,10	300,47	116,16	198,91
10	147,97	116,16	96,27	120,13
20	200,23	211,59	184,83	198,88
30	327,17	300,47	240,97	289,54
40	370,95	432,68	281,40	361,68
50	407,84	364,18	316,08	362,70
60	415,88	332,93	332,93	360,58
70	432,68	321,55	415,88	390,04
80	424,15	370,95	424,15	406,42
90	400,04	441,46	415,88	419,13
100	377,92	407,84	415,88	400,55

Quadro 66- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 56, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 56	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	151,49	189,76	211,59	184,28
10	111,49	126,42	136,56	124,82
20	141,28	113,79	149,72	134,93
30	276,92	248,32	268,26	264,50
40	357,59	364,18	295,53	339,10
50	424,15	351,17	432,68	402,67
60	450,52	400,04	450,52	433,69
70	385,08	424,15	407,84	405,69
80	377,92	407,84	432,68	406,15
90	392,45	385,08	441,46	406,33
100	407,84	415,88	400,04	407,92

Quadro 67- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 62, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 62	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	121,13	118,60	127,80	122,51
10	70,92	75,75	30,60	59,09
20	103,97	100,98	43,06	82,67
30	125,07	121,13	54,02	100,07
40	157,02	142,91	76,39	125,44
50	217,41	180,10	180,10	192,54
60	240,97	211,59	192,30	214,95
70	285,99	233,93	256,02	258,65
80	321,55	268,26	276,92	288,91
90	332,93	338,85	305,54	325,77
100	351,17	351,17	338,85	347,06

Quadro 68- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 68, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 68	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	48,72	76,39	63,52	62,88
10	18,39	19,84	24,53	20,92
20	107,10	22,55	53,65	61,1
30	158,93	54,80	73,27	95,67
40	160,87	133,54	182,44	158,95
50	237,41	233,93	230,53	233,96
60	244,60	256,02	256,02	252,21
70	256,02	285,99	264,09	268,7
80	252,13	264,09	281,40	265,87
90	256,02	272,54	276,92	268,49
100	300,47	285,99	290,70	292,39

Quadro 69- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 74, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 74	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	96,27	146,25	126,42	122,98
10	33,02	35,32	31,44	33,26
20	70,92	61,61	36,78	56,44
30	189,76	149,72	130,62	156,7
40	240,97	272,54	310,74	274,75
50	268,26	290,70	338,85	299,27
60	276,92	285,99	327,17	296,69
70	295,53	327,17	351,17	324,62
80	344,93	357,59	377,92	360,15
90	364,18	370,95	385,08	373,40
100	377,92	392,45	400,04	390,14

Quadro 70- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 82, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 82	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	103,97	112,63	106,04	107,55
10	51,80	57,21	60,24	56,42
20	54,41	59,35	64,01	59,26
30	102,96	96,27	100,98	100,07
40	125,07	142,91	127,80	131,93
50	182,44	175,54	164,87	174,28
60	237,41	223,94	240,97	234,11
70	264,09	256,02	252,13	257,41
80	281,40	276,92	260,01	272,78
90	310,74	290,70	300,47	300,64
100	332,93	305,54	327,17	321,88

Quadro 71- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 87, grupo F: esmalte cariado e solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%

Espécime 87	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	102,96	99,05	114,96	105,66
10	71,50	77,03	81,79	76,77
20	87,79	87,01	93,60	89,47
30	141,28	132,07	142,91	138,75
40	230,53	237,41	223,94	230,63
50	240,97	244,60	252,13	245,9
60	252,13	260,01	272,54	261,56
70	290,70	285,99	281,40	286,03
80	316,08	327,17	305,54	316,26
90	305,54	321,55	316,08	314,39
100	310,74	338,85	332,93	327,51

Quadro 72- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 5, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 5	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	323,19	354,01	210,94	296,04
10	31,10	88,59	41,99	53,89
20	305,54	441,46	450,52	399,17
30	469,49	459,86	276,92	402,09
40	500,27	459,86	327,17	429,10
50	522,50	295,53	392,45	403,49
60	407,84	415,88	459,86	427,86
70	450,52	332,93	424,15	402,53
80	424,15	469,49	370,95	421,53
90	522,50	441,46	351,17	438,37
100	500,11	492,37	412,45	468,31

Quadro 73- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 8, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 8	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	37,28	31,45	48,15	38,96
10	23,18	19,03	36,35	26,18
20	96,27	83,64	83,97	87,96
30	189,76	264,09	276,92	243,59
40	237,41	370,95	344,93	317,76
50	220,76	295,53	227,20	247,83
60	164,87	370,95	220,76	252,19
70	240,97	338,85	332,93	304,25
80	252,13	357,59	194,89	268,20
90	285,99	385,08	351,17	340,74
100	301,27	392,45	353,08	348,93

Quadro 74- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 18, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 18	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	78,35	64,50	59,35	67,40
10	16,64	15,23	11,94	14,60
20	19,34	18,39	12,43	16,72
30	36,99	25,87	15,88	26,24
40	60,24	33,39	16,64	36,75
50	113,79	68,13	30,60	70,84
60	117,79	87,01	58,48	87,76
70	252,13	351,17	240,97	281,42
80	276,92	392,45	276,92	315,43
90	256,02	310,74	344,93	303,89
100	260,01	332,93	377,92	323,62

