

CLAUDIA SIMÕES DE SOUZA

**ESTUDO DA DESMINERALIZAÇÃO NO ESMALTE BOVINO
USANDO MEDIÇÕES DE DUREZA SUPERFICIAL (KNOOP E
VICKERS), DUREZA SECCIONAL TRANSVERSAL E
TOMOGRAFIA SÍNCROTRON**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Mestra.

Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança

Orientador: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba – SP

2025

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729e Souza, Claudia Simões de.
Estudo da desmineralização no esmalte bovino usando medições de dureza superficial (knoop e vickers), dureza seccional transversal e tomografia sincrotron / Claudia Simões de Souza. - Araçatuba, 2025
38 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Esmalte dentário 2. Dureza 3. Técnicas *in vitro*
4. Dentifrícios 5. Microtomografia por raio-x I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que, direta ou indiretamente, cooperaram na realização deste trabalho.

Um agradecimento especial dirige-se ao meu professor e orientador, **Alberto Carlos Botazzo Delbem**, pela paciência e orientação.

Ao **Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro** e **Prof. Dr. Caio Sampaio** pela colaboração, gentileza e orientação para melhoria da pesquisa desenvolvida.

Ao **Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan** e **Prof. Dra. Jackeline Gallo Do Amaral** por aceitarem fazer parte da comissão examinadora, e por estarem sempre disponíveis para contribuir com minha formação.

A todos os **Professores do Departamento de Odontopediatria da FOA UNESP**, pelos conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

Aos **Funcionários do Departamento de Odontopediatria da FOA UNESP**, pelo convívio fraterno e ajuda dispensados.

Aos colegas que fiz nas manhãs e tardes de laboratório, agradeço pelo apoio e incentivo carinhosamente depositados sobre mim.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 130509/2023-0).

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001.

Aos meus amigos que sabem tão bem celebrar minhas alegrias e também abençoar minha fragilidade.

E, finalmente, à minha família e noivo. Cada conquista minha tem muito de vocês.

“O conhecido é finito, desconhecido, infinito; intelectualmente estamos numa ilhota no meio de um oceano ilimitado de inexplicabilidade. Nossa função em cada geração é reivindicar um pouco mais de terra firme. ”

T. H. Huxley, 1887

RESUMO

SOUZA, C. S. **Estudo da Desmineralização no Esmalte Bovino usando medições de Dureza Superficial (Knoop e Vickers), Dureza Seccional Transversal e Tomografia Síncrotron**. 2025. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

O objetivo deste estudo foi avaliar os padrões de desmineralização no esmalte bovino usando medições de dureza superficial utilizando variadas cargas e indentadores (Knoop e Vickers), dureza em secção longitudinal e microtomografia síncrotron (SMCT), correlacionando os dados obtidos e verificando a viabilidade dos testes de dureza como uma alternativa ao uso da SMCT. Blocos de esmalte (4 × 4 mm) foram cortados a partir de incisivos bovinos e sequencialmente polidos (n = 10). Medições iniciais de dureza superficial Knoop e Vickers foram realizadas. Os blocos foram submetidos a um modelo de ciclagem de pH durante 5 dias, com ciclos de desmineralização (6h, pH 4,7) e remineralização (18h, pH 7,0) a 37°C, e tratados com dentifrícios placebo ou fluoretados (275, 550 e 1.100 ppm F), diluídos em água deionizada. Pós-ciclagem, os blocos foram avaliados por microdureza de superfície, dureza em secção longitudinal e SMCT. Os dados obtidos pelos testes de dureza foram submetidos a ANOVA a dois critérios de medidas repetidas e teste de Student-Newman-Keuls. Os dados obtidos por SMCT foram submetidos a ANOVA um critério e teste de Student-Newman-Keuls. Correlações entre dados de dureza e SMCT foram determinados pelo coeficiente de correlação de Pearson. O limite de significância foi estabelecido em 5%. O aumento na concentração de flúor nos dentifrícios resultou em valores significativamente mais elevados de dureza superficial e menor perda de concentração mineral. Fortes correlações foram observadas entre dureza e dados de concentração mineral obtidos por SCMT. Correlações entre dureza e a profundidade de desmineralização do esmalte foram moderadas, e, na maioria dos casos, houve correlação fraca entre dureza e a profundidade do corpo da lesão. Conclui-se que as técnicas de dureza são úteis para estudar a desmineralização, mas possuem limitações na avaliação da profundidade das lesões, tornando necessário o uso de métodos complementares para esta avaliação. A SCMT se destaca como uma ferramenta poderosa, oferecendo análises estruturais detalhadas.

Palavras-chave: Esmalte dentário; Dureza; Técnicas *in vitro*; Dentifrícios; Microtomografia por Raio-X.

ABSTRACT

SOUZA, C. S. **Study of Demineralization in Bovine Enamel using Surface Hardness (Knoop and Vickers), Cross-Sectional Hardness and Synchrotron Tomography measurements** 2025. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

The aim of this study was to evaluate the demineralization patterns in bovine enamel using surface hardness measurements using various loads and indenters (Knoop and Vickers), longitudinal section hardness and synchrotron microtomography (SMCT), correlating the data obtained and verifying the feasibility of hardness tests as an alternative to the use of SMCT. Enamel blocks (4 × 4 mm) were cut from bovine incisors and sequentially polished (n = 10). Initial Knoop and Vickers surface hardness measurements were performed. The blocks were subjected to a pH cycling model for 5 days, with demineralization (6 h, pH 4.7) and remineralization (18 h, pH 7.0) cycles at 37°C, and treated with placebo or fluoridated dentifrices (275, 550 and 1,100 ppm F), diluted in deionized water. Post-cycling, the blocks were evaluated for surface microhardness, longitudinal section hardness and SMCT. Data obtained by hardness tests were subjected to two-way repeated measures ANOVA and Student-Newman-Keuls test. Data obtained by SMCT were subjected to one-way ANOVA and Student-Newman-Keuls test. Correlations between hardness data and SMCT were determined by Pearson's correlation coefficient. The significance limit was set at 5%. Increasing fluoride concentration in the dentifrices resulted in significantly higher surface hardness values and lower loss of mineral concentration. Strong correlations were observed between hardness and mineral concentration data obtained by SCMT. Correlations between hardness and enamel demineralization depth were moderate, and in most cases there was a weak correlation between hardness and lesion body depth. It is concluded that hardness techniques are useful for studying demineralization, but have limitations in assessing lesion depth, making it necessary to use complementary methods for this evaluation. SCMT stands out as a powerful tool, offering detailed structural analyses.

Keywords: Dental enamel; Hardness; *In vitro* techniques; Dentifrices; X-ray microtomography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens dos blocos de esmalte bovino após ciclagem de pH por SMCT de acordo com os dentifrícios experimentais. (A) Imagens com espessura de 1 voxel (1,45 μm) destacando as regiões desmineralizadas indicadas por setas. (B) Imagens com sobreposição de 100 fatias de 1,45 μm de espessura. Setas pretas verticais indicam camada de superfície. Setas inclinadas pretas indicam a desmineralização de subsuperfície e brancas destacam as laminações. 19

Figura 2 – Imagens em 3D representativas obtidas por meio de SMCT de um bloco do grupo placebo ilustrando a morfologia da lesão artificial de cárie de subsuperfície. Setas pequenas brancas indicam espaços vazios do esmalte desmineralizado do corpo da lesão. Setas grandes brancas indicam as paredes de esmalte mineralizado que separam os espaços vazios. Setas pretas abertas mostram a camada superficial mineralizada. Setas pequenas horizontais pretas indicam abertura do espaço vazio desmineralizado. Setas pequenas verticais pretas mostram esmalte mineralizado entre as aberturas do espaço vazio desmineralizado. (A) Imagem exibindo esmalte mineralizado. A ampliação exhibe espaços desmineralizados entre áreas mineralizadas. (B) Imagem com áreas de esmalte mineralizado entre zonas desmineralizadas. (C) Imagem de área desmineralizada mais extensa. (D) Imagem exibindo parede mineralizada. 20

