

Ana **E**lisa De Mello Vieira

APLICAÇÃO DA MICROTOMOGRÁFIA DE
RAIOS-X LABORATORIAL E SÍNCROTRON
EM ESTUDOS IN VITRO UTILIZANDO
DENTE BOVINO E CICLAGEM DE pH

Araçatuba - SP
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ana Elisa De Mello Vieira

APLICAÇÃO DA MICROTOMOGRÁFIA DE
RAIOS-X LABORATORIAL E SÍNCROTRON
EM ESTUDOS IN VITRO UTILIZANDO
DENTE BOVINO E CICLAGEM DE pH

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
Campus de Araçatuba, para obtenção
do título de Doutor em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba - SP
2007

Dados Curriculares

Ana Elisa De Mello Vieira

NASCIMENTO	27/07/1976 - ARAÇATUBA/SP
FILIAÇÃO	Sergio Manoel Moretti Vieira Elisa Aparecida Nunes de Mello Vieira
1995 – 1998	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2000 – 2001	Curso de Especialização em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2001 – 2003	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2003-2006	Professora da Disciplina de Odontopediatria do Curso de Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, Campus de Araçatuba - SP
2003-Atual	Professora das Disciplinas de Odontopediatria e Clínica Odontopediátrica do Curso de Odontologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - SP
2004-2007	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

Ao meu pai Sergio (in memorian),

Sem a lembrança de seu semblante sereno seria impossível chegar até aqui...

Ao meu marido Marcello,

Saiba que a sua presença e compreensão pelo tempo de ausência foi fundamental para a finalização deste trabalho.

À minha mãe Elisa,

À minha avó Aparecida,

Aos meus irmãos Sergio e Helena,

Muito obrigada pelos momentos de oração, atenção e incentivo constante...

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto Carlos B. Delbem,

***Mais uma vez agradeço pela oportunidade de trabalhar
ao seu lado... Pela confiança....***

Pelo grande exemplo de dedicação à pesquisa...

Pelo entusiasmo em aprender cada vez mais...

Ao Prof. Mark Cannon, o grande idealizador deste projeto,

Por acreditar tanto no nosso grupo de pesquisa...

Pelas sugestões...

***Pelo apoio, contatos e envio de todo o material de
pesquisa...***

Pela disponibilidade com que sempre nos recebeu...

Pela amizade e rica convivência...

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba- UNESP, nas pessoas do seu Diretor Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Botacin e Vice-Diretor Prof. Titular Célio Percinoto (2004-2007) e Diretor Prof. Titular Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice-Diretora Profa. Adj. Ana Maria Pires Soubhia (2007)

Por proporcionar a realização de parte desta pesquisa.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Dr. Célio Percinoto, Dr. Robson Frederico Cunha, Dra. Rosângela dos Santos Nery, Dra. Sandra Maria Herondina Ávila de Aguiar,

Muito obrigada pela confiança, orientação, amizade e incentivo constante.

À Prof. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki, vice-coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria e docente da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP,

Pelo auxílio e disponibilidade com que sempre me atendeu.

Aos pesquisadores, Dr. Stuart R. Stock (Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA), Dr. Francesco deCarlo (Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, IL, USA), Dr. Rolando Nuñez (Bisco, Inc., Schaumburg, IL, USA) e Dr. Alexandre Claudio Botazzo Delbem (Departamento de Sistemas de Computação do Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo),

Pelas sugestões durante a fase experimental e de análise de dados.

Às estagiárias Marcelle Danelon e Márcia Regina do Espírito Santo,

Pela valiosa ajuda, empenho e disponibilidade em todos os momentos...

À funcionária Maria dos Santos Ferreira Fernandes,

Pela assistência oferecida durante a fase experimental.

À aluna do curso de Doutorado Eliana Rodrigues,

Pelo auxílio prestado.

Aos estagiários, mestrandos e doutorandos freqüentadores do Laboratório,

Pelo exemplo de companheirismo.

À amiga Luciana Liarte Gasparini Ribeiro,

Sempre presente, na maior torcida...

À Maria Bertolina Mesquita de Oliveira, Mario Luis da Silva e Neusa Martins Rovina Antunes, funcionários do Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP,

Pela eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Diogo Reatto, Marina Midori Sakamoto Hawagoe e Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto,

Pelo excelente profissionalismo.

Às Prof. Dra. Cíntia Megid Barbieri e Isabella D. G. Garcia,

Pela amizade e precioso auxílio.

Ao funcionário da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Cláudio Hideo Matsumoto,

Pela atenção e eficiência que me atendeu.

Ao Curso de Odontologia da FUNEC, Santa Fé do Sul - SP, nas pessoas do seu Presidente Prof. Ademir Gasques Sanches, Diretora Prof. Dr. Eliana Scurciatto e Coordenadora Sâmira Âmbar Lins, e ao Curso de Odontologia da UNIP - Araçatuba, na pessoa de sua Coordenadora Mariliza Comar Astolphi de Carvalho

Pelo incentivo e compreensão durante a fase experimental.

Ao Children's Memorial Hospital (Chicago, IL, USA), na pessoa de Ray J. Jurado, Responsável pelo Division of Dentistry, Dentistry Department and Oral Surgery Department,

Pelo auxílio financeiro para esta pesquisa.

À Bisco, Inc., na pessoa de seu presidente Dr. Byoung Suh,

Pelo auxílio financeiro para esta pesquisa.

À GC América INC., Alsip, IL, USA,

Pelo auxílio financeiro para esta pesquisa.

À Bosworth Company, IL, USA

Pela formulação do selante experimental.

Ao U. S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences (contrato n. W-31-109-Eng-38)

Pela utilização da Advanced Photon Source, no Argonne National Laboratory, Argonne, IL, USA.

Epígrafe

“Toda mudança implica um desequilíbrio momentâneo.

O medo desse desequilíbrio pode ser paralisante.

Se, na tentativa de andar, um bebê não tivesse a coragem

de enfrentar isso, ele nunca andaria.”

(Mário Sérgio Cortella)

Sumário

Resumo.....	12
Abstract.....	13
Introdução geral.....	14
Capítulo 1.....	18
Capítulo 2.....	25
Capítulo 3.....	32
Capítulo 4.....	59
Capítulo 5.....	79

Resumo Geral

VIEIRA, A. E. M. **Aplicação da microtomografia de raios-X laboratorial e síncrotron em estudos in vitro utilizando dente bovino e ciclagem de pH.** Araçatuba, 2007. 101p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista.