Quadro 75- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 21, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 21	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	370,95	327,17	344,93	347,68
10	272,54	310,74	260,01	281,09
20	290,70	316,08	281,40	296,06
30	377,92	338,85	364,18	360,31
40	220,76	392,45	305,54	306,25
50	208,66	316,08	316,08	280,27
60	281,40	327,17	276,92	295,16
70	290,70	351,17	338,85	326,90
80	300,47	407,84	276,92	328,41
90	392,45	424,15	415,88	410,82
100	377,92	441,46	432,68	417,35

Quadro 76- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 29, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 29	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	53,27	32,66	28,01	37,98
10	13,51	13,32	10,87	12,56
20	14,95	13,70	15,94	14,86
30	31,78	31,44	19,42	27,54
40	96,27	86,23	53,65	78,71
50	105,00	285,99	194,89	195,29
60	256,02	252,13	321,55	276,56
70	248,32	321,55	351,17	307,01
80	205,79	305,54	316,08	275,80
90	285,99	281,40	378,22	315,20
100	401,83	345,07	500,27	415,72

Quadro 77- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 33, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 33	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
10	15,82	13,27	16,51	15,20
20	11,70	11,04	12,35	11,70
30	14,46	13,41	14,51	14,13
40	138,11	29,19	72,08	79,80
50	208,66	227,20	202,98	212,95
60	217,63	316,08	252,13	261,95
70	223,94	332,93	290,70	282,52
80	223,94	344,93	300,47	289,78
90	240,97	377,92	305,54	308,14
100	285,99	385,08	290,70	320,59
10	281,40	407,84	310,74	333,33

Quadro 78- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 41, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 41	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	107,10	55,99	51,45	71,51
10	51,80	40,46	27,45	39,90
20	78,35	45,91	65,51	63,26
30	205,79	194,89	338,85	246,51
40	327,17	310,74	357,59	331,83
50	338,85	316,08	385,08	346,67
60	252,13	344,93	364,18	320,41
70	338,85	377,92	370,95	362,57
80	479,42	260,01	400,04	379,82
90	441,46	351,17	377,92	390,18
100	392,45	377,92	385,08	385,15

Quadro 79- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 44, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 44	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	377,92	305,54	370,95	351,47
10	260,01	227,20	300,47	262,56
20	295,53	300,47	316,02	304,01
30	305,54	321,55	321,55	316,21
40	338,85	327,17	327,17	331,06
50	357,59	351,17	332,93	347,23
60	351,17	351,17	344,93	349,09
70	357,59	344,93	351,17	351,23
80	364,18	364,18	357,59	361,98
90	370,95	364,18	370,95	368,69
100	385,08	385,08	377,92	382,69

Quadro 80- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 52, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 52	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	177,79	158,93	142,91	159,88
10	60,24	74,50	83,23	72,66
20	122,42	114,96	155,14	130,84
30	230,53	192,30	202,98	208,6
40	248,32	244,60	256,02	249,65
50	268,26	252,13	268,26	262,88
60	285,99	264,09	276,92	275,67
70	290,70	281,40	285,99	286,03
80	300,47	305,54	295,53	300,51
90	316,08	332,93	310,74	319,92
100	344,93	327,17	338,85	336,98

Quadro 81- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 55, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 55	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	36,35	36,56	55,99	42,97
10	14,36	20,36	22,45	19,06
20	29,81	41,73	39,73	37,09
30	187,27	200,23	157,02	181,51
40	233,93	202,98	208,66	215,19
50	276,92	244,60	217,63	246,38
60	230,53	276,92	285,99	264,48
70	268,26	272,54	295,53	278,78
80	272,54	300,47	281,40	284,80
90	230,53	344,93	300,47	291,98
100	310,74	357,59	305,54	324,62

Quadro 82- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 63, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 63	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	21,46	33,95	38,55	31,32
10	17,03	20,10	18,86	18,66
20	19,59	23,51	34,33	25,81
30	42,52	62,55	54,80	53,29
40	103,97	91,89	114,96	103,61
50	126,42	136,56	138,11	133,7
60	146,25	151,49	187,27	161,67
70	197,53	189,76	208,66	198,65
80	214,58	240,97	260,01	238,52
90	256,02	272,54	295,53	274,7
100	310,74	305,54	305,54	307,27

Quadro 83- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 67, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 67	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	17,73	28,01	16,83	20,86
10	11,82	11,86	12,10	11,93
20	17,87	21,46	16,25	18,53
30	164,87	184,83	83,97	144,56
40	233,93	256,02	237,41	242,45
50	256,02	264,09	252,13	257,41
60	248,32	272,54	268,26	263,04
70	268,26	281,40	264,09	271,25
80	272,54	290,70	268,26	277,17
90	237,41	290,70	285,99	271,37
100	208,66	305,54	300,47	271,56