Figura 3 – Perfil da concentração mineral ($\text{gHAp} \times \text{cm}^{-3}$) em função da profundidade (μm) de acordo com os dentifrícios experimentais. Setas indicam laminações. 24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios de dureza superficial em função da carga e tipo de dureza, e perda integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN) de acordo com os dentifrícios (n = 10) 21
- Tabela 2** – Valores médios de concentração mineral ($\text{gHAp} \times \text{cm}^{-3}$) do esmalte hígido e da camada externa do esmalte pós ciclagem, concentração mineral integrada (ΔIMC) da desmineralização do esmalte, corpo da lesão e camada externa, profundidade da desmineralização e corpo da lesão, e espessura da camada superficial obtidos por microtomografia síncrotron dos blocos de acordo com os dentifrícios (n = 10) 22
- Tabela 3** – Correlação de Pearson entre dureza superficial, perda integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN), concentração mineral ($\text{gHAp} \times \text{cm}^{-3}$) da camada externa do esmalte, concentração mineral integrada (ΔIMC) da desmineralização do esmalte, corpo da lesão e camada externa ($\text{gHAp} \times \text{cm}^{-3} \times \mu\text{m}$), profundidade da desmineralização e corpo da lesão e espessura da camada superficial (μm) a partir dos valores médios das variáveis dos tratamentos (n = 10) 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SMCT	Microtomografia Síncrotron
TMR	Microradiografia Transversal
CMI	Concentração mineral integrada
NaF	Fluoreto de sódio
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de Sódio
TISAB	Total ionic strenght adjustment buffer – Tampão ajustador de força iônica
F	Flúor
Rpm	Rotações por minuto
KHN	Knoop Hardness Number – número de dureza Knoop
VHN	Vickers Hardness Number – número de dureza Vickers
CM	Concentração mineral
LAC	Linear attenuation coefficient – Coeficiente de atenuação linear
ANOVA	Análise de Variância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 Delineamento experimental	13
2.2 Preparo dos blocos de esmalte bovino	13
2.3 Composição dos dentifrícios e determinação de fluoreto	14
2.4 Ciclagem de pH	15
2.5 Determinação da dureza	15
2.6 Análise da concentração mineral pela microtomografia síncrotron	16
2.7 Análise estatística	17
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma das doenças bucais mais prevalentes no mundo, caracterizada como uma condição dinâmica, multifatorial e não transmissível, mediada por biofilme e modulada pela dieta (1). Essa doença resulta em sucessivos ciclos de desmineralização e remineralização dos tecidos duros dentais (1,2). Os estudos *in vitro* desempenham um papel crucial na compreensão dos mecanismos de desmineralização e remineralização. Esses modelos experimentais permitem gerar dados quantitativos suficientes, fundamentais para o desenvolvimento de pesquisas clínicas com segurança (3). Inicialmente, os modelos *in vitro* avaliavam separadamente os efeitos do flúor em sistemas estáticos (4), mas a introdução de modelos dinâmicos, como o proposto por ten Cate e Duijsters (5), trouxe avanços significativos ao simular os ciclos alternados de desmineralização e remineralização que ocorrem *in vivo*. Diversos modelos de ciclagem de pH foram desenvolvidos, e os estudos *in vitro* passaram a ter grande relevância na investigação quanto à progressão ou remineralização da cárie dentária, tornando-se uma ferramenta importante para o avanço de estratégias de prevenção e tratamento da cárie dentária.

Atualmente, diversas abordagens são aplicadas para investigar os níveis de desmineralização e remineralização do esmalte dentário. Dentre elas, os testes de microdureza se destacam por sua ampla utilização nesta área (6–9). Este método é rápido, simples e exige apenas uma pequena porção da superfície do espécime para análise (10), funcionando por meio de penetração (11). Os indentadores Vickers e Knoop são aplicados com uma força constante durante um período de tempo, e a dureza é determinada pela área projetada da indentação após a remoção da carga (12). O indentador Vickers possui formato piramidal, enquanto o Knoop apresenta uma configuração trapezoidal, com uma proporção diagonal assimétrica de 7:1, resultando em uma penetração mais rasa comparada ao Vickers (12,13). A escolha entre os indentadores varia entre autores. Gutiérrez-Salazar e Reyes-Gasga [2003] (14) propõem o uso do Vickers devido à sua forma quadrada que deve ser sempre consistente e, em uma superfície irregular, um pequeno alongamento das diagonais das indentações, que produzem erros em medições de dureza, é facilmente detectado. Por outro lado, Meredith et al. [1956] (15) apontam o Knoop como mais utilizado. Sua indentação mais longa e rasa, minimiza rachaduras em materiais frágeis, além de ser mais fácil de medir (16).

Em contraste, a microtomografia síncrotron (SMCT) é uma técnica avançada que utiliza raios X de alta intensidade gerados por aceleradores de partículas (17). Os feixes de raios X provenientes de uma máquina de luz síncrotron são extremamente intensos e colimados (17), proporcionando medições precisas do coeficiente de atenuação linear, sem a necessidade de correções por luz policromática (18). Esse método é bem estabelecido para determinar o grau de mineralização no tecido ósseo (19), mostrando-se promissor como um método não destrutivo de validação para a presença e profundidade de desmineralização-remineralização dentária (19–21). Apesar de sistemas laboratoriais de microtomografia serem amplamente utilizados, somente a SMCT combina o conjunto alta resolução de contraste, alta resolução espacial e mensuração precisa do coeficiente de atenuação linear (18). A única desvantagem real dos sistemas síncrotron é a disponibilidade limitada da fonte e o alto custo do "tempo de feixe" (22).

A SMCT permite quantificar o conteúdo mineral do esmalte bovino (20), sendo que, em alguns estudos, quantificações do conteúdo mineral são obtidos também através de perfis de dureza (10,23). No entanto, alguns autores desaconselham o uso de perfis de micro ou nanodureza para o cálculo do conteúdo mineral (13,24). Ademais, estudos divergem ainda sobre o uso da microdureza superficial para avaliar a concentração mineral em tecidos dentários. Vieira et al. [2017] (25) apoia seu uso como um método rápido e direto para avaliar a perda mineral. Por outro lado, Lippert et al. [2015] (26) propõe que a dureza superficial seja usada como uma medida complementar à microradiografia transversal (TMR), fornecendo informações estruturais adicionais, mas ressalta que técnicas de dureza devem ser usadas com cautela no estudo de desmineralização e remineralização de lesões de cárie.

Conforme mencionado, a SMCT é reconhecida por ser uma técnica avançada e com alta qualidade, podendo ser utilizada em estudos de desmineralização-remineralização. No entanto, seu alto custo e difícil acesso limitam sua aplicabilidade. Por outro lado, a microdureza é uma alternativa mais acessível, mas sua confiabilidade para avaliar processos de desmineralização-remineralização ainda é questionada. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os padrões de desmineralização no esmalte bovino usando medições de dureza superficial utilizando variadas cargas e indentadores (Knoop e Vickers), dureza em secção longitudinal e SMCT, correlacionando os dados obtidos e verificando a viabilidade

dos testes de dureza como uma alternativa ao uso da SMCT. O estudo empregou lesões criadas por uma técnica de ciclagem de pH, que incluiu tratamento com dentifrícios contendo diferentes concentrações de flúor. A hipótese nula testada foi de que não haveria correlação significativa entre dados de dureza e SMCT.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Quarenta blocos de esmalte (4×4 mm) foram obtidos a partir de incisivos bovinos recém-extraídos, sem trincas, hipoplasias, fraturas ou erosões. As amostras de esmalte foram previamente polidas e medições iniciais de dureza superficial Knoop e Vickers foram realizadas para eliminar blocos com propriedades anômalas antes de prosseguir com os testes. Os blocos foram submetidos a um modelo de ciclagem de pH (27), e tratados com dentifrício placebo ou fluoretados diluídos em água deionizada. O cálculo amostral ($n = 10$ blocos/grupo) foi baseado em um estudo prévio (11), considerando as variáveis dureza e concentração mineral, um erro- α de 5% e um erro- β de 20%. A concentração de flúor nos dentifrícios foi variada, e as variáveis utilizadas para quantificar os efeitos foram dureza superficial, dureza em secção longitudinal, concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) da camada externa do esmalte, concentração mineral integrada (ΔIMC) da desmineralização do esmalte, corpo da lesão e camada externa, profundidade da desmineralização e do corpo da lesão, e espessura da camada superficial fornecidos pela SMCT.

2.2 Preparo dos blocos de esmalte bovino

Para a realização deste estudo foram selecionados 40 incisivos bovinos recém-extraídos, sem trincas, hipoplasias, fraturas ou erosões. Como os dentes bovinos foram obtidos dos descartes post mortem de animais criados para o abate comercial (artigo 1º, parágrafo 3º, Lei nº 11.794/08, de 8 de outubro de 2008), e a experimentação animal é definida como procedimentos conduzidos em animais vivos (artigo 3º, Lei nº 11.794/08, de 8 de outubro de 2008), o estudo não necessitou de prévia aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais. Os debris orgânicos foram removidos utilizando cureta periodontal e as coroas foram limpas com pedra-

pomes e escova de Robson. Os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% até que fosse iniciado o experimento.

Os dentes tiveram as raízes separadas da coroa na junção amelo-cementária utilizando disco diamantado dupla face (KG Sorensen D 91, KG Sorensen, Serra, ES, Brasil), sob refrigeração em água deionizada. As coroas foram seccionadas na região cervical da superfície vestibular, no sentido longitudinal e transversal, utilizando 2 discos diamantados (11-4243 série 15HC – Diamond BUEHLER) separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura, montados em cortadeira (Isomet Low Speed Saw – Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) sob refrigeração com água deionizada.

Após a obtenção dos blocos, as superfícies da dentina foram planificadas e as do esmalte foram sequencialmente polidas na máquina de polimento (Vector-Phoenix Beta, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) com lixas autoadesivas de carbetto de silício nas granulações #600, #800 e #1200 (Extec Corp, Enfield, CT, EUA), 1,8 kg, 200 rpm, durante 30 s sob constante irrigação com água. Ao final do uso de cada lixa, os blocos foram limpos em água deionizada utilizando ultrassom (Unique USC 1400, Indaiatuba, SP, Brazil), operado a 40 Hz e 135 W durante 20 minutos a temperatura ambiente (28). Este procedimento levou a remoção do esmalte superficial ($\approx 150\text{--}200\ \mu\text{m}$), dependendo da curvatura da superfície do esmalte). O polimento final foi realizado com discos de feltro umedecidos com solução diamantada de $0,25\ \mu$ (Extec Corp, Enfield, CT, EUA). A seguir, os blocos foram novamente lavados em ultrassom como descrito previamente.