O presente trabalho avaliou a capacidade da microtomografia de raios-X (XMT) laboratorial e síncrotron para mensurar coeficientes de absorção linear em escala micrométrica em estudos in vitro utilizando dentes bovinos e ciclagem de pH. Sendo assim, este estudo foi desenvolvido em cinco manuscritos, com os seguintes objetivos: traçar parâmetros e determinar um protocolo para a quantificação do conteúdo mineral de esmalte bovino utilizando XMT laboratorial e síncrotron; analisar a estrutura da junção amelo-dentinária em incisivos bovinos utilizando XMT síncrotron; determinar o potencial anti-cárie do fosfato de cálcio amorfo (ACP) presente em selantes de fósulas e fissuras, utilizando dentes bovinos, ciclagem de pH, microdureza de superfície e XMT síncrotron; e avaliar, através de análise de microdureza de superfície e XMT síncrotron, a capacidade de uma pasta contendo CPP-ACP para ativar a remineralização do esmalte dental. Os resultados obtidos mostram que: a XMT propiciou a determinação da quantidade mineral com uma precisão mais adequada, sendo a melhor resolução espacial obtida através da luz síncrotron; a junção amelo-dentinária apresentou-se menos mineralizada que a dentina ou esmalte; o fosfato de cálcio amorfo presente nos materiais testados não foi capaz de inibir a desmineralização ou ativar a remineralização do esmalte bovino, em ciclagem de pH, tanto quanto os íons flúor. Conclui-se que a XMT é capaz de determinar pequenas alterações na mineralização do dente bovino após ciclagem de pH.

Palavras-chaves: dente - bovinos; in vitro; dureza; tomografia por raios-X; fosfatos de cálcio; selantes de fossas e fissuras; creme dental.

Abstract

VIEIRA, A. E. M. **Applicability of laboratory and synchrotron X-ray microtomography for in vitro studies using bovine tooth and pH-cycling.** Araçatuba, 2007. 101p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

This study evaluated the ability of laboratory and synchrotron X-ray microtomography (XMT) for measuring linear attenuation coefficient at micrometer scale of in vitro studies using bovine teeth and pH-cycling. For that, this study included five papers, with the following aims: to define parameters and a protocol for quantification of mineral content of bovine enamel using laboratory and synchrotron XMT; to analyze the dentinoenamel junction (DEJ) structure in bovine incisors using synchrotron XMT; to determine the anti-caries potential of amorphous calcium phosphate (ACP) in pit and fissure sealants, using bovine teeth, pH-cycling, surface hardness and synchrotron XMT; and to evaluate, through surface hardness analysis and synchrotron XMT, the ability of a CPP-ACP paste to enhance enamel remineralization. The results showed that: XMT provided mineral quantification with an adequate precision; synchrotron microtomography provided the best spatial resolution; DEJ was less mineralized on the average than dentin or enamel; addition of ACP to the materials did not inhibit demineralization or enhance remineralization of bovine enamel in a pH-cycling as fluoride ions. It was possible to conclude that XMT can determine small alterations in the mineralization of bovine tooth after pH-cycling.

Key-words: tooth - cattle; in vitro; hardness; tomography X-ray; calcium phosphate; pit and fissure sealants; toothpaste.

Introdução Geral

A microtomografia de raios-X (XMT) originou-se a partir da tomografia clínica computadorizada. É uma versão microscópica desenvolvida por Elliott and Dover [1982] para mensurar a concentração mineral de ossos e dentes. Além de produzir uma imagem que mostra características internas sem sobreposições, é uma promessa como método não destrutivo para a validação da presença e profundidade da desmineralização-rem mineralização dentária, permitindo a comparação de uma mesma amostra antes e após o procedimento experimental [Davis e Wong, 1996]. Ainda, apresenta as seguintes vantagens: espessura constante de *slíces* [Wong et al., 2004]; coeficientes precisos de atenuação linear de tecidos mineralizados [Kak e Slaney, 2001]; permite a realização de estudos 3D [Dowker et al., 2006]; e o monitoramento em tempo real de mudanças estruturais e de composição, por exemplo, do efeito de processos químicos dinâmicos.

A XMT proporciona uma mapa tri-dimensional do coeficiente de atenuação linear na energia utilizada para que mensurações em uma resolução de poucos micrômetros sejam realizadas. Este coeficiente é determinado inteiramente pelo número e tipo de átomos por unidade de volume. Para usufruir de seus valores, é necessário calcular alguma outra propriedade do esmalte através deles,

como por exemplo a concentração mineral que está diretamente relacionada ao conteúdo mineral, a mais óbvia característica do tecido mineralizado [Dowker et al., 2004].

Dentre os tipos de sistemas de XMT, o laboratorial é o mais amplamente utilizado em pesquisas para a avaliação de tecidos mineralizados. Apesar de alguns destes sistemas proporcionarem uma alta resolução de contraste, o conjunto alta resolução de contraste, alta resolução espacial e mensuração precisa do coeficiente de atenuação linear (sem correções devido à luz policromática) é proporcionado apenas pela XMT síncrotron (tamanho do pixel na faixa de 0,3 a 40 μ m) [Dowker et al., 2006].

Luz síncrotron é a intensa radiação eletromagnética produzida por elétrons de alta energia num acelerador de partículas. Entretanto, a sua disponibilidade é limitada e o custo, altíssimo; como reflexo, há um pequeno número de artigos publicados na literatura em que tecidos mineralizados foram avaliados utilizando este aparato.

O objetivo do presente trabalho, desenvolvido em cinco manuscritos, foi avaliar a capacidade da microtomografia de raios-X (XMT) laboratorial e síncrotron para mensurar coeficientes de absorção linear em escala micrométrica em estudos in vitro utilizando dentes bovinos e ciclagem de pH.

"Quantitative analysis of mineral content in enamel using laboratory microtomography and microhardness analysis" (primeiro capítulo) e "Quantitative analysis of mineral content in enamel using

synchrotron microtomography and microhardness analysis" (segundo capítulo), constituíram estudos pilotos de extrema importância para o desenvolvimento de futuros trabalhos. O objetivo primordial foi traçar parâmetros e determinar um protocolo para a quantificação do conteúdo mineral de esmalte bovino utilizando XMT laboratorial e síncrotron.

O terceiro capítulo, "Synchrotron microComputed tomography of the bovine dentinoenamel junction", refere-se ao estudo da estrutura da junção amelo-dentinária em incisivos bovinos utilizando XMT síncrotron.

No quarto capítulo, "Análise do potencial anti-cárie de selantes liberadores de fosfato de cálcio através de microtomografia síncrotron", o efeito do fosfato de cálcio liberado de materiais utilizados para o selamento de fósulas e fissuras foi avaliado ao interferir com a dinâmica do processo de cárie. A análise das imagens obtidas da XMT síncrotron revelaram resultados inéditos para a área de prevenção da cárie dentária.

O quinto capítulo, "Determinação do conteúdo mineral de esmalte bovino após aplicação de pasta contendo fosfato de cálcio amorfo através de microtomografia síncrotron", refere-se à avaliação da capacidade do fosfato de cálcio amorfo para ativar a remineralização do esmalte dental.

Referências Bibliográficas*

Davis GR, Wong FS: X-ray microtomography of bones and teeth. *Physiol Meas* 1996;17:121-146.

Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P: Synchrotron X-Ray microtomographic investigation of mineral concentrations at micrometer scale in sound and carious enamel. *Caries Res* 2004;38:514-522.

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* 2006;114(Suppl. 1):353-359.

Elliott JC, Dover SD: X-ray microtomography. *J Microsc* 1982;126:211-213.

Kak AC, Slaney M: Principles of computerized tomographic imaging. Philadelphia, Society of Industrial and Applied Mathematics, 2001.

Wong FSL, Anderson P, Fan H, Davis GR: X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. *Arch Oral Biol* 2004;49:937-944.