Quadro 84- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 75, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 75	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	40,46	56,39	44,73	47,19
10	15,40	18,17	17,17	16,91
20	52,90	46,82	46,51	48,74
30	175,54	129,20	118,60	141,11
40	200,23	223,94	208,66	210,94
50	237,41	244,60	240,97	240,99
60	252,13	268,26	252,13	257,51
70	276,92	276,92	268,26	274,03
80	295,53	281,40	281,40	286,11
90	332,93	290,70	310,74	311,46
100	351,17	338,85	327,17	339,06

Quadro 85- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 81, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 81	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	18,47	20,63	24,30	21,13
10	12,64	11,67	11,94	12,08
20	14,10	14,25	13,09	13,81
30	23,29	24,88	14,67	20,95
40	169,02	123,73	100,01	130,92
50	208,66	205,79	205,79	206,75
60	260,01	264,09	244,60	256,23
70	264,09	272,54	256,02	264,22
80	281,40	281,40	276,92	279,91
90	285,99	290,70	300,47	292,39
100	300,47	321,55	321,55	314,52

Quadro 86- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 89, grupo C: esmalte cariado e tintura de *C. sinensis*

Espécime 89	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	18,02	20,54	18,17	18,91
10	12,35	12,56	11,67	12,19
20	14,67	13,22	17,73	15,21
30	20,36	35,73	60,24	38,78
40	61,61	54,80	147,97	88,13
50	135,04	151,49	160,87	149,13
60	162,85	157,02	180,10	166,66
70	171,15	173,32	200,23	181,57
80	175,54	182,44	227,20	195,06
90	233,93	189,76	230,53	218,07
100	268,26	217,63	321,55	269,15

Quadro 87- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 6, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 6	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	171,08	128,54	105,00	134,87
10	95,37	81,79	117,37	98,176
20	227,20	338,85	166,92	244,32
30	252,13	332,93	223,94	269,66
40	223,94	327,17	233,93	261,68
50	184,83	377,92	220,76	261,17
60	321,55	321,55	285,99	309,69
70	268,26	344,93	200,23	271,14
80	281,40	316,08	260,01	285,83
90	264,09	295,53	310,74	290,12
100	300,47	276,92	295,53	290,97

Quadro 88- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 7, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 7	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	113,79	144,57	171,15	143,17
10	94,48	54,41	87,79	78,89
20	208,66	96,27	54,41	119,78
30	252,13	290,70	171,15	237,99
40	300,47	351,17	305,54	319,06
50	351,17	522,50	327,17	400,28
60	300,47	357,59	327,55	328,53
70	321,55	370,95	321,55	338,01
80	305,54	479,42	344,93	376,63
90	357,59	385,08	316,08	352,91
100	342,05	400,04	342,05	361,38

89- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 19, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 19	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	119,86	116,16	205,79	147,27
10	98,11	51,45	189,76	113,10
20	22,55	43,61	90,21	52,12
30	24,41	18,62	80,39	41,14
40	100,01	44,16	149,72	97,96
50	123,73	116,16	276,92	172,27
60	268,26	119,86	310,74	232,95
70	272,54	260,01	407,84	313,46
80	338,85	272,54	357,59	322,99
90	377,93	357,59	415,88	383,80
100	382,15	324,03	382,22	362,80

Quadro 90- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 20, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 20	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	160,87	182,44	192,30	178,53
10	77,69	111,49	164,87	118,01
20	171,15	252,13	310,74	244,67
30	230,53	268,26	344,93	281,24
40	295,53	316,08	377,92	329,84
50	310,74	310,74	392,45	337,97
60	327,17	370,95	415,88	371,33
70	316,08	316,08	424,15	352,10
80	364,18	351,17	392,45	369,26
90	332,93	385,08	370,95	362,98
100	351,17	370,95	400,04	374,05

Quadro 91- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 31, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 31	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	237,41	264,09	230,53	244,01
10	158,93	200,23	155,14	171,43
20	211,59	208,66	260,01	226,75
30	227,20	230,53	268,26	241,99
40	281,40	237,41	272,54	263,78
50	305,54	300,47	300,47	302,16
60	260,01	285,99	264,09	270,03
70	260,01	295,53	264,09	273,21
80	332,93	310,74	327,17	323,61
90	290,70	290,70	344,93	308,77
100	338,85	357,59	364,18	353,54

Quadro 92- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 32, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 32	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	101,96	114,96	125,07	114
10	47,13	53,27	87,79	62,73
20	52,90	74,50	106,04	77,81
30	67,07	79,02	127,80	91,30
40	169,02	153,30	160,87	161,06
50	217,63	227,20	197,53	214,12
60	237,41	244,60	208,66	230,22
70	276,92	252,13	230,53	253,19
80	290,70	272,54	260,01	274,42
90	305,54	290,70	300,47	298,9
100	321,55	316,08	321,55	319,73

Quadro 93- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 42, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 42	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	44,45	40,71	44,73	43,30
10	20,81	21,37	17,66	19,95
20	13,95	18,32	23,84	18,70
30	42,79	60,69	18,47	40,65
40	78,35	84,71	70,92	78
50	187,27	211,59	117,37	172,08
60	272,54	290,70	158,93	240,72
70	285,99	295,53	332,93	304,82
80	310,74	357,59	338,85	335,73
90	316,08	370,95	332,93	339,99
100	338,85	385,08	344,93	356,29