2.3 Composição dos dentifrícios e determinação de fluoreto

Os dentifrícios experimentais foram preparados em laboratório contendo os seguintes ingredientes: carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina sódica, óleo de menta, glicerol, sílica hidratada, dióxido de titânio, lauril sulfato de sódio e água. O Fluoreto de sódio (NaF, Merck, Darmstadt, Germany) foi adicionado à formulação nas concentrações de 275, 550 e 1100 ppm F. O dentifrício placebo possuía a mesma composição, exceto pelo fluoreto de sódio. A análise do fluoreto presente nos dentifrícios foi realizada conforme Delbem et al. [2009] (13). Após a dispersão em água (1:3), uma amostra da suspensão foi tratada com HCl $2\ \text{mol L}^{-1}$ (ácido clorídrico) para a avaliação do flúor total e tamponada com NaOH 1

mol L⁻¹ (hidróxido de sódio). Para a análise do flúor iônico, os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação (906 × *g*, 20 minutos). O mesmo volume de solução tampão TISAB II (Orion Research Inc., Beverly, Mass., EUA) foi adicionado às soluções. As medições de flúor foram realizadas com um eletrodo íon-seletivo Orion 96-09 (Orion Research) e um analisador de íons Orion 720 A^{plus} (Orion Research), calibrados com padrões contendo entre 0,125 e 4,0 µg F/mL.

2.4 Ciclagem de pH

Previamente a ciclagem de pH, todas as superfícies de cada bloco de esmalte, exceto a superfície de esmalte polida (área = 16 mm²), foram cobertas com uma fina camada de esmalte de unha (Risqué®, GO, Brazil) (30–32). Durante 5 dias, 40 blocos de esmalte foram submetidos individualmente a um modelo de ciclagem de pH a 37°C (27). O período de desmineralização foi de 6 horas, utilizando uma solução (2,2 mL/mm²) composta por 2,0 mmol L⁻¹ de Ca(NO₃)₂·4H₂O e 2,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, 0,04 µg F/mL, com pH 4,7. O período de remineralização foi de 18 horas, com uma solução (1,1 mL/mm²) composta por 1,5 mmol L⁻¹ de Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0,9 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, 0,15 mol L⁻¹ de KCl em tampão cacodilato 0,02 mol L⁻¹, 0,05 µg F/mL, com pH 7,0. O regime de tratamento consistiu em imergir todos os blocos (2 mL/bloco) de cada grupo de tratamento em suspensões de dentifrícios placebo ou fluoretados (275, 550 e 1.100 µg F/g) por 1 minuto. Os dentifrícios foram diluídos em água deionizada (1:3 em peso). O tratamento foi realizado duas vezes ao dia, antes e após o período de desmineralização, sob agitação em mesa agitadora circular a 50 rpm (Tecnal, TE-420). Após cada troca de solução, os blocos eram lavados com água deionizada. Após o 5º dia, os blocos foram mantidos em solução remineralizante por mais 2 dias.

2.5 Determinação da dureza

A dureza da superfície inicial do esmalte foi determinada utilizando microdurômetro Shimadzu HMV-2000 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) com penetrador de diamante Knoop e carga de 25 g e 50 g, e penetrador Vickers com cargas de 100 g e 200 g, durante 10 s. As cargas de indentação foram baseadas em estudos prévios (13,15,27,28,35). Em cada bloco de esmalte, 5 indentações para cada penetrador e carga, foram realizadas no centro do bloco de esmalte, com

espaçamentos de 100 μm entre elas; e espaçamento de 200 μm entre as indentações dos diferentes penetradores. Blocos com dureza inicial entre 324 e 380 KHN e 326 e 374 VHN foram selecionados para o experimento. Após a ciclagem de pH, indentações foram realizadas como descrito anteriormente, espaçadas a 100 μm das indentações iniciais para a determinação da dureza de superfície final. Os valores médios foram calculados para cada bloco de acordo com penetrador e carga.

Para determinação da dureza em secção longitudinal após a ciclagem de pH, os blocos de esmalte foram seccionados longitudinalmente através de seu centro e embutidos em resina acrílica com a face cortada exposta e polida. Três fileiras com quatorze indentações cada foram feitas: uma na região central do esmalte exposto e as outras duas espaçadas 100 μm da primeira, aplicando uma carga de 5 gramas por 10 segundos (9,32). As indentações foram realizadas a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130, 220 e 330 μm da superfície externa do esmalte. Os valores médios dos três pontos de medição em cada distância da superfície foram calculados definindo os perfis em secção longitudinal da dureza para os blocos de cada grupo. A área integrada abaixo da curva dos perfis ($\text{KHN} \times \mu\text{m}$) foi calculada usando a regra do trapézio (GraphPad Prism, v. 3.02) em cada profundidade. A diferença entre a área integrada do esmalte desmineralizado e hígido foi calculada para determinar a perda integrada da dureza de subsuperfície (ΔKHN) (9,32,43).

2.6 Análise da concentração mineral pela microtomografia síncrotron

A SMCT foi realizada em dez espécimes de cada grupo na estação magnética de flexão 2-BM da Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory (Argonne, Ill., EUA). Fótons de raios-X com energia de 22,5 keV foram fornecidos por um monocromador de múltiplas camadas duplas (34). O sistema de detecção foi composto por uma câmera CCD de 12 bits $2 \times 2 \text{ k}$ acoplada a um cintilador de CdWO_4 monocristalino por meio de uma lente óptica (2,5 $\times$, Zeiss AXIOPLAN® neofluar). As projeções foram registradas com passo de rotação a 0,12° de 0° a 180° e normalizadas para o detector e não uniformidade do feixe. As projeções das imagens foram reconstruídas em uma grade de $2 \times 2 \text{ k}$ de voxels isotrópicos de 1,45 μm . As imagens foram importadas para o software Image J (versão 1.47, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA) para produzir o perfil de concentração mineral (CM ; $\text{g}_{\text{HAp}} \times \text{cm}^{-3}$; Figura 3) em função da profundidade (μm) com base no

coeficiente de atenuação linear (LAC), seguindo o método de Dowker et al. [2003, 2004] (23,24) e usando o modelo A3. A partir do perfil mineral foram calculados: a concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) do esmalte hígido e da camada externa do esmalte, a concentração mineral integrada (ΔCMI ; $g_{HAp} \times cm^{-3} \times \mu m$) da desmineralização do esmalte (obtida pela diferença entre a CM do esmalte hígido e a CM do esmalte desmineralizado), ΔCMI – Corpo da lesão (obtida pela diferença entre a CM do esmalte hígido e a CM do corpo da lesão), ΔCMI – Camada externa (obtida pela diferença entre a CM do esmalte hígido e a CM da camada externa), a profundidade da desmineralização (μm) e do corpo da lesão (μm), e a espessura da camada superficial (μm).

2.7 Análise estatística

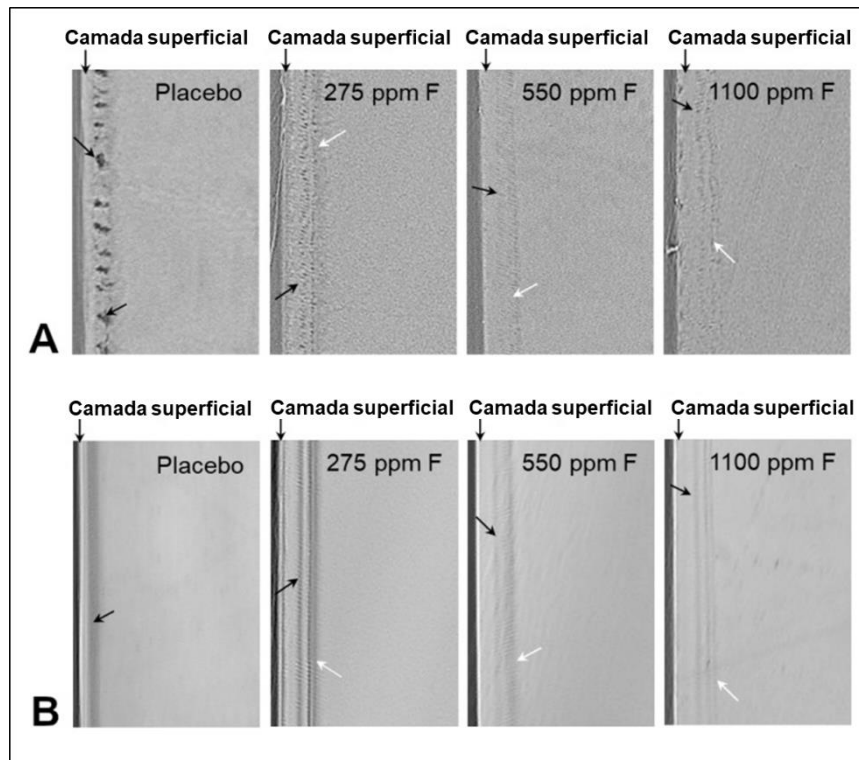
O software SigmaPlot (versão 12.0) foi utilizado para as análises estatísticas, com o limite de significância estabelecido em 5%. Para as variáveis da dureza de superfície inicial e final, foram considerados como fatores de variação o tipo de penetrador, a carga e a concentração de fluoreto nos dentífricos. Os dados apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Cochran) e foram submetidos a análise de variância a dois critérios de medidas repetidas seguidos pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. A variável perda integrada da dureza de subsuperfície apresentou distribuição normal e homocedasticidade e foi submetida a análise de variância a um critério seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. As variáveis obtidas das análises pela microtomografia síncrotron mostraram distribuição normal e homocedasticidade e foram submetidos à análise de variância a um critério seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. As correlações entre os dados obtidos pelos ensaios de dureza de superfície e em secção longitudinal e pela microtomografia síncrotron foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Pearson, seguindo a interpretação proposta por Schober et al. [2018] (35), sendo 0,00–0,10 correlação insignificante, 0,10–0,39 correlação fraca, 0,40–0,69 correlação moderada, 0,70–0,89 correlação forte e 0,90–1,00 correlação muito forte.