* de acordo com as normas do periódico internacional *Caries Research*

Capítulo 1

QUANTITATIVE ANALYSIS OF
MINERAL CONTENT IN ENAMEL
USING LABORATORY
MICROTOMOGRAPHY AND
MICROHARDNESS ANALYSIS

Quantitative analysis of mineral content in enamel using laboratory microtomography and microhardness analysis.

A.E.M. Vieira^{a,*}, A.C.B. Delbem^a, K.T. Sassaki^a, M.L. Cannon^b, S.R. Stock^c

^aSão Paulo State University – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brazil;

^bChildren's Memorial Medical Center, Chicago, Illinois, USA;

^cNorthwestern University, Chicago, Illinois, USA.

ABSTRACT

This study evaluates laboratory microtomography and microhardness analysis for quantifying the mineral content of bovine enamel. Fifty enamel blocks were submitted individually for 5 days to a pH-cycling model at 37°C and remained in the remineralizing solution for 2 days. The blocks were treated twice daily for 1 min with NaF dentifrices (Placebo, 275, 550, 1,100 µg F/g and Crest[®]) diluted in deionized water. Surface microhardness changes (%SMH) and mineral loss (ΔZ) were then calculated. Laboratory microtomography was also used to measure total mineral lost (LMM). Pearson's correlation ($p < 0.05$) was used to determine the relationship between different methods of analysis and dose-response between treatments. Dentifrice fluoride concentration and %SMH and ΔZ were correlated ($p < 0.05$). There was a positive relationship ($p < 0.05$) when comparing LMM vs. ΔZ ; a negative relationship ($p < 0.05$) was found for %SMH vs. LMM and %SMH vs. ΔZ . Therefore, both mineral quantification techniques provide adequate precision for studying the bovine enamel-pH-cycling demineralization/remineralization model.

Key-words: enamel; synchrotron microtomography; microhardness.

1. INTRODUCTION

The range of applications of microtomography (microCT) and the number of systems operating worldwide have expanded enormously over the last decade. An analysis of the SPIE Developments in X-ray Tomography series shows an explosion of microCT publications after 2001. X-ray microtomography using laboratory source is an adaptation of the original computerized tomography developed for medical diagnosis.¹ In computed tomography, the internal structure of a specimen is reconstructed digitally from projections recorded along different viewing directions. The aim of this study was to evaluate laboratory microtomography and microhardness analysis for quantifying the mineral content of bovine enamel.

2. METHODOLOGY

2.1 Study design

Enamel blocks (4x4 mm) achieved from bovine incisors had their surfaces sequentially polished, allowing their selection by baseline surface microhardness analysis (SMH). The blocks (n=50) were submitted individually for 5 days to a pH-cycling model at 37° C, and remained in the remineralizing solution for 2 days.² The demineralizing period was set at 6 hours and the solution (2.2 mL/mm²) consisted of Ca and P 2.0 mmol L⁻¹ in acetate buffer 0.075 mol L⁻¹, 0.04µg F/mL at pH 4.7. The remineralizing period was set at 18 hours and the solution (1.1 mL/mm²) consisted of Ca 1.5 mmol L⁻¹, P 0.9 mmol/L, KCl 0.15 mol/L in cacodylate buffer 0.02 mol L⁻¹, 0,05µg F/mL at pH 7.0. The treatment regime consisted of 1-min soaks of all blocks (2 mL/block) of each treatment group in slurries of placebo or fluoride dentifrices (275, 550, 1100µg F/g and Crest[®]). Dentifrices were diluted in deionized water (1:3 in weight). Treatment was performed twice a day (before and after a demineralising period) under agitation.

2.2 Microhardness analysis

After pH-cycling, surface microhardness of the enamel blocks was measured again (SMH₁) using a Shimadzu HMV-2000 microhardness tester with a Knoop diamond under a 25-g load for 10s. Five indentations spaced 100µm from each other and from the baseline were made. The percentage change of surface microhardness [%SMH= $((SMH_1 - SMH)/SMH) \times 100$] was calculated. After SMH analysis, all blocks were longitudinally sectioned through the center of the exposed enamel. To measure cross-sectional microhardness (CSM), half of each block was embedded in acrylic resin and the cut surfaces were exposed and polished. Three rows of 8 indentations each were made, one in the central region of the exposed dental enamel and the other two spaced 100µm from the first one, under a 25-g load for 10s. The indentations were made at 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 and 330µm from the outer enamel surface. The mean values at all 3 measuring points at each distance from the surface were then averaged. CSM values were converted to mineral content (volume % mineral), according to Featherstone et al.³ The integrated area (% vol. min. x µm) of post-pH cycling treatments (Z₁), with projection to normal enamel (Z) was calculated followed by the percentage change of integrated mineral loss [$\Delta Z = ((Z_1 - Z)/Z) \times 100$].

2.3 Laboratory microCT

Laboratory microCT was performed with a Scanco MicroCT-40 system at the Northwestern University MicroCT facility. Four samples of each group were studied with the x-ray tube operated at 45 kVp and with maximum sensitivity (0.3 sec/projection integration, 1000 projections and 2048 samples/projection). Reconstruction was with isotropic 6 µm voxels (volume elements).

Analysis was performed using Image J (Table 1). Six areas were selected in each sample and analyzed up to 330 µm of depth. Voxel values were converted to mineral content (255 pixels = 100% of vol. min.) The integrated area (% vol. min. x µm) of post-pH cycling treatments (Z₁), with projection to normal enamel (Z) was calculated followed by the percentage change of integrated mineral loss [$\Delta Z = ((Z_1 - Z)/Z) \times 100$].

3. RESULTS

Figures 1 and 2 show typical slices. In these figures, the lighter the pixel, the higher the linear attenuation coefficient.

Mean ±sd of total and ionic fluoride concentration (µg F/g) in dentifrices placebo, 275, 450, 550, 1100 and Crest™ were, respectively: 17.4 ±3.3 and 17.2 ±1.4, 235.9 ±12.2 and 235.8 ±9.6, 557.9 ±21.3 and 558.2 ±5.9, 1109.6 ±31.4 and 1105.8 ±11.1, 1223.8 ±22.0 and 1235.0 ±15.6. Mean ±sd value of SMH from all blocks was 332.7 ±5.1. Means ±sd from the treatment groups were set between 329.9 ±2.5 and 336.7 ±5.6. No statistical differences were observed between them (p>0.05). The increase in fluoride concentration in the dentifrices led to lower values (p<0.05) for %SMH and ΔZ. Mean values of % vol. min. (for cross-sectional microhardness and laboratory microCT) at different distances from the enamel surface according to the treatments are shown in Figures 3 and 4.

Pearson's correlation (p<0.05) was used to determine relationships between %SMH, ΔZ and fluoride concentration in dentifrices (Figure 5). A negative correlation was found for dentifrice fluoride concentration vs. ΔZ (cross-sectional microhardness: r=-0.9861; p=0.00100; and laboratory microCT: r=-0.9802; p=0.0018). There was a positive relationship (p<0.05) when comparing fluoride concentration in dentifrices vs. %SMH (r=0.9785; p=0.00280); ΔZ for laboratory microCT vs. ΔZ for cross-sectional

microhardness ($r=0.9855$; $p=0.00020$). Also, there was a negative correlation between %SMH and ΔZ for cross-sectional microhardness ($r=-0.9916$; $p=0.0000001$) and between %SMH and ΔZ for laboratory microCT ($r=-0.9923$; $p=0.0000001$).