Quadro 94- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 43, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 43	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	182,44	101,96	108,17	130,86
10	73,88	81,79	73,27	76,31
20	111,49	112,63	92,74	105,62
30	220,76	144,57	149,72	171,68
40	233,93	160,87	227,20	207,33
50	237,41	205,79	295,53	246,24
60	260,01	244,60	305,54	270,05
70	281,40	276,92	310,74	289,69
80	295,53	300,47	332,93	309,64
90	316,08	344,93	351,17	337,39
100	327,17	385,08	370,95	361,07

Quadro 95- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 53, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 53	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	132,07	121,13	133,54	128,91
10	110,37	96,27	109,26	105,3
20	138,11	112,63	121,13	123,96
30	153,30	177,79	149,72	160,27
40	175,54	202,98	173,32	183,95
50	189,76	227,20	194,89	203,95
60	205,79	214,58	208,66	209,68
70	214,58	233,93	217,63	222,05
80	244,60	248,32	240,97	244,63
90	272,54	264,09	252,13	262,92
100	316,08	300,47	281,40	299,32

Quadro 96- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 54, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 54	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	54,41	25,37	35,93	38,57
10	32,12	13,90	19,02	21,68
20	33,95	14,10	18,32	22,12
30	64,01	37,43	47,44	49,63
40	110,37	76,39	92,74	93,17
50	182,44	127,80	132,07	147,44
60	220,76	256,02	171,15	215,98
70	230,53	260,01	182,44	224,33
80	240,97	268,26	189,76	233
90	276,92	272,54	260,01	269,82
100	290,70	281,40	272,54	281,55

Quadro 97- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 64, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 64	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	26,91	25,99	25,74	26,21
10	15,88	18,24	19,42	17,85
20	20,54	22,87	21,85	21,75
30	28,45	23,51	23,29	25,08
40	34,33	37,21	37,43	36,32
50	39,97	42,25	48,40	43,54
60	91,89	86,23	98,11	92,08
70	103,97	100,98	114,96	106,64
80	149,72	138,11	133,54	140,46
90	157,02	146,25	149,72	151
100	180,10	169,02	157,02	168,71

Quadro 98- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 66, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 66	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	44,73	34,14	35,73	38,2
10	15,94	13,36	16,70	15,33
20	11,08	11,22	12,43	11,58
30	20,81	16,97	11,37	16,38
40	39,25	55,99	37,43	44,22
50	105	125,07	73,88	101,32
60	113,79	166,92	135,04	138,58
70	155,14	223,94	171,15	183,41
80	220,76	230,53	214,58	221,96
90	205,79	252,13	248,32	235,41
100	223,94	264,09	272,54	253,52

99- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 77, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 77	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	123,73	100,98	117,37	114,03
10	49,72	46,51	61,15	52,46
20	98,11	88,59	97,19	94,63
30	151,49	141,28	160,87	151,21
40	200,23	187,27	214,58	200,69
50	230,53	205,79	227,20	221,17
60	248,32	233,93	248,32	243,52
70	264,09	244,60	268,26	258,98
80	276,92	290,70	295,53	287,72
90	290,70	305,54	351,17	315,8
100	321,55	332,93	370,95	341,81

Quadro 100- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 78, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 78	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	74,50	69,23	76,39	73,37
10	32,84	38,10	35,12	35,35
20	95,37	102,96	91,89	96,74
30	141,28	149,72	166,92	152,64
40	169,02	182,44	177,79	176,42
50	202,98	217,63	223,94	214,85
60	233,93	240,97	244,60	239,83
70	252,13	260,01	252,13	254,76
80	276,92	268,26	290,70	278,63
90	310,74	276,92	305,54	297,73
100	357,59	300,47	316,08	324,71

Quadro 101- Valores de microdureza em secção transversa do espécime 90, grupo B: esmalte cariado e tintura de *A. arborescens*

Espécime 90	Valores de Microdureza em Secção Transversa			
Profundidade (µm)	1	2	3	Média
Superfície	25,49	21,08	25,61	24,06
10	19,59	13,70	11,86	15,05
20	13,75	12,64	16,57	14,32
30	15,64	16,70	19,84	17,39
40	16,38	21,37	37,43	25,06
50	83,23	227,20	197,53	169,32
60	217,63	220,76	208,66	215,68
70	230,53	237,41	230,53	232,82
80	240,97	240,97	227,20	236,38
90	252,13	256,02	281,40	263,18
100	332,93	281,40	300,47	304,93

Os quadros 102 a 107 apresentam as médias dos valores de microdureza em secção transversa (KHN_D) dos espécimes de cada grupo estudado e a média final (MF) do respectivo grupo. As medidas foram realizadas a partir da superfície (sup) do espécime até a profundidade de 100 µm.