3. RESULTADOS

Os valores (média $\pm$ desvio-padrão) da concentração de flúor total e flúor iônico nos dentifrícios experimentais (placebo, 275, 550 e 1.100 mg F/g) foram, respectivamente: $9,1 \pm 0,3$ e $9,1 \pm 0,7$; $284,2 \pm 4,2$ e $271,0 \pm 3,7$; $551,1 \pm 12,8$ e $546,2 \pm 6,9$; $1.213,4 \pm 15,2$ e $1.185,9 \pm 25,2$.

O modelo de ciclagem de pH levou a formação de lesão de subsuperfície com a presença de laminação quando os blocos foram tratados com dentifrícios fluoretados (Figura 1). A Figura 1-A mostra uma fatia de 1,45 μ m dos grupos placebo ou fluoretados, e a Figura 1-B ilustra a sobreposição de 100 fatias. As imagens mostram que a desmineralização ocorreu em camadas nos dentifrícios fluoretados, configurando as laminações. Tons de cinzas mais escuro foram observados na área de lesão dos blocos tratados com o dentifrício placebo. O aumento da concentração de fluoreto nos dentifrícios levaram a tons de cinzas mais claros na área da lesão.

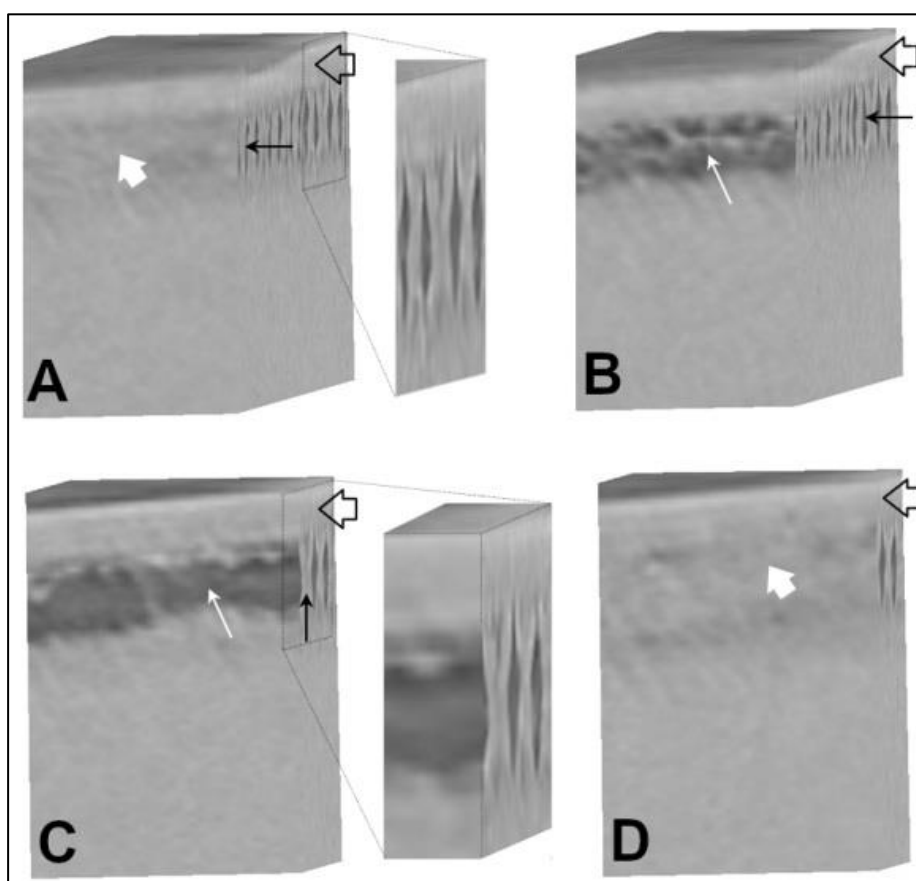
Figura 1 – Imagens dos blocos de esmalte bovino após ciclagem de pH por SCMT de acordo com os dentifrícios experimentais.



Legenda: (A) Imagens com espessura de 1 voxel (1,45 μm) destacando as regiões desmineralizadas indicadas por setas. (B) Imagens com sobreposição de 100 fatias de 1,45 μm de espessura. Setas pretas verticais indicam camada de superfície. Setas inclinadas pretas indicam a desmineralização de subsuperfície e brancas destacam as laminações. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A Figura 2 apresenta diferentes cortes em 3D de um bloco do grupo placebo, exibindo a morfologia da lesão artificial de cárie de subsuperfície em diferentes camadas. A região do corpo da lesão é formada por espaços vazios ou parcialmente vazios delimitado por paredes de esmalte mineralizado com um formato de um losango afilado. A camada de superfície apresenta-se bem delimitada e integra.

Figura 2 – Imagens em 3D representativas obtidas por meio de SCMT de um bloco do grupo placebo ilustrando a morfologia da lesão artificial de cárie de subsuperfície. Setas pequenas brancas indicam espaços vazios do esmalte desmineralizado do corpo da lesão. Setas grandes brancas indicam as paredes de esmalte mineralizado que separam os espaços vazios. Setas pretas abertas mostram a camada superficial mineralizada. Setas pequenas horizontais pretas indicam abertura do espaço vazio desmineralizado. Setas pequenas verticais pretas mostram esmalte mineralizado entre as aberturas do espaço vazio desmineralizado.



Legenda: (A) Imagem exibindo esmalte mineralizado. A ampliação exhibe espaços desmineralizados entre áreas mineralizadas. (B) Imagem com áreas de esmalte mineralizado entre zonas desmineralizadas. (C) Imagem de área desmineralizada mais extensa. (D) Imagem exibindo parede mineralizada. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A média $\pm$ desvio-padrão da dureza de superfície (KHN, VHN) inicial e final dos grupos de tratamento, assim como a perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN) é exibida na tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios de dureza superficial em função da carga e tipo de dureza, e perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN) de acordo com os dentifrícios (n = 10)

Variáveis		Dentifrícios			
		Placebo	275 ppm F	550 ppm F	1100 ppm F
*KHN – 25 g	Inicial	354,6 ^a (15,7)	353,6 ^a (14,2)	350,4 ^a (15,3)	357,5 ^a (13,8)
	Final	58,0 ^b (26,1)	106,4 ^c (32,8)	145,0 ^d (31,5)	233,7 ^e (20,6)
KHN – 50 g	Inicial	340,5 ^a (13,1)	336,1 ^a (8,7)	343,0 ^a (11,9)	340,3 ^a (9,4)
	Final	43,5 ^b (19,6)	110,1 ^c (24,2)	159,3 ^d (35,7)	221,5 ^e (14,6)
#VHN – 100 g	Inicial	352,2 ^a (13,7)	355,8 ^a (12,0)	354,7 ^a (11,9)	357,0 ^a (8,8)
	Final	26,7 ^b (9,5)	94,8 ^c (21,0)	168,1 ^d (15,0)	208,1 ^e (10,1)
VHN – 200 g	Inicial	347,8 ^a (9,8)	345,5 ^a (10,4)	349,9 ^a (9,4)	347,0 ^a (8,5)
	Final	41,5 ^b (12,8)	91,9 ^c (28,1)	153,1 ^d (18,5)	190,8 ^e (13,7)
ΔKHN (KHN $\times$ μm)		11,129,4 ^a (784,7)	9,415,2 ^b (1,041,2)	7,897,6 ^c (663,5)	5,475,3 ^d (863,5)

*KHN: Dureza Knoop. #VHN: Dureza Vickers. Letras distintas representam diferenças estatísticas entre dentifrícios e entre os diferentes momentos da realização da dureza para cada tipo de dureza e carga (ANOVA a 2 critérios; $p < 0.05$,) entre os grupos. Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os ensaios de dureza de superfície inicial mostraram valores similares ($p \geq 0,590$) entre os tratamentos em cada tipo de dureza e carga. Após a ciclagem de pH, os valores de dureza de superfície final para cada tipo de teste e carga foram distintos entre os dentifrícios experimentais ($p < 0,001$), exibindo relação dose-resposta significativa, diferindo dos valores iniciais ($p < 0,001$). Grupos com maiores concentrações de fluoreto nos dentifrícios apresentaram menor perda integrada da dureza de subsuperfície.