4. CONCLUSION

Based on the results of this study, it was possible to conclude that both mineral quantification techniques provide adequate precision for studying the bovine enamel-pH-cycling demineralization/remineralization model.

REFERENCES

1. Elliott JC, Anderson P, Gao XJ, Wong FSL, Davis GR, Dowker SEP, "Application of scanning microradiography and S-Ray microtomography to studies of bones and teeth," *Journal of X-Ray Science and Technology* 4, 102-117 (1994).
2. Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005; **39**: 514-520.
3. 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.

Table 1 – Steps using Image J

RGB color Image \Rightarrow Image/type/8-bit (grayscale)
 \Rightarrow Image/adjust/Brightness/Contrast/auto \Rightarrow Process/Sharpen
 \Rightarrow Process/subtract background/100/white background
 \Rightarrow 200% Zoom \Rightarrow Analyze/Plot Profile

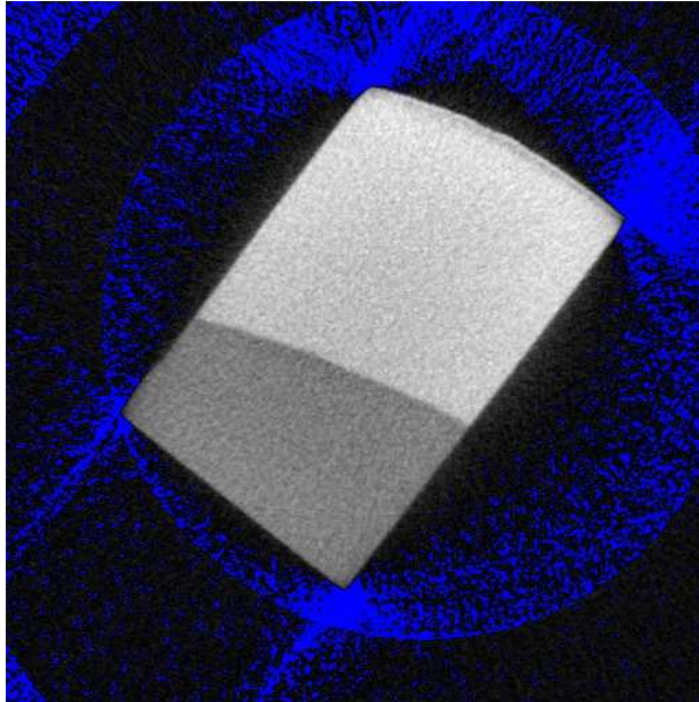


Figure 1. X-ray microCT slice of a typical block after pH-cycling (group placebo). The upper surface is enamel.

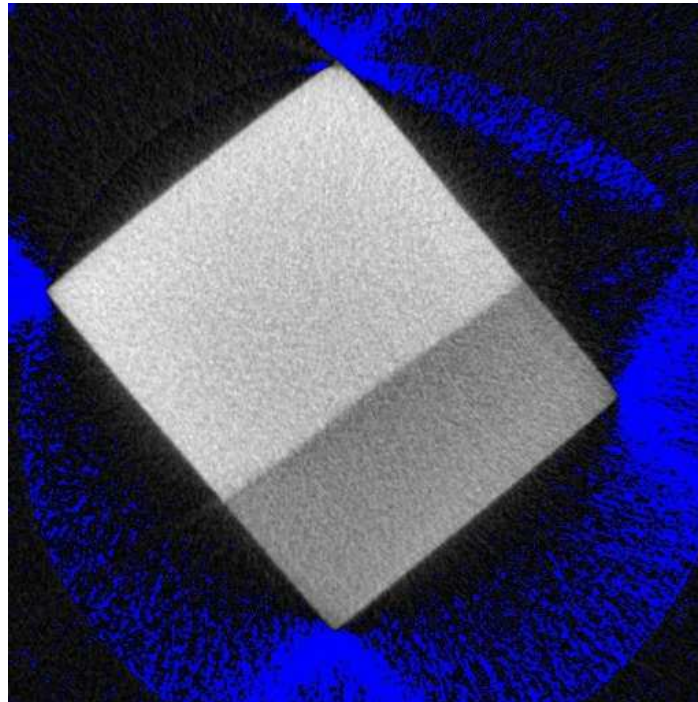


Figure 2. X-ray microCT slice of a typical block after pH-cycling (group 1100). The upper surface is enamel.

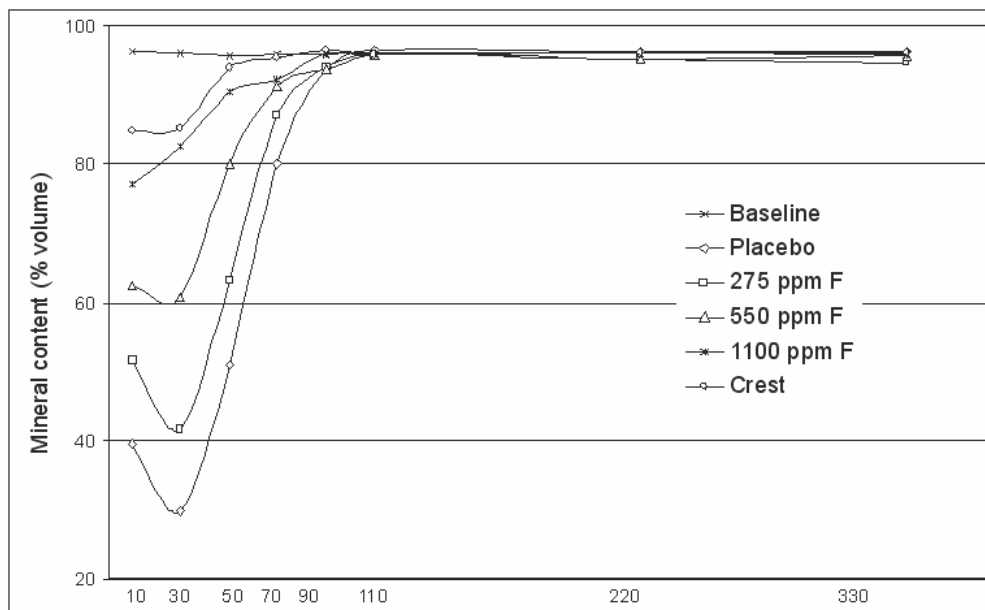


Figure 3. Mean values (n=10) of % vol. min.(CSM) as a function of depth from the enamel surface (horizontal axis is in micrometers) for the indicated treatments.