Quadro 102- Médias dos valores de microdureza transversa (KHN_D) de cada espécime e a média final (MF) do grupo GH

Médias de microdureza em seção transversa de cada espécime do grupo GH																
	3	9	10	14	65	24	30	45	57	80	34	72	76	79	88	MF
sup	391,35	258,01	206,78	198,5	217,58	286,06	113,04	313,27	442,28	329,6	256,79	215,66	290,74	243,30	202,65	264,37
10	382,14	319,37	364,86	336,41	410,57	356,29	237,05	384,42	524,82	402,3	285,37	238,74	329,48	276,27	216,63	337,65
20	456,6	333,29	371,79	310,87	418,61	375,99	315,97	305,26	434,54	473,17	298,88	260,75	342,80	288,33	242,33	348,61
30	390,18	336,87	385,15	411,61	330,16	402,91	350,31	262,84	458,31	454,11	320,93	269,45	364,2	304,27	255,98	353,15
40	346,84	242,81	409,64	265,54	416,23	425,94	310,62	316,21	457,02	466,74	320,56	277,57	358,34	314,75	271,11	346,66
50	441,82	275,8	347,08	340,99	397,8	420,15	311,48	243,5	455,29	461,58	335,81	290,82	369,95	322,16	275,47	352,65
60	356,61	297,41	333,41	431,5	432,29	448,41	376,34	267,71	497,23	466,69	347,58	295,65	379,33	329,53	284,34	369,60
70	356,08	324,32	361,92	426,8	331,5	438,28	292,47	247,49	546,51	476,32	353,9	300,51	380,31	355,51	291,83	365,58
80	368,09	243,95	373,25	314,88	386,8	449,01	312,3	265,53	526,39	427,33	360,39	311,05	412,19	368,82	313,26	362,22
90	287,86	313,53	409,37	356,14	423,54	419,13	345,15	322,4	549,83	421,65	374,40	321,74	391,59	410,52	329,6	378,43
100	301,73	289,72	377,3	391,19	399,34	505,11	312,12	351,34	546,29	450,54	400,19	324,41	395,42	390,14	335,11	384,66

Quadro 103- Médias dos valores de microdureza transversa (KHN_D) de cada espécime e a média final (MF) do grupo GS

Médias de microdureza em secção transversa de cada espécime do grupo GS																
	1	13	15	25	26	37	38	48	49	59	60	70	71	84	85	MF
sup	182,51	256,73	23,21	67,26	46,68	40,98	43,67	51,95	56,79	60,38	47,90	44,95	41,07	48,39	45,13	70,51
10	134,68	106,32	10,70	42,89	39,34	19,80	26,55	27,77	36,24	37,35	17,05	21,12	18,99	16,42	24,45	38,64
20	300,46	332,19	72,18	49,27	36,62	38,61	86,85	87,19	72,29	107,82	32,97	27,73	13,02	25,2	28,48	87,40
30	349,42	362,35	150,03	94,76	92,79	92,12	247,93	185,96	163,35	202,46	56,76	134,39	16,10	46,93	41,95	149,15
40	290,30	382,62	194,62	147,94	185,03	241,26	280,82	260,13	226,59	255,26	134,68	264,69	26,31	91,75	72,14	203,61
50	326,43	379,16	205,33	252,77	217,85	302,16	301,86	278,08	233,38	226,46	270,91	286,48	127,96	178,27	267,43	256,97
60	341,81	474,40	193,39	349,92	242,70	309,19	278,69	314,50	265,31	230,44	336,98	304,11	175,38	261,49	319,82	293,21
70	306,36	527,24	208,98	421,05	240,81	327,62	304,54	321,53	261,31	245,79	355,68	319,90	200,12	274,31	337,14	310,16
80	346,21	415,11	187,76	422,19	310,86	434,56	315,04	297,57	282,43	260,05	412,98	329,34	260,51	272,55	359,79	327,13
90	353,91	515,25	197,91	465,23	272,62	372,22	312,80	320,59	366,50	225,24	374,21	339,55	280,5	280,75	366,68	336,26
100	353,41	472,16	208,83	430,08	302,13	407,54	318,48	291,90	331,84	267,47	460,25	373,40	296,54	276,55	390,28	345,40

Quadro 104- Médias dos valores de microdureza transversa (KHN_D) de cada espécime e a média final (MF) do grupo GA