Os dados obtidos da análise dos blocos de esmalte por microtomografia síncrotron foram descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios de concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) do esmalte hígido e da camada externa do esmalte pós ciclagem, concentração mineral integrada (ΔIMC) da desmineralização do esmalte, corpo da lesão e camada externa, profundidade da desmineralização e corpo da lesão, e espessura da camada superficial obtidos por microtomografia síncrotron dos blocos de acordo com os dentifrícios (n = 10)

Variáveis	Dentifrícios			
	Placebo	275 ppm F	550 ppm F	1100 ppm F
Esmalte hígido	2,49 ^a (0,00)	2,49 ^a (0,00)	2,49 ^a (0,01)	2,49 ^a (0,00)
Camada externa do esmalte pós ciclagem	2,37 ^a (0,05)	2,57 ^b (0,08)	2,72 ^c (0,11)	2,89 ^d (0,13)
ΔIMC ($g_{HAp} \times cm^{-3} \times \mu m$)	-27,2 ^a (9,9)	-14,9 ^b (3,1)	-8,8 ^c (3,5)	-2,1 ^d (1,7)
ΔIMC – Corpo da lesão ($g_{HAp} \times cm^{-3} \times \mu m$)	-19,6 ^a (4,4)	-13,9 ^b (3,0)	-6,8 ^c (2,9)	-2,9 ^d (1,5)
ΔIMC – Camada externa ($g_{HAp} \times cm^{-3} \times \mu m$)	-0,54 ^a (0,09)	0,05 ^b (0,35)	1,21 ^c (0,83)	1,74 ^d (0,55)
Profundidade de desmineralização (μm)	124,6 ^a (50,4)	76,0 ^b (13,9)	127,3 ^a (24,7)	78,7 ^b (12,5)
Profundidade do corpo da lesão (μm)	39,0 ^a (6,4)	42,2 ^{ab} (5,4)	43,6 ^{ab} (3,2)	47,0 ^b (5,1)
Espessura da camada de superfície (μm)	3,48 ^a (1,22)	3,63 ^a (1,23)	6,82 ^b (2,90)	5,66 ^b (0,82)

Letras distintas representam diferenças estatísticas entre os dentifrícios experimentais em cada variável (ANOVA; $p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

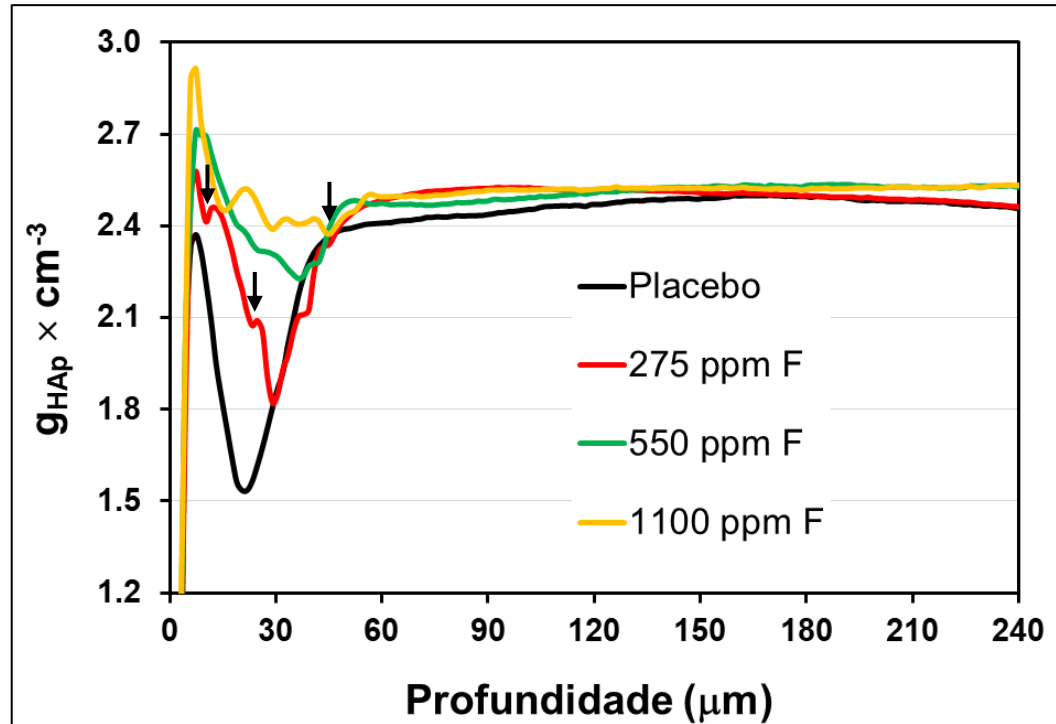
Os valores da concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) do esmalte hígido não diferiram entre os grupos ($p = 0,493$). Após a ciclagem de pH, os valores da concentração mineral da camada externa do esmalte diferiram entre os tratamentos com menor valor para o grupo placebo e maior para o dentifrício contendo 1100 ppm F ($p < 0,001$). Os resultados da concentração mineral integrada do esmalte (ΔIMC) e do corpo da lesão (ΔIMC – Corpo da lesão) mostraram menor perda mineral para o grupo 1100

ppm F < 550 ppm F < 275 ppm F < placebo. Os dados de concentração mineral integrada da camada externa do esmalte (Δ IMC – Camada externa) demonstraram ganho mineral para os dentifrícios fluoretados com maior valor para o 1100 ppm F, e perda para o grupo placebo ($p \leq 0,031$) (Tabela 2).

Os grupos placebo e 550 ppm F apresentaram maior profundidade de desmineralização do esmalte, sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,836$), quando comparado aos grupos 275 e 1100 ppm F ($p = 0,002$), os quais não diferiram entre si ($p = 0,836$). A profundidade do corpo da lesão foi menor no grupo placebo e maior no grupo 1100 ppm F ($p = 0,007$). A espessura da camada de superfície foi semelhante nos grupos 550 e 1100 ppm F ($p = 0,145$), sendo significativamente mais espessa ($p \leq 0,022$) quando comparada aos grupos placebo e 275 ppm F (Tabela 2).

A Figura 3 mostra a representação gráfica do perfil da concentração mineral após a ciclagem de pH nos diferentes grupos experimentais. Os perfis minerais mostram a formação de uma lesão de subsuperfície e a presença de laminações nos grupos contendo fluoreto. Os dentifrícios fluoretados produziram uma camada de superfície com maior concentração mineral quando comparado ao esmalte hígido.

Figura 3 – Perfil da concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) em função da profundidade (μm) de acordo com os dentifrícios experimentais. Setas indicam laminações.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Tabela 3 – Correlação de Pearson entre dureza superficial, perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN), concentração mineral ($g_{HAp} \times cm^{-3}$) da camada externa do esmalte, concentração mineral integrada (Δ IMC) da desmineralização do esmalte, corpo da lesão e camada externa ($g_{HAp} \times cm^{-3} \times \mu m$), profundidade da desmineralização e corpo da lesão e espessura da camada superficial (μm) a partir dos valores médios das variáveis dos tratamentos (n = 10)

Variáveis	Variáveis de dureza				
	KHN 25 g	KHN 50 g	VHN 100 g	VHN 200 g	Δ KHN (KHN $\times \mu m$)
Camada externa do esmalte	r = 0,965 p < 0,001	r = 0,975 p < 0,001	r = 0,954 p < 0,001	r = 0,969 p < 0,001	r = -0,972 p < 0,001
Δ IMC – Esmalte desmineralizado	r = 0,919 p < 0,001	r = 0,932 p < 0,001	r = 0,906 p < 0,001	r = 0,915 p < 0,001	r = -0,912 p < 0,001
Δ IMC – Corpo da lesão	r = 0,933 p < 0,001	r = 0,942 p < 0,001	r = 0,942 p < 0,001	r = 0,953 p < 0,001	r = -0,932 p < 0,001
Δ IMC – Camada externa	r = 0,907 p < 0,001	r = 0,929 p < 0,001	r = 0,920 p < 0,001	r = 0,932 p < 0,001	r = -0,915 p < 0,001
Profundidade de desmineralização	r = -0,536 p < 0,001	r = -0,455 p = 0,003	r = -0,325 p = 0,041	r = -0,381 p = 0,015	r = 0,478 p = 0,002
Profundidade do corpo da lesão	r = 0,208 p = 0,197	r = 0,266 p = 0,097	r = 0,344 p = 0,029	r = 0,241 p = 0,134	r = -0,189 p = 0,243
Espessura da camada superficial	r = 0,588 p < 0,001	r = 0,647 p < 0,001	r = 0,625 p < 0,001	r = 0,644 p < 0,001	r = -0,598 p < 0,001
KHN – 25 g		r = 0,977 p < 0,001	r = 0,946 p < 0,001	r = 0,962 p < 0,001	r = -0,989 p < 0,001
KHN – 50 g			r = 0,982 p < 0,001	r = 0,987 p < 0,001	r = -0,974 p < 0,001
VHN – 100 g				r = 0,989 p < 0,001	r = -0,955 p < 0,001
VHN – 200 g					r = -0,974 p < 0,001

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Uma correlação muito forte (p < 0,001) foi observada entre os dados obtidos pelos ensaios de dureza e os dados de concentração mineral (Camada externa do

esmalte, Δ IMC – Esmalte desmineralizado, Δ IMC – Corpo da lesão e Δ IMC – Camada externa) obtidos pela microtomografia síncrotron (Tabela 3). Houve uma correlação negativa moderada entre profundidade da desmineralização e dureza Knoop (25 g e 50 g), e uma correlação negativa fraca entre profundidade de desmineralização e dureza Vickers (100 g e 200 g), havendo ainda uma correlação positiva moderada entre Δ KHN e profundidade de desmineralização. A variável profundidade do corpo da lesão mostrou uma correlação fraca com as variáveis de dureza. Correlação moderada foi observada entre espessura da camada superficial e os valores de dureza ($p < 0,001$). Correlações positivas muito fortes foram identificadas entre os tipos de indentação e entre as variadas cargas aplicadas nos ensaios de dureza superficial. Correlações negativas muito fortes foram observadas entre os ensaios de dureza superficial e perda integrada da dureza de subsuperfície (Δ KHN).