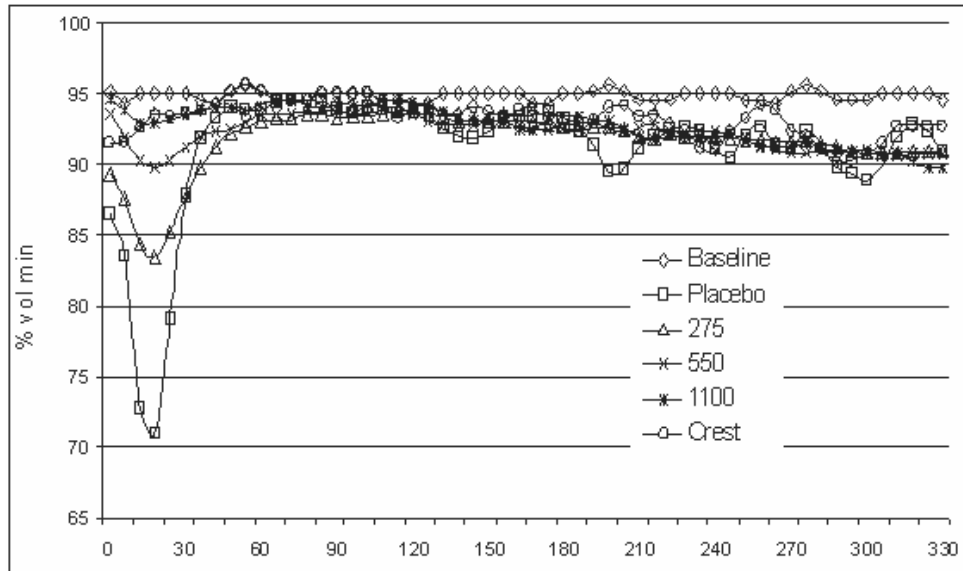


Figure 4. Mean values (n=4) of % vol. min. (lab microCT) as a function of depth from the enamel surface (horizontal axis is in micrometers) for the indicated treatments.

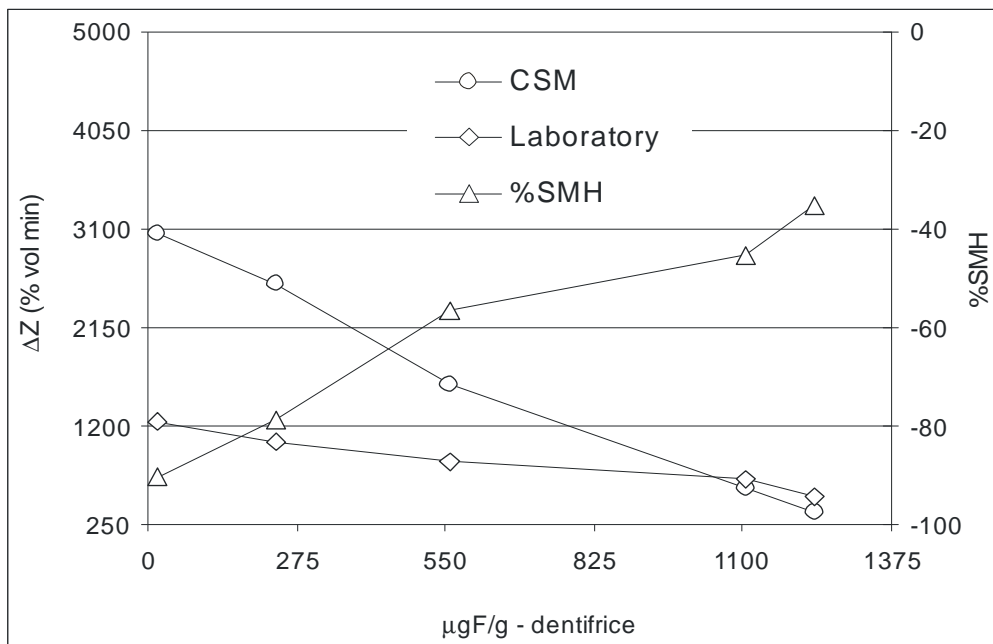


Figure 5. Relationships (Pearson's correlation) between ΔZ (vol. % min.), %SMH and fluoride concentration in dentifrices.

Capítulo 2

QUANTITATIVE ANALYSIS OF
MINERAL CONTENT IN ENAMEL
USING SYNCHROTRON
MICROTOMOGRAPHY AND
MICROHARDNESS ANALYSIS

Quantitative analysis of mineral content in enamel using synchrotron microtomography and microhardness analysis.

A.C.B. Delbem^a, A.E.M. Vieira^{a,*}, K.T. Sasaki^a, M.L. Cannon^b, S.R. Stock^c, X. Xiao^d, F. DeCarlo^d

^aSão Paulo State University – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brazil;

^bChildren's Memorial Medical Center, Chicago, Illinois, USA;

^cNorthwestern University, Chicago, Illinois, USA;

^dXOR, Advanced Photon Source, Argonne National Lab., Argonne, Illinois, USA.

ABSTRACT

Synchrotron microtomography is a tool to quantify the mineralization of dental tissues as well as microhardness analysis, since they provide adequate precision and contrast sensitivity. This study evaluates synchrotron microtomography and microhardness analysis for quantifying the mineral content of bovine enamel. Fifty enamel blocks were submitted individually for 5 days to a pH-cycling model at 37°C and remained in the remineralizing solution for 2 days. The blocks were treated twice daily for 1 min with NaF dentifrices (Placebo, 275, 550, 1,100 µg F/g and Crest®) diluted in deionized water. Surface microhardness changes (%SMH) and mineral loss (ΔZ) were then calculated. Synchrotron microtomography was also used to measure total mineral lost (SMM). Pearson's correlation ($p < 0.05$) was used to determine the relationship between different methods of analysis and dose-response between treatments. Dentifrice fluoride concentration and %SMH and ΔZ were correlated ($p < 0.05$). There was a positive relationship ($p < 0.05$) when comparing SMM vs. ΔZ; a negative relationship ($p < 0.05$) was found for %SMH vs. SMM and %SMH vs. ΔZ. Based on the results of this study, it was possible to conclude that synchrotron microtomography provides the best spatial resolution and contrast sensitivity for quantifying mineral gradients.

Key-words: enamel; synchrotron microtomography; microhardness.

1. INTRODUCTION

Synchrotron microtomography shows promise as a non-destructive method of validation for the presence and depth of tooth demineralization-remineralization. The aim of this study was to evaluate synchrotron microtomography and microhardness analysis for quantifying the mineral content of bovine enamel.

2. METHODOLOGY

2.1 Study design

Enamel blocks (4x4 mm) cut from bovine incisors had their surfaces sequentially polished, allowing their selection by baseline surface microhardness analysis (SMH). The blocks ($n=50$) were submitted individually for 5 days to a pH-cycling model at 37°C, and remained in the remineralizing solution for 2 days.¹ The demineralizing period was set at 6 hours and the solution (2.2 mL/mm²) consisted of Ca and P 2.0 mmol L⁻¹ in acetate buffer 0.075 mol L⁻¹, 0.04µg F/mL at pH 4.7. The remineralizing period was set at 18 hours and the solution (1.1 mL/mm²) consisted of Ca 1.5 mmol L⁻¹, P 0.9 mmol/L, KCl 0.15 mol/L in cacodylate buffer 0.02 mol L⁻¹, 0,05µg F/mL at pH 7.0. The treatment regime consisted of 1-min soaks of all blocks (2 mL/block) of each treatment group in slurries of placebo or fluoride dentifrices (275, 550, 1100µg F/g and Crest®). Dentifrices were diluted in deionized water (1:3 in weight). Treatment was performed twice a day (before and after a demineralising period) under agitation.