Médias de microdureza em secção transversa de cada espécime do grupo GA																
	2*	12*	16	23	27*	36	39	47*	50	58	61	69	73	83	86	MF
sup	11,36	10,5	310,72	236,75	11,33	28,53	36,19	14,76	26,37	41,87	23,82	19,55	52,52	20,58	18,77	54,38
10	12,45	10,63	45,92	90,94	12,36	14,25	23,34	24	18,64	28,37	17,33	16,06	36,20	14,73	13,21	21,27
20	12,04	10,8	184,52	120,75	12,18	10,77	185,66	27,15	32,53	154,45	33,65	103,57	193,85	20,26	16,05	70,40
30	14,27	13,52	329,34	162,99	15,77	15,1	256,82	128,80	66,69	243,33	59,92	157,94	237,19	48,17	21,2	106,58
40	29,55	56,65	316,64	194,56	34,02	19,48	285,10	295,55	146,32	232,49	239,67	196,14	226,16	147,61	58,18	137,49
50	120,38	193,72	345,62	235	104,48	53,40	292,53	327,42	212,12	272,35	277,16	245,33	256,24	223,01	221,64	175,63
60	238,99	352,18	336,19	246,9	204,71	110,53	312,64	335,24	376,86	309,76	302,67	262,36	271,11	266,04	281,22	205,09
70	225,24	480,78	336,29	267,4	224,51	233,01	312,95	281,04	420,59	281,66	322,54	282,16	286,03	272,64	305,93	221,41
80	238,14	514,44	287,19	281,54	264,37	272,89	360,73	277,01	379,28	257,19	312,11	299,14	298,90	298,90	321,98	224,66
90	233,64	509,97	291,18	312,79	292,49	275,55	327,39	287,80	369,56	237,10	327,31	343,44	316,40	333,14	343,55	231,83
100	235,79	536,1	342,2	318,52	323,25	315,18	378,43	311,03	347,82	294,03	331,22	353,54	318,47	353,54	339,06	246,13

Os espécimes que sofreram erosão na superfície (*) foram considerados como zero no cálculo da média final.

Quadro 105- Médias dos valores de microdureza transversa (KHN_D) de cada espécime e a média final (MF) do grupo GF

Médias de microdureza em seção transversa de cada espécime do grupo GF																
	4	11	17	22	28	35	40	46	51	56	62	68	74	82	87	MF
sup	195,05	167,80	362,02	199,03	310,76	109,23	104,60	123,66	198,91	184,28	122,51	62,88	122,98	107,55	105,66	165,13
10	103,13	83,41	134,41	185,34	243,48	79,28	43,41	75,77	120,13	124,82	59,09	20,92	33,26	56,42	76,77	95,98
20	292,26	100,85	125,53	108,84	229,87	106,94	51,80	127,78	198,88	134,93	82,67	61,1	56,44	59,26	89,47	121,77
30	369,31	111,96	173,78	119,07	296,50	146,97	174,70	234,71	289,54	264,50	100,07	95,67	156,7	100,07	138,75	184,82
40	375,49	192,17	245,59	208,01	487,24	179,79	287,55	278,20	361,68	339,10	125,44	158,95	274,75	131,93	230,63	258,43
50	357,49	259,74	422,62	244,63	601,21	194,77	384,53	292,71	362,70	402,67	192,54	233,96	299,27	174,28	245,9	311,27
60	354,85	314,78	512,83	300,98	573,01	241,24	404,15	265,33	360,58	433,69	214,95	252,21	296,69	234,11	261,56	334,73
70	384,93	373,90	482,95	312,78	628,15	257,42	414,48	308,06	390,04	405,69	258,65	268,7	324,62	257,41	286,03	356,92
80	349,11	336,28	489,93	411,80	636,58	292,81	402,64	286,49	406,42	406,15	288,91	265,87	360,15	272,78	316,26	368,15
90	382,69	454,37	518,31	424,14	571,98	334,50	395,03	288,09	419,13	406,33	325,77	268,49	373,40	300,64	314,39	385,15
100	374,05	456,42	532,61	525,15	472,10	336,83	471,68	332,53	400,55	407,92	347,06	292,39	390,14	321,88	327,51	399,25

Quadro 106- Médias dos valores de microdureza transversa (KHN_D) de cada espécime e a média final (MF) do grupo GC

Médias de microdureza em seção transversa de cada espécime do grupo GC																
	5	8	18	21	29	33	41	44	52	55	63	67	75	81	89	MF
sup	296,04	38,96	67,40	347,68	37,98	15,20	71,51	351,47	159,88	42,97	31,32	20,86	47,19	21,13	18,91	104,56
10	53,89	26,18	14,60	281,09	12,56	11,70	39,90	262,56	72,66	19,06	18,66	11,93	16,91	12,08	12,19	57,73
20	399,17	87,96	16,72	296,06	14,86	14,13	63,26	304,01	130,84	37,09	25,81	18,53	48,74	13,81	15,21	99,08
30	402,09	243,59	26,24	360,31	27,54	79,80	246,51	316,21	208,6	181,51	53,29	144,56	141,11	20,95	38,78	166,07
40	429,10	317,76	36,75	306,25	78,71	212,95	331,83	331,06	249,65	215,19	103,61	242,45	210,94	130,92	88,13	219,02
50	403,49	247,83	70,84	280,27	195,29	261,95	346,67	347,23	262,88	246,38	133,7	257,41	240,99	206,75	149,13	243,39
60	427,86	252,19	87,76	295,16	276,56	282,52	320,41	349,09	275,67	264,48	161,67	263,04	257,51	256,23	166,66	262,454
70	402,53	304,25	281,42	326,90	307,01	289,78	362,57	351,23	286,03	278,78	198,65	271,25	274,03	264,22	181,57	292,01
80	421,53	268,20	315,43	328,41	275,80	308,14	379,82	361,98	300,51	284,80	238,52	277,17	286,11	279,91	195,06	301,43
90	438,37	340,74	303,89	410,82	315,20	320,59	390,18	368,69	319,92	291,98	274,7	271,37	311,46	292,39	218,07	324,56
100	468,31	348,93	323,62	417,35	415,72	333,33	385,15	382,69	336,98	324,62	307,27	271,56	339,06	314,52	269,15	349,22