4. DISCUSSÃO

Os modelos *in vitro* de ciclagem de pH, como descrito por ten Cate e Mundorff-Shrestha [1995] (36), são amplamente usados para estudar a dinâmica da cárie. O modelo de ciclagem de pH desenvolvido por Vieira et al. [2005] (27) para dentes bovinos, com base em estudos anteriores (5), é uma metodologia sensível para verificar a relação dose-resposta do dentífrico fluoretados (37–39). Como um modelo de ciclagem de pH de curto prazo, ele fornece uma desmineralização menor e uma camada de superfície e profundidade de lesão consideradas rasas, simulando o desenvolvimento de cárie sob condições controladas (40). Ao observar uma lesão de cárie em esmalte em microscopia de luz polarizada, a alteração tecidual pode ser evidenciada com a formação de 4 zonas de lesão: zona translúcida, zona escura, corpo da lesão e camada superficial (41). Quando a lesão atinge estágios mais avançados, a zona translúcida passa a estar localizada na parte mais interna da lesão. O tamanho dos cristais nesta zona é de 30 nm. Adjacente à zona translúcida se encontra a zona escura, com o tamanho dos cristais de hidroxiapatita de 50-100 nm. O corpo da lesão é a zona com maior perda mineral, sendo que o tamanho dos cristais varia entre 10 e 30 nm. Há nessa região uma maior desmineralização pela facilidade de acesso a prótons em relação às zonas anteriores mais internas. Na profundidade do corpo da lesão, podem-se encontrar zonas com maior conteúdo mineral, indicando períodos de redeposição mineral em fases alternadas de atividade/controle das

lesões. Por fim, a camada superficial é a camada mais externa da lesão e foi descrita como sendo uma zona que parece “íntacta”, sendo mais estruturada do que o corpo da lesão, mas apresentando ainda intensa desmineralização (42–45). A camada superficial é a porta de entrada para materiais externos ao esmalte. Por isso, sua permeabilidade é relevante ao transporte de agentes remineralizadores (46).

O presente estudo apresentou resultados relevantes sobre a concentração mineral nas diferentes zonas de lesão, com destaque para o corpo da lesão e a camada superficial. Foi feita ainda uma diferenciação entre a profundidade de desmineralização e a profundidade do corpo da lesão. A profundidade de desmineralização refere-se à perda mineral que ocorre desde a superfície até o ponto mais profundo onde a desmineralização foi detectada. Por outro lado, a profundidade do corpo da lesão está relacionada à desmineralização na zona chamada corpo da lesão, que é a área onde ocorre a maior perda de minerais.

Este estudo revelou que valores de dureza aumentaram conforme a concentração de fluoreto nos dentifrícios aumentou, independente das cargas ou indentadores utilizados (Tabela 1), um resultado consistente com pesquisas anteriores (11,47). O aumento da microdureza do esmalte após a aplicação de fluoreto de sódio pode estar relacionado à reação do íon fluoreto com a superfície do esmalte que resultou na formação de compostos contendo flúor, principalmente fluoreto de cálcio (48), que atua como um reservatório e libera fluoreto gradualmente durante futuros ataques ácidos, controlando a solubilidade superficial do esmalte (49). Em acréscimo, no estudo realizado por Delbem et al. [2009] (11), foi observado, por meio da análise de dureza em secção longitudinal, aplicando uma carga de 25 g, que amostras tratadas com dentifrícios placebo apresentaram maior desmineralização do esmalte. Além disso, ao fazer uma comparação entre os grupos com concentrações de 550 e 1100 ppm F, verificou-se uma redução na perda de dureza em secção longitudinal, que foi relacionada ao aumento da concentração de flúor nos dentifrícios. De forma similar, o presente estudo demonstrou que os grupos com maiores concentrações de flúor nos dentifrícios apresentaram menor perda integrada de dureza subsuperficial (Tabela 1). Essa semelhança foi constatada mesmo com a aplicação de cargas distintas entre os estudos.

O flúor atua de forma mais eficaz na camada externa da lesão devido à sua forte interação nesta região (50,51). Devido a isso, notou-se um aumento nos valores de

concentração mineral da camada externa à medida que se elevou a concentração de flúor nos dentifrícios (Tabela 2). Ademais, este estudo demonstrou diferenças significativas no comportamento da desmineralização entre os grupos tratados com diferentes concentrações de fluoreto. O grupo tratado com 275 ppm F apresentou uma profundidade de desmineralização semelhante à do grupo tratado com 1100 ppm F, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Contudo, exibiu maior perda de concentração mineral no corpo da lesão quando comparado ao grupo 550 ppm F e 1100 ppm F (Tabela 2). Esse fenômeno pode ter ocorrido devido à maior penetração de ácido e menor quantidade de fluoreto presente, resultando em uma perda mineral mais acentuada no corpo da lesão.

Em contrapartida, o grupo tratado com 550 ppm F apresentou uma maior profundidade de desmineralização quando comparado com o grupo 275 ppm F, mas houve uma menor perda de concentração mineral integrada no corpo da lesão quando comparado ao grupo 275 ppm F (Tabela 2). Essa diferença pode ser atribuída a maior concentração de íons flúor no grupo 550 ppm F, que penetraram mais efetivamente na lesão, no entanto, isso não impediu também o influxo de ácidos. Como o F é muito reativo com a hidroxiapatita (50), acaba ocorrendo a formação de uma camada superficial quase inerte à dissolução (52), evidenciado pela grande espessura da camada superficial e ganho de concentração mineral da camada externa (Tabela 2). Além disso, o F é depositado dentro das partes mais externas da lesão, evitando assim a perda mineral dentro do corpo da lesão original. O ácido, no entanto, penetra mais profundamente nas partes mais profundas e solúveis da lesão e, eventualmente, desmineraliza o esmalte sadio. O mineral dissolvido difunde-se para fora e alguns provavelmente reprecipitarão novamente em partes ricas em F da lesão (50). Este processo de modo contínuo “empurra” a lesão, aumentando a profundidade de desmineralização. A formação de laminações também pode ocorrer (Figura 1-B e 3). Laminações dentro de lesões foram atribuídas a episódios alternados de des/remineralização e foi observado na presença de flúor que pode ser adsorvido em concentrações variadas em várias profundidades, resultando em diferenças na suscetibilidade ácida do mineral (50,51). As laminações deste estudo são menos visíveis a medida que sobe a concentração de flúor nos grupos (Figura 1-B). Isso se deve à maior disponibilidade de F provido pelo tratamento, que se incorpora nos

espaços livres da estrutura cristalina da apatita e torna os cristais fluoretados mais resistentes à dissolução (49).

No grupo de 1.100 ppm F, a maior concentração de fluoreto permitiu uma penetração mais significativa desses íons no corpo da lesão. Apesar do ácido continuar penetrando e ter alcançado uma profundidade de desmineralização semelhante à do grupo de 275 ppm F, ele encontrou maior dificuldade em dissolver os cristais fluoretados, o que está alinhado com Shahmoradi et al. [2017] (49), que afirma que a incorporação de fluoreto nos espaços livres da estrutura cristalina da apatita torna os cristais fluoretados (fluorapatita ou hidroxifluorapatita) mais resistentes à dissolução e mais fáceis de remineralizar. Isso resultou em uma menor perda da concentração mineral integrada do corpo da lesão em comparação com todos os outros grupos (Tabela 2). Dessa forma, concentrações maiores de F são necessárias para prevenir a perda mineral em partes mais profundas e prevenir a progressão da lesão (50). Em contrapartida, o grupo placebo apresentou uma menor profundidade do corpo da lesão quando comparado ao grupo de 1100 ppm F, mas com a maior perda mineral integrada no corpo da lesão (Tabela 2) entre todos os grupos. A ausência de fluoreto adicional levou a uma passagem facilitada dos ácidos, concentrando a perda mineral no corpo da lesão.

A tabela 3 exibe as correlações do estudo, sendo que foi encontrada uma correlação muito forte entre dados de concentração mineral e os valores de dureza superficial (Tabela 3). Este achado está alinhado com Vieira et al. [2017] (25), que também relatou uma correlação significativa entre dureza superficial e perda mineral integrada subsuperficial ($r=0,839$). Ainda, no estudo atual, uma correlação negativa muito forte foi encontrada entre perda integrada de dureza subsuperficial (ΔKHN) e dados de concentração mineral (Tabela 3). Em contraste, Magalhães et al [2009] (33) apresentaram que a técnica de dureza em secção longitudinal não pode ser usada para estimar o conteúdo mineral de forma confiável. No entanto, grandes diferenças metodológicas são encontradas entre as duas investigações. No estudo citado, os valores de dureza transversal foram convertidos em conteúdo mineral usando as fórmulas de Featherstone et al. [1983] (10) e Kielbassa et al. [1999] (23), sendo realizadas posteriores correlações entre esses valores estimados e os conteúdos minerais determinados diretamente por TMR. No presente estudo, a correlação entre ΔKHN e os dados de concentração mineral foi estabelecida diretamente, sem a

necessidade de conversões para conteúdo mineral, o que pode ter reduzido possíveis erros associados às fórmulas de estimativa empregadas no estudo citado.