2.2 Microhardness analysis

After pH-cycling, surface microhardness of the enamel blocks was measured again (SMH_1) using a Shimadzu HMV-2000 microhardness tester with a Knoop diamond under a 25-g load for 10s. Five indentations spaced 100 μ m from each other and from the baseline were made. The percentage change of surface microhardness [$\%SMH = ((SMH_1 - SMH) / SMH) \times 100$] was calculated. After SMH analysis, all blocks were longitudinally sectioned through the center of the exposed enamel. To measure cross-sectional microhardness (CSM), half of each block was embedded in acrylic resin and the cut surfaces were exposed and polished. Three rows of 8 indentations each were made, one in the central region of the exposed dental enamel and the other two spaced 100 μ m from the first one, under a 25-g load for 10s. The indentations were made at 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 and 330 μ m from the outer enamel surface. The mean values at all 3 measuring points at each distance from the surface were then averaged. CSM values were converted to mineral content (volume % mineral), according to Featherstone et al. (1983). The integrated area (% vol. min. $\times \mu$ m) of post-pH cycling treatments (Z_1), with projection to normal enamel (Z) was calculated followed by the percentage change of integrated mineral loss [$\Delta Z = ((Z_1 - Z) / Z) \times 100$].

2.3 Synchrotron XMT

Synchrotron microCT was performed in four blocks of each group at station 2BM of the Advanced Photon Source (APS). Monochromatic radiation (20 - 27 keV) and a 2K x 2K element CCD camera coupled (via a Zeiss AXIOPLAN® neofluar lens) to a single-crystal CdWO₄ scintillator were used. Views were recorded every 0.25° from 0° to 180° and were normalized for detector and beam nonuniformities. Most specimens were reconstructed on a 2K x 2K grid of isotropic ~2.5 μ m voxels.

Analysis was performed using Image J (Table 1). Six areas were selected in each sample and analyzed up to 330 μ m of depth. Voxel values were converted to mineral content (255 pixels = 100% of vol. min.) The integrated area (% vol. min. $\times \mu$ m) of post-pH cycling treatments (Z_1), with projection to normal enamel (Z) was calculated followed by the percentage change of integrated mineral loss [$\Delta Z = ((Z_1 - Z) / Z) \times 100$].

3. RESULTS

Figure 1 shows a typical slice. Mean \pm sd of total and ionic fluoride concentration (μ g F/g) in dentifrices placebo, 275, 450, 550, 1100 and Crest™ were, respectively: 17.4 \pm 3.3 and 17.2 \pm 1.4, 235.9 \pm 12.2 and 235.8 \pm 9.6, 557.9 \pm 21.3 and 558.2 \pm 5.9, 1109.6 \pm 31.4 and 1105.8 \pm 11.1, 1223.8 \pm 22.0 and 1235.0 \pm 15.6. Mean \pm sd value of SMH from all blocks was 332.7 \pm 5.1. Means \pm sd from the treatment groups were set between 329.9 \pm 2.5 and 336.7 \pm 5.6. No statistical differences were observed between them ($p > 0.05$).

The increase in fluoride concentration in the dentifrices led to lower values for %SMH and ΔZ . Mean values of % vol. min. (for cross-sectional microhardness and synchrotron microCT) at different distances from the enamel surface according to the treatments are shown in Figures 2 and 3. Pearson's correlation ($p < 0.05$) was used to determine relationships between %SMH, ΔZ and fluoride concentration in dentifrices (Figure 4). A negative correlation was found for dentifrice fluoride concentration vs. ΔZ (cross-sectional microhardness: $r = -0.9861$; $p = 0.00100$; and synchrotron microCT: $r = -0.9802$; $p = 0.0018$). There was a positive relationship ($p < 0.05$) when comparing fluoride concentration in dentifrices vs. %SMH ($r = 0.9785$; $p = 0.00280$); ΔZ for synchrotron microCT vs. ΔZ for cross-sectional microhardness ($r = 0.9827$; $p = 0.0008$). Also, there was a negative correlation between %SMH and ΔZ for cross-sectional microhardness ($r =$

0.9916; $p=0.0000001$) and between %SMH and ΔZ for laboratory microCT ($r=-0.9827$; $p=0.0008$).

4. CONCLUSION

Based on the results of this study, it was possible to conclude that synchrotron microtomography provides the best spatial resolution and contrast sensitivity for quantifying mineral gradients.

ACKNOWLEDGMENT

Use of the Advanced Photon Source was supported by the U. S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, under Contract No. W-31-109-Eng-38.

REFERENCES

1. Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005; **39**: 514-520.
2. 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.

Table 1 – Steps using Image J

RGB color Image \Rightarrow Image/type/8-bit (grayscale)
 \Rightarrow Image/adjust/Brightness/Contrast/auto \Rightarrow Process/Sharpen
 \Rightarrow Process/subtract background/100/white background
 \Rightarrow 200% Zoom \Rightarrow Analyze/Plot Profile

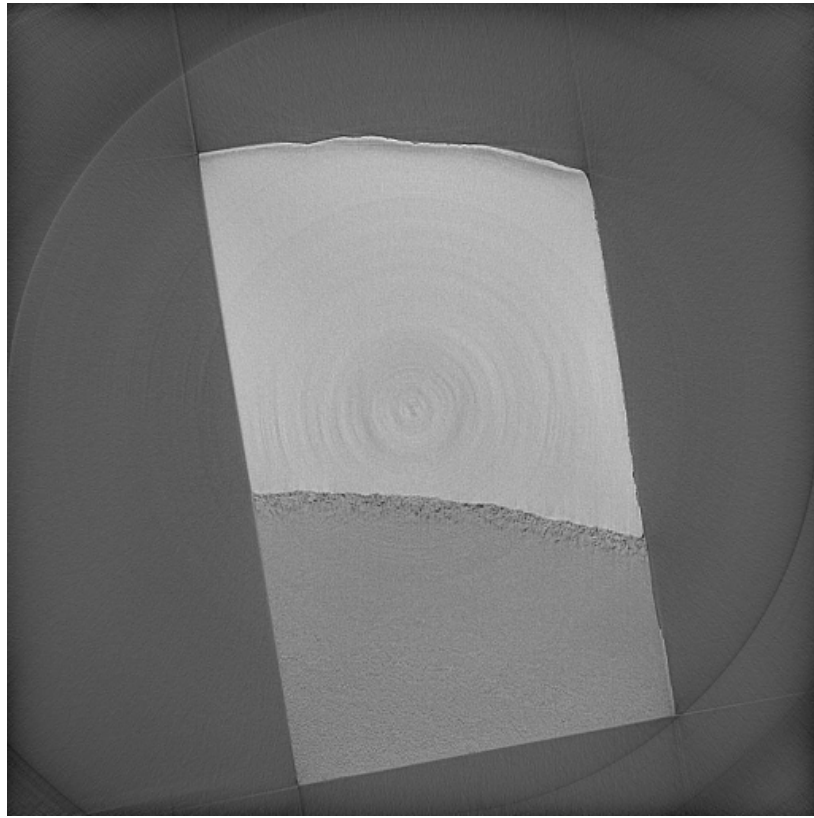


Figure 1. One of several hundred contiguous XMT sections of the block after pH-cycling (group placebo).
The upper surface is enamel.