Quadro 107- Médias dos valores de microdureza transversa (KHN_D) de cada espécime e a média final (MF) do grupo GB

Médias de microdureza em seção transversa de cada espécime do grupo GB																
	6	7	19	20	31	32	42	43	53	54	64	66	77	78	90	MF
sup	134,87	143,17	147,27	178,53	244,01	114	43,30	130,86	128,91	38,57	26,21	38,2	114,03	73,37	24,06	105,29
10	98,17	78,89	113,10	118,01	171,43	62,73	19,95	76,31	105,3	21,68	17,85	15,33	52,46	35,35	15,05	66,77
20	244,32	119,78	52,12	244,67	226,75	77,81	18,70	105,62	123,96	22,12	21,75	11,58	94,63	96,74	14,32	98,32
30	269,66	237,99	41,14	281,24	241,99	91,30	40,65	171,68	160,27	49,63	25,08	16,38	151,21	152,64	17,39	129,88
40	261,68	319,06	97,96	329,84	263,78	161,06	78	207,33	183,95	93,17	36,32	44,22	200,69	176,42	25,06	165,24
50	261,17	400,28	172,27	337,97	302,16	214,12	172,08	246,24	203,95	147,44	43,54	101,32	221,17	214,85	169,32	213,86
60	309,69	328,53	232,95	371,33	270,03	230,22	240,72	270,05	209,68	215,98	92,08	138,58	243,52	239,83	215,68	240,59
70	271,14	338,01	313,46	352,10	273,21	253,19	304,82	289,69	222,05	224,33	106,64	183,41	258,98	254,76	232,82	258,57
80	285,83	376,63	322,99	369,26	323,61	274,42	335,73	309,64	244,63	233	140,46	221,96	287,72	278,63	236,38	282,73
90	290,12	352,91	383,80	362,98	308,77	298,9	339,99	337,39	262,92	269,82	151	235,41	315,8	297,73	263,18	298,05
100	290,97	361,38	362,80	374,05	353,54	319,73	356,29	361,07	299,32	281,55	168,71	253,52	341,81	324,71	304,93	316,96

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO in vitro DO EFEITO DE *Camellia sinensis* e *Aloe arborescens* NO PROCESSO DE REMINERALIZAÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE ARTIFICIAL EM ESMALTE DENTÁRIO HUMANO.

Pesquisador: Ana Carolina Rodrigues Danzi Salvia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 13706713.7.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 430.778

Data da Relatoria: 08/10/2013

Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente estudo será avaliar o efeito da solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%, saliva artificial, extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens* sobre a remineralização de lesão de cárie artificial em esmalte dentário humano. Serão preparados 75 espécimes de 20 molares humanos hígidos indicados para extração por problemas periodontais. Os espécimes serão polidos para obtenção de superfície plana e lisa. A superfície dos espécimes será avaliada quanto a microdureza e distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n=15): Grupo 1: água deionizada (controle); Grupo 2: saliva artificial; Grupo 3: solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%; Grupo 4: extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* e Grupo 5: extrato hidroalcoólico de *Aloe arborescens*. Os espécimes serão submetidos à formação de lesão de cárie artificial. Após, a superfície de esmalte será avaliada quanto à microdureza e, posteriormente, aos tratamentos durante 30 dias. Finalizado o período de tratamento, os espécimes serão medidos, quanto à microdureza, em sua superfície e em sua secção longitudinal. A análise por Espectroscopia por Dispersão de Raios-x (EDS), das amostras submetidas aos tratamentos, será realizada para verificar a presença de cálcio, fósforo e flúor. Para a comparação das médias obtidas entre os

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 430.778

grupos (microdureza antes da produção da lesão de cárie, após a lesão e após tratamentos), bem como da comparação das porcentagens obtidas na análise por EDS, serão utilizados os testes de ANOVA Medidas Repetidas e Tukey (5%).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo in vitro será avaliar a atividade da solução aquosa de fluoreto de sódio 0,05%, saliva artificial e extratos hidroalcoólicos de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens* sobre a remineralização de lesão artificial de cárie em esmalte dentário humano.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto é com dentes humanos in vitro, não havendo riscos. Os benefícios serão pelo trabalho científico.

Existem dois termos, um de doação e o TCLE. O pesquisador deverá informar se ele irá colher a assinatura do participante para a pesquisa, ou será utilizado o termo de doação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ndn

Recomendações:

O pesquisador informar qual o termo que irá utilizar. Existem dois termos, um de doação e o TCLE. O pesquisador deverá informar se ele irá colher a assinatura do participante para a pesquisa, ou será utilizado o termo de doação. Se for utilizar o TCLE ele deverá reescrever com linguagem clara e objetiva.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendente

Situação do Parecer:

Não

Necessita Apreciação da CONEP:

O Colegiado acata o parecer da relatora, solicitando a pesquisadora o atendimento das pendências apontadas

Considerações Finais a critério do CEP:

12.245-000

(12-)3947-9078 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 430.778

Endereço:
Bairro: CEP:
Telefone:
Av. Engº Francisco José Longo 777
Jardim São Dimas
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Fax: (12-)3947-9010
Página 02

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ndn

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O trabalho dispensa o TCLE visto que será empregado o termo de doação fornecido pela Clínica de Cirurgia e Periodontia do ICT-UNESP, onde os dentes serão coletados.