A escassez de estudos utilizando microtomografia síncrotron é reflexo de seu alto custo e acesso restrito. Por esta razão, comparações diretas e em condições equivalentes com o presente estudo são limitadas e pouco frequentes. Estudos correlacionando dados de dureza e concentração mineral obtidos por meio de TMR (microradiografia transversal) são mais prevalentes (13,33,52,53). Embora a TMR seja considerada como padrão-ouro para estudos de desmineralização e remineralização (54), a microtomografia síncrotron oferece qualidade superior. Isso se deve ao fato de que a TMR é uma técnica bidimensional (2D), destrutiva e requer amostras com espessura de no mínimo 100 μm (13), não evidenciando claramente o processo de lesão de cárie, pois as imagens sobrepostas impedem a visualização detalhada do processo de desmineralização. Em contraste, a microtomografia síncrotron é uma técnica tridimensional (3D), permitindo ainda análises não destrutivas em fatias de 0,3 a 40 μm , proporcionando maior precisão e preservação das amostras (18).

O presente estudo destacou correlações moderadas e negativas entre dureza superficial Knoop e profundidade de desmineralização, e correlações fracas e negativas entre dureza superficial Vickers e a profundidade de desmineralização. Alkattan e Lippert. [2018] (8) obtiveram resultados onde KHN (50 g) se correlacionou fracamente com a profundidade de desmineralização ($r = -0.35$, $p = 0.0001$). Um outro estudo (13) mostrou uma correlação moderada entre IL-Knoop (comprimento de indentação) e profundidade de desmineralização ($r = 0.650$, $p < 0.001$), e uma correlação forte entre IL-Vickers e profundidade de desmineralização ($r = 0.724$, $p < 0.001$). Em contraste, Magalhães et al. [2009] (33) não encontraram nenhuma correlação entre os dados de comprimento da indentação e a profundidade da lesão. Os dois últimos estudos citados utilizaram os dados do comprimento da indentação para estabelecer as correlações, o que pode limitar sua adequação para comparação com o presente estudo. Além disso, todos os estudos utilizaram dados providos por TMR ao invés de microtomografia síncrotron. A tabela 3 exibe ainda uma correlação moderada entre a espessura da camada superficial e valores de dureza. Esse resultado é incompatível com o encontrado por Magalhães [2009] (33), porém, deve-

se considerar que, neste estudo, novamente, a espessura da camada superficial foi determinada por TMR, o que pode explicar essa divergência.

A partir dos resultados apresentados, a hipótese nula, de que não haveria correlação significativa entre os dados de dureza e a microtomografia síncrotron, foi parcialmente rejeitada, pois o estudo revelou correlações significativas em determinados aspectos analisados, enquanto em outros foram observadas correlações moderadas ou fracas. Dessa forma, ao se avaliar parâmetros como a profundidade da desmineralização ou do corpo da lesão, as técnicas de dureza devem ser vistas como uma ferramenta complementar, empregadas em conjunto com outros métodos mais robustos, como a microtomografia síncrotron.

Foram observadas correlações significativas entre os diferentes tipos de indentação e as diversas cargas aplicadas nos ensaios de dureza (Tabela 3). Resultados semelhantes foram relatados por Lippert et al. [2015] (26), que avaliaram a adequação da microdureza de superfície Knoop e Vickers em comparação à microradiografia transversal (TMR) na análise da desmineralização e remineralização; utilizando cargas de 50 g para Knoop e 200 g para Vickers, o estudo obteve que os dados de dureza se correlacionaram bem entre si. Ademais, Delbem et al [2009] encontraram uma correlação significativa entre dureza superficial pós ciclagem de pH e ΔKHN ($r = -0,933$, $p < 0,001$), sendo similar ao exibido no estudo atual.

A Figura 2 mostra diferentes cortes de um bloco do grupo placebo obtidas por meio de SCMT. Essa figura exhibe a lesão de cárie em diferentes camadas. Estruturalmente, o esmalte dentário é composto por cristais de hidroxiapatita densamente agrupados dispostos em prismas (55). A área que circunda os prismas é denominada região interprismática, na qual os cristais apresentam uma orientação diferente da dos prismas (56). No processo de lesão de cárie de esmalte, com a penetração dos ácidos em seu interior, a região interprismática é dissolvida primeiro, com posterior destruição dos prismas (57). Os prismas consistem em seções que, de certa forma, são independentes umas das outras, sendo que o grau de mineralização pode ser diferente em duas seções adjacentes (58). Isso é evidenciado pela imagem que mostra áreas de esmalte mineralizado entre regiões que já sofreram dissolução, demonstrando que a desmineralização não ocorreu como uma camada homogênea, como a impressão causada pela figura 1-B. Imagens como essas fornecidas pela microtomografia síncrotron fornecem uma visão diferente da exibida por técnicas onde

inúmeras fatias são sobrepostas, impedindo a visualização mais detalhada do processo.

A figura 1-A apresenta uma fatia de 1,45 μm , na qual as regiões desmineralizadas são indicadas por setas. Nota-se que essas áreas se tornam menos evidentes à medida que a concentração de flúor aumenta, sugerindo que a presença de flúor pode ter reduzido a dissolução ácida (25). A sobreposição de 100 fatias é exibida na figura 1-B. Ao observar o grupo placebo, nota-se que as áreas desmineralizadas se sobrepõem, o que pode criar a falsa impressão de que o processo de desmineralização ocorre de maneira homogênea. Além disso, laminações também são visualizadas (fig. 1-B), sendo menos visíveis a medida que se sobe a concentração de flúor nos grupos. Laminações dentro de lesões foram atribuídas à redeposição de minerais durante um período de parada de cárie e subsequente resistência deste mineral à dissolução ácida durante a progressão da cárie (59).

Este estudo evidenciou as variações nas concentrações minerais entre as diferentes camadas formadas em uma lesão de cárie. Até onde é de conhecimento dos autores, não há registros de pesquisas anteriores que tenham diferenciado a concentração mineral da camada externa e do corpo da lesão de maneira semelhante à realizada aqui, além também da profundidade de desmineralização e profundidade do corpo da lesão. A maioria dos estudos disponíveis apresentam tais dados considerando a lesão como um todo. É importante destacar que o comportamento de distribuição da concentração mineral e profundidade apresentado neste estudo está diretamente relacionado a um modelo específico de ciclagem de pH. Portanto, os resultados não podem ser generalizados para outros modelos. A extrapolação dos achados para o esmalte humano também deve ser feita com cautela, considerando diferenças estruturais entre os dois substratos (10,11,60,61). Ainda, o uso de um modelo *in vitro*, embora controlado, não reflete perfeitamente as condições do ambiente bucal *in vivo*, como as interações complexas entre biofilme, dieta e saliva. Essas limitações destacam a necessidade de estudos complementares, preferencialmente aplicando diferentes modelos de ciclagem de pH, ampliando a aplicabilidade dos resultados em contextos experimentais diversos.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados presentes utilizando um modelo de ciclagem de pH proposto por Vieira et al [2005] (27), pode-se concluir que as medidas de dureza revelaram desmineralização em todos os grupos, sendo evidenciado menor perda de concentração mineral nos grupos tratados com dentifrício com maior concentração de F. Técnicas de dureza podem ser usadas no estudo de desmineralização, pois foram feitas fortes correlações com dados de concentração mineral. Contudo, é importante cautela ao utilizar esta abordagem para investigar a profundidade da desmineralização, uma vez que as correlações foram moderadas. Neste sentido, técnicas de dureza devem ser vistas como complementares, empregadas em conjunto com outros métodos mais robustos. A microtomografia síncrotron (SCMT), por sua vez, demonstrou ser uma ferramenta altamente eficaz para o estudo detalhado da desmineralização, fornecendo importantes insights estruturais.

REFERÊNCIAS

1. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7–14.
2. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Untreated Caries: A Systematic Review and Metaregression. *J Dent Res.* maio de 2015;94(5):650–8.
3. Cummins D. Working Group Report 3: Role of Models in Assessing New Agents for Caries Prevention. *Adv Dent Res.* novembro de 1995;9(3):338–9.
4. White DJ, Featherstone JDB. A Longitudinal Microhardness Analysis of Fluoride Dentifrice Effects on Lesion Progression in vitro. *Caries Res.* 1987;21(6):502–12.
5. ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res.* 1982;16(3):201–10.
6. Vieira APM, Danelon M, Fernandes GL, Berretta AA, Buszinski AFM, Dos Santos L, et al. Pomegranate extract in polyphosphate-fluoride mouthwash reduces enamel demineralization. *Clin Oral Investig.* 26 de janeiro de 2024;28(1):119.
7. Souza MDB, Pessan JP, Lodi CS, Souza J a. S, Camargo ER, Souza Neto FN, et al. Toothpaste with Nanosized Trimetaphosphate Reduces Enamel Demineralization. *JDR Clin Trans Res.* julho de 2017;2(3):233–40.
8. Alkattan R, Lippert F, Tang Q, Eckert GJ, Ando M. The influence of hardness and chemical composition on enamel demineralization and subsequent remineralization. *Journal of Dentistry.* 1º de agosto de 2018;75:34–40.
9. Mohd Said SNB, Ekambaram M, Yiu CKY. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paed Dentistry.* maio de 2017;27(3):163–73.
10. Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983;17(5):385–91.
11. Delbem ACB, Sassaki KT, Vieira AEM, Rodrigues E, Bergamaschi M, Stock SR, et al. Comparison of Methods for Evaluating Mineral Loss: Hardness versus Synchrotron Microcomputed Tomography. *Caries Res.* 2009;43(5):359–65.
12. Roubickova A, Tichy A, Vrbova R, Bradna P. Indentation size effect in Knoop and Vickers hardness measurement of dental resin-based composites. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 1º de fevereiro de 2025;162:106823.
13. Lippert F, Lynch RJM. Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Archives of Oral Biology.* 1º de julho de 2014;59(7):704–10.