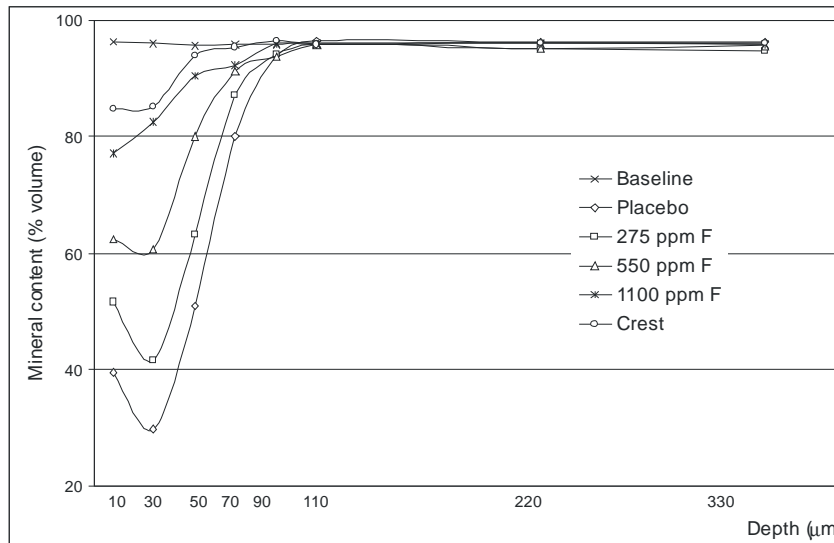


Figure 2. Mean values (n=10) of % vol. min. (CSM) as a function of distance from the enamel surface for the different treatments.

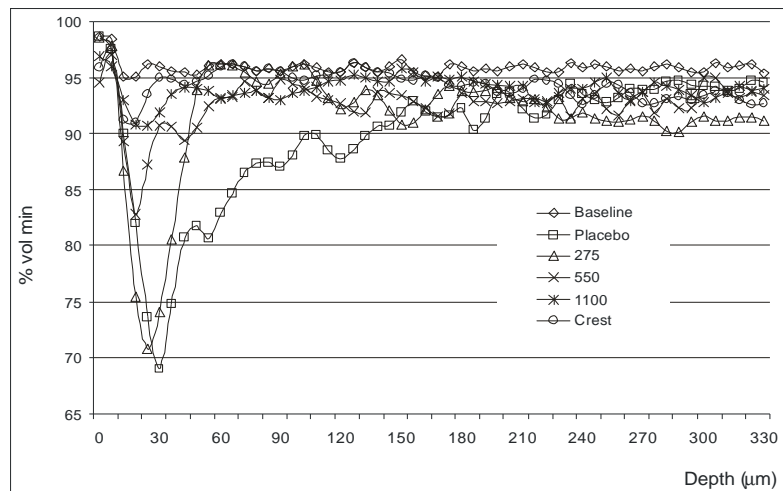


Figure 3. Mean values (n=4) of voxels (synchrotron microCT) as a function of distance from from the enamel surface for the different treatments..

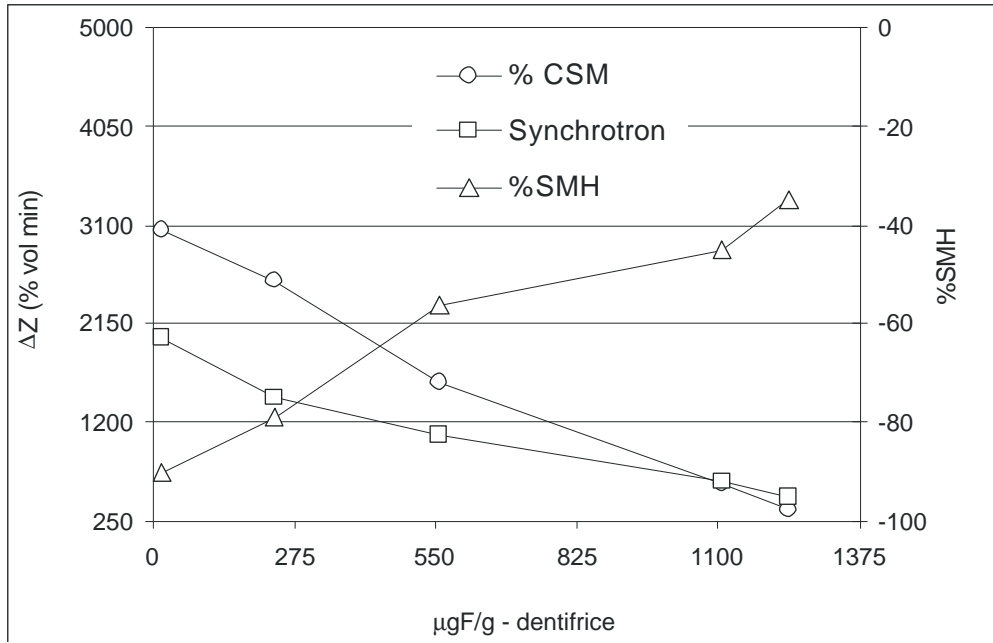


Figure 4. Relationships (Pearson's correlation) between ΔZ (vol. % min.), %SMH and fluoride concentration in dentifrices.

Capítulo 3

SYNCHROTRON
MICROCOMPUTED
TOMOGRAPHY OF THE BOVINE
DENTINOENAMEL JUNCTION

Synchrotron microComputed Tomography of the bovine dentinoenamel junction

S.R. Stock^{1,*}, A.E.M. Vieira², A.C.B. Delbem², M.L. Cannon³, X. Xiao⁴ and F. De Carlo⁴

¹ Dept. of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL USA

² São Paulo State University – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brazil

³ Children's Memorial Medical Center, Chicago, IL, USA

⁴ Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, IL, USA

*Corresponding author: S.R. Stock, s-stock@northwestern.edu

Address: Dept. of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Mail Code S215,
Northwestern Univ., 303 E. Chicago Ave., Chicago IL 60611-3008 USA
Phone: 847-917-7273 FAX: 312-503-2544

Keywords: microCT, dentinoenamel junction (DEJ), dentin, enamel, tooth, synchrotron x-radiation, computed tomography, microtomography

Abstract

The dentinoenamel junction (DEJ) structure in bovine incisors was studied with synchrotron microComputed Tomography (microCT) using small cubes cut parallel to the tooth surface. As demonstrated by the mean linear attenuation coefficients and their standard deviations, the DEJ was less mineralized on the average than dentin or enamel and had more highly variable structure. In the highest resolution data (~1.5 μm isotropic voxels, volume elements) tubules in the dentin could be discerned in the vicinity of the DEJ. The thickness of the DEJ seen in a typical data set was about 30 μm , and this interface deviated ± 15 μm from the nominal DEJ plane over a distance of 520 μm . Reconstructions before and after two cubes were compressed to failure revealed cracks formed only in the enamel and did not propagate across the DEJ, regardless of whether loading was parallel to or perpendicular to the DEJ.