Recomendações:

ndn

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer da relatora.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 430.778

SAO JOSE DOS CAMPOS, 21 de Outubro de 2013

Assinador por:
JANETE DIAS ALMEIDA
(Coordenador)

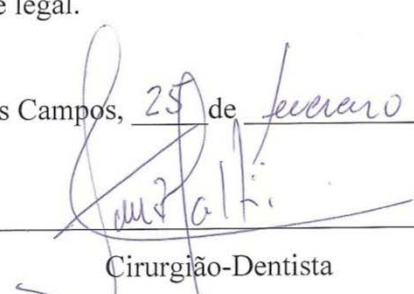
Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO B – Termo de Doação de Material Biológico**Termo de Doação de Material Biológico**

Eu, Prof. Assist. Dr. Fernando Vagner Raldi, RG 7.790.264, CPF 041.596.938-73, CROSP 34778, chefe do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia do Instituto de Ciência e Tecnologia (UNESP – Univ. Estadual Paulista), situado na Av. Eng. Francisco José Longo, nº 777, na cidade de São José dos Campos, Estado de São Paulo, declaro que estou doando 20 (vinte) dentes molares humanos permanentes com indicação de extração, para serem utilizados na Tese intitulada: “Avaliação *in vitro* do efeito de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens* no processo de remineralização de lesão de cárie artificial em esmalte dentário humano”, obtidos mediante Termo de Doação constante nos prontuários dos pacientes.

Declaro estar ciente de que o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – CEPH, do Instituto de Ciência e Tecnologia ICT – UNESP poderá, a qualquer momento, solicitar cópia de todos os Termos de Doação de Material Biológico corretamente preenchidos por cada doador ou seu representante legal.

São José dos Campos, 25 de feveraro de 2014.



Cirurgião-Dentista

(profissional responsável pela coleta e destinação do material)

ANEXO C – Formulação das tinturas de *Camellia sinensis* e de *Aloe arborescens*

Extratos Fluidos: “Processo C” (Fonte: Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, 2ª Edição, p. 449).

Este processo é o da percolação fracionada, especialmente indicado para as drogas que contêm princípios voláteis ou constituintes facilmente alteráveis pelo calor ou na substituição dos processos A ou B, quando não houver equipamento adequado para concentração e destilação. Ao se empregar o processo C para a obtenção de um extrato fluido, que normalmente se prepara pelo processo B, empregue-se o líquido extrator I em todo o transcurso de percolação.

Proceda do seguinte modo:

Divida 1.000 g da droga pulverizada em três porções de 500 g, 300 g e 200 g respectivamente. Umedeça uniformemente a primeira porção (500 g), com quantidade suficiente do líquido extrator; transfira o pó umedecido a um percolador adequado, cuja capacidade não deve exceder, de muito, o volume da droga no percolador. Saturar com o líquido extrator até ficar uma camada que a cubra completamente e deixe macerar pelo tempo prescrito na monografia; proceda, então, à percolação, separando os primeiros 200 cm³ que percolarem e recolhendo depois, separadamente, cinco frações sucessivas de 300 cm³ de percolato cada uma, numerando-as na ordem em que forem obtidas.

Umedeça a segunda porção da droga (300 g), com quantidade suficiente do percolato obtido imediatamente depois da fração separada; percole, procedendo como com a primeira porção da droga, usando como líquido extrator, as porções restantes do percolato, obtidas na primeira operação, e usando-as na ordem em que foram recolhidas; separe os primeiros 300 cm³ do novo percolato e recolha mais cinco frações, de 200 cm³, cada uma, numerando-as na ordem em que forem obtidas.

Umedeça a terceira porção da droga (200 g) com quantidade suficiente da primeira fração numerada do percolato da segunda porção e proceda à percolação como na operação precedente, empregando como líquido extrator as frações de 200 cm³ de percolato da segunda porção, na ordem em que foram recolhidas. Se não houver doseamento, recolha e separe 500 cm³ de percolato. Misture os três percolatos separados das três porções da droga, para obter 1.000 cm³ de extrato fluido.

Se for necessário dosear o extrato fluido preparado pelo processo C, recolha e separe somente 420 cm³ de percolato da terceira porção em vez dos 500 cm³ determinados anteriormente. Misture os três percolatos separados das três porções da droga e doseie uma fração da mistura. Se o teor obtido for excessivo, ajuste o título diluindo-o com quantidade suficiente do mênstruo empregado, e, se insuficiente, retire e separe todo o líquido restante nos percoladores, repita a extração, usando como mênstruo o percolato de teor insuficiente e depois o líquido por último retirado, e proceda a novo doseamento.