14. Gutiérrez-Salazar M del P, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mat Res.* junho de 2003;6:367–73.
15. Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SAV. Measurement of the microhardness and young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Archives of Oral Biology.* 1º de junho de 1996;41(6):539–45.
16. Chuenarrom C, Benjakul P, Daosodsai P. Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. *Mat Res.* 2009;12:473–6.
17. Nogueira LP. Microtomografia computadorizada e microfluorescência de raios X por luz síncrotron para avaliação dos efeitos da radiação em microestruturas ósseas de ratos. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2011.
18. Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P. Three-dimensional study of human dental fissure enamel by synchrotron X-ray microtomography. *Eur J Oral Sci.* maio de 2006;114 Suppl 1:353–9; discussion 375-376, 382–3.
19. Kernen F, Waltimo T, Deyhle H, Beckmann F, Stark W, Müller B. Synchrotron radiation-based micro computed tomography in the assessment of dentin de- and re-mineralization. Em: Stock SR, organizador. San Diego, California, USA; 2008 [citado 26 de novembro de 2024]. p. 70780M. Disponível em: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.795231>
20. Delbem A, Vieira AE, Sasaki K, Cannon M, Stock S, Xiao X, et al. Quantitative analysis of mineral content in enamel using synchrotron microtomography and microhardness analysis. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering.* 1º de agosto de 2006;
21. Lautensack J, Rack A, Redenbach C, Zabler S, Fischer H, Gräber HG. In situ demineralisation of human enamel studied by synchrotron-based X-ray microtomography – A descriptive pilot-study. *Micron.* 1º de janeiro de 2013;44:404–9.
22. Davis GR, Wong FSL. X-ray microtomography of bones and teeth. *Physiol Meas* [Internet]. novembro de 1994 [citado 4 de dezembro de 2024];17(3). Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0967-3334/17/3/001>
23. Kielbassa AM, Wrbas KTh, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Archives of Oral Biology.* 1º de março de 1999;44(3):243–51.
24. Buchalla W, Imfeld T, Attin T, Swain MV, Schmidlin PR. Relationship between Nanohardness and Mineral Content of Artificial Carious Enamel Lesions. *Caries Res.* 2008;42(3):157–63.
25. Vieira AEDM, Danelon M, Camara DMD, Rosselli ER, Stock SR, Cannon ML, et al. In vitro effect of amorphous calcium phosphate paste applied for extended

- periods of time on enamel remineralization. *J Appl Oral Sci.* dezembro de 2017;25(6):596–603.
26. Lippert F, Juthani K. Fluoride dose-response of human and bovine enamel artificial caries lesions under pH-cycling conditions. *Clin Oral Invest.* 1º de novembro de 2015;19(8):1947–54.
 27. Vieira AE, Botazzo Delbem AC, Takebayashi Sasaki K, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride Dose Response in pH-Cycling Models Using Bovine Enamel. *Caries Res.* 2005;39(6):514–20.
 28. Favretto CO, Delbem ACB, Moraes JCS, Camargo ER, De Toledo PTA, Pedrini D. Dentinal tubule obliteration using toothpastes containing sodium trimetaphosphate microparticles or nanoparticles. *Clin Oral Invest.* dezembro de 2018;22(9):3021–9.
 29. Delbem ACB, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. *Am J Dent.* junho de 2002;15(3):169–72.
 30. Manarelli MM, Delbem ACB, Binhardi TDR, Pessan JP. In situ remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Clin Oral Invest.* novembro de 2015;19(8):2141–6.
 31. Gonçalves FMC, Delbem ACB, Pessan JP, Nunes GP, Emerenciano NG, Garcia LSG, et al. Remineralizing effect of a fluoridated gel containing sodium hexametaphosphate: An in vitro study. *Archives of Oral Biology.* junho de 2018;90:40–4.
 32. Danelon M, Takeshita EM, Sasaki KT, Delbem ACB. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. *Am J Dent.* fevereiro de 2013;26(1):15–20.
 33. Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MAR. Comparison of Cross-Sectional Hardness and Transverse Microradiography of Artificial Carious Enamel Lesions Induced by Different Demineralising Solutions and Gels. *Caries Res.* 2009;43(6):474–83.
 34. Chu CH, Lo ECM, Lin HC. Effectiveness of silver diamine fluoride and sodium fluoride varnish in arresting dentin caries in Chinese pre-school children. *J Dent Res.* novembro de 2002;81(11):767–70.
 35. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia & Analgesia.* maio de 2018;126(5):1763–8.
 36. ten Cate JM, Mundorff-Shrestha SA. Working Group Report 1: Laboratory models for caries (in vitro and animal models). *Adv Dent Res.* novembro de 1995;9(3):332–4.
 37. Brighenti FL, Delbem ACB, Buzalaf M a. R, Oliveira F a. L, Ribeiro DB, Sasaki KT. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res.* 2006;40(3):239–44.

38. Alves KMRP, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira F a. L, Buzalaf M a. R, et al. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res.* 2007;41(4):263–7.
39. Takeshita EM, Castro LP, Sassaki KT, Delbem ACB. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res.* 2009;43(1):50–6.
40. White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res.* novembro de 1995;9(3):175–93; discussion 194-197.
41. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev.* 1973;3:100–60.
42. Darling AI. The selective attack of caries on the dental enamel. *Ann R Coll Surg Engl.* dezembro de 1961;29(6):354–69.
43. Margolis HC, Zhang YP, Lee CY, Kent RL, Moreno EC. Kinetics of enamel demineralization in vitro. *J Dent Res.* julho de 1999;78(7):1326–35.
44. Silverstone LM. The surface zone in caries and in caries-like lesions produced in vitro. *Br Dent J.* 20 de agosto de 1968;125(4):145–57.
45. Jardim JJ, Maltz M. O papel do flúor no processo de formação e controle da lesão de cárie. *R Fac Odontol Porto Alegre.* 26 de janeiro de 2005;46(1):64–9.
46. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res.* novembro de 2010;89(11):1187–97.
47. Lippert F, Hara AT. Fluoride dose-response of human and bovine enamel caries lesions under remineralizing conditions. *Am J Dent.* agosto de 2012;25(4):205–9.
48. Chaudhary A, Ingle NA, Kaur N, Gupta R. Effect of Fluoridated Dentifrices on Microhardness of Enamel Surface: Invitro Study. *Journal of Advanced Oral Research.* 1º de janeiro de 2013;4(1):11–6.
49. Shahmoradi M, Hunter N, Swain M. Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in the Protection of the Structural and Mechanical Properties of Enamel. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7834905.
50. Lippert F, Butler A, Lynch RJM, Hara AT. Effect of Fluoride, Lesion Baseline Severity and Mineral Distribution on Lesion Progression. *Caries Res.* 2012;46(1):23–30.
51. Lagerweij MD, Ten Cate JM. Acid Susceptibility at Various Depths of pH-Cycled Enamel and Dentine Specimens. *Caries Res.* 2006;40(1):33–7.
52. Lippert F, Churchley D, Lynch RJ. Effect of Lesion Baseline Severity and Mineral Distribution on Remineralization and Progression of Human and Bovine Dentin Caries Lesions. *Caries Res.* 2015;49(5):467–76.

53. Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Yu H, Buzalaf M a. R, et al. Different protocols to produce artificial dentine carious lesions in vitro and in situ: hardness and mineral content correlation. *Caries Res.* 2013;47(2):162–70.
54. Restrepo M, Bussaneli DG, Jeremias F, Cordeiro RCL, Magalhães AC, Palomari Spolidorio DM, et al. Control of White Spot Lesion Adjacent to Orthodontic Bracket with Use of Fluoride Varnish or Chlorhexidine Gel. Lingström P, organizador. *The Scientific World Journal.* janeiro de 2015;2015(1):218452.
55. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(4):481–95.
56. Nanci A, Cate ART. *Oral Histology: Development, Structure, and Function.* Elsevier Health Sciences; 2008. 432 p.
57. Hopewell-Smith A. *The Normal and Pathological Histology of the Mouth.* P. Blakiston's Son & Company; 1914. 380 p.
58. Gustafson G. The Histopathology of Caries of Human Dental Enamel with special reference to the division of the carious lesion into zones. *Acta Odontologica Scandinavica.* janeiro de 1957;15(1):13–55.
59. Driessens FCM, Theuns HM, Heijligers HJM, Borggreven JM. Microradiography and Electron Microprobe Analysis of Some Natural White and Brown Spot Enamel Lesions with and without Laminations. *Caries Res.* 1986;20(5):398–405.
60. Mellberg JR, Loertscher KL. Comparison of in vitro fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res.* 1974;53(1):64–7.
61. Wang C, Fang Y, Zhang L, Su Z, Xu J, Fu B. Enamel microstructural features of bovine and human incisors: A comparative study. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger.* maio de 2021;235:151700.