Introduction

Mammalian teeth are complex structures wedding two very dissimilar mineralized tissues, one providing wear resistance and the second fracture resistance. Most of the volume of mineralized tissue of tooth is dentin, and it is clad with a harder material, enamel. Dentin consists of about 70 wt.% (~50 vol.%) carbonated apatite (cAp) with the balance mostly collagen and water (Frank and Nalbandian 1989), and enamel is nearly all cAp (96-98 wt.% and 89-91 vol.%) (Boyde 1989). Dentin is certainly a nanocrystalline reinforced composite, and most authorities also regard enamel as a composite, but, in terms of mechanical function, it would, perhaps, not be too far off the mark to consider it a dense ceramic.

Nanoindentation of human incisors, for example, revealed hardnesses of 4.5-5 and 0.8 GPa for enamel and dentin, respectively, as compared to 7.5 GPa for the prism plane of geological apatite (Fong et al. 2000). Using the conventional conversion formulae, Fong and coworkers determined Young's moduli of 95-100, 25 and 125 GPa, respectively. Acoustic measurements of Young's moduli were in good agreement with the indentation values: 25 GPa for hydrated dentin (Kinney et al. 2004) and between 114 and 120 GPa for inorganic Ap (Gilmore and Katz 1982; Gardner et al. 1992; Sha et al. 1994). Maintaining structural integrity between two joined materials is a significant challenge if their moduli differ by a factor of four, and the evolutionary success of the dentinoenamel junction (DEJ) demonstrates concretely that materials science has much to learn from this design.

The DEJ is a graded interface with properties varying smoothly between the two bounding phases (see Discussion for a précis of prior work). Properties of the DEJ have been determined via indentation or via crack propagation, and its width and spatial variation of properties have been assessed via indentation, microscopy of polished or of thin sections and fractography. These techniques, however, are surface-based and reveal properties or structure only one plane at a time. Building a 3D picture of the DEJ structure is a difficult proposition with 2D sampling techniques, not the least because of the labor involved in serial sectioning and of the possibility of introducing artefacts during specimen preparation.

MicroCT or microComputed tomography allows millimeter or larger sized volumes to be imaged noninvasively and, if synchrotron x-radiation is employed, routinely with spatial resolution approaching that of optical microscopy (Stock 1999). In the past, microCT has been used extensively to study tooth, for example, root canal geometry in whole teeth (Dowker et al. 1997), carious lesions (Elliott et al. 1992) or fracture processes in dentin (Kruzic et al. 2003). In terms of microCT characterization, the DEJ has not received the same attention as the bounding phases, and this paper applies synchrotron microCT to the characterization of the DEJ of bovine incisors. The results presented below are not intended to supply definitive metrics, but rather to indicate profitable directions for future microCT studies of the DEJ and to supplement high energy, x-ray scattering mapping of dentin and enamel internal strains/stresses, on either side of the DEJ, as a function of applied stress, a study reported elsewhere.

Materials and Methods

Specimens were cut from central mandibular incisors of *Bos taurus* (domestic cow), and one block was cut from the buccal mid-crown area of each incisor. The dimensions of each block were either 4 x 4 mm² or 3 x 3 mm² parallel to the surface of the crown and somewhat longer perpendicular to the surface. The DEJ was more-or-less parallel to the tooth (enamel) surface. Some blocks were later cut into two roughly equal sections along a plane perpendicular to the enamel surface.

Synchrotron microCT was performed at bending magnet station 2-BM of APS using the standard set-up as configured during February-March and November 2006 (Wang et al. 2001, De Carlo et al. 2006). X-ray photons with energy of 20 keV for some specimens and 27 keV for others were provided by a double multi-layer monochromator (DMM) described elsewhere (Chu et al. 2002). The detector system consisted of a 12-bit, 2K x 2K CCD camera coupled with an optical lens to a CdWO₄ single-crystal phosphor. For some specimens such as 25rd, a 5X lens was used, producing 1.5 μm isotropic voxels in the reconstructions; for others (20a, 41b, 91a), a 2.5X lens (2.8 μm isotropic voxels) was used. Each volume (consisting of up to 2K slices) was acquired in 15-20

min. All microCT data is displayed in grayscale with lighter pixels corresponding to voxels with greater linear attenuation coefficients.

ImageJ (Rasband 2006) was used to display reconstructed slices and to extract numerical quantities from the data. Digital sections along different planes were produced using the VolumeViewer plugin (Barthel 2006). Histograms of an enamel region, a dentin region and a DEJ region were determined specimen 25rd, and mean linear attenuation coefficients and standard deviations were computed for similar areas of specimen 20a. The DEJ was slightly inclined relative to the slice plane for these reconstructions, and rectangular subsections of the three regions were selected well away from their boundaries.

MicroCT, as described above, was performed before and after two specimens were loaded stepwise to failure in compression. The APS Sector 1 load frame (see Almer and Stock 2005, 2007) was used for these tests with specimens 91a and 41b, the purpose of which was mapping internal strains/stresses on either side of the DEJ; results of these high energy x-ray scattering experiments will be described elsewhere. Specimen 91a was loaded along z (Fig. 1), that is, perpendicular to the DEJ plane; specimen 41b was loaded along x , that is parallel to the DEJ plane. The tests ended when displacement of the loading platens failed to increase the peak applied stress measured in the frame's load cell. For specimen 91a, the maximum applied stress was greater than 64 MPa, and, for specimen 41b, in excess of 58 MPa.

Results

Figure 2 of specimen 25rd shows a slice intersecting the DEJ; the slice is typical of this specimen and of the other tens of specimens examined as part of a study of a de-/re-mineralization model (Vieira et al. 2006, Delbem et al. 2006). Enamel and dentin are visible on either side of the DEJ, and complex contrast is visible within the DEJ. Inspection of the high contrast features, both those substantially more absorbing than dentin (white) and those significantly less absorbing than dentin (black), in stacks of contiguous slices failed to reveal patterns of contrast such as might be seen if narrow channels or isolated prisms surrounded by soft tissue and fluid were present in the DEJ.

This observation pertains, of course, only to the limit of resolution of the data (isotropic $\sim 1.5 \mu\text{m}$ voxels). Some reconstruction artefacts (e.g. R in Fig. 2a) are present, and, as they are easily recognizable (Stock 1999) and did not interfere with analysis, they are ignored elsewhere in this report.

Histograms for linear attenuation coefficients for enamel, dentin and the DEJ are shown in Fig. 3 for specimen 25rd. The histogram peak for enamel was the narrowest and was found at the highest values of linear attenuation coefficient. The peak for dentin was somewhat wider than that of enamel and at lower values of μ . The peak for the DEJ had its maximum at a still lower value of μ and was much broader than the other two peaks. Note that the dentin histogram has a small fraction of voxels with values $\mu < 0 \text{ cm}^{-1}$ and that the DEJ histogram has a large fraction of voxels with these unphysical values; as discussed below, this is an expected effect of the spatial coherence of the x-ray beam.

Table 1 shows mean values of the linear attenuation coefficient for the three structures (dentin, enamel, DEJ) in specimen 20a. The mean value (standard deviation) for enamel was $13.2 (1.4) \text{ cm}^{-1}$, for dentin $7.4 (1.7) \text{ cm}^{-1}$ and for the DEJ $6.3 (5.1) \text{ cm}^{-1}$. These data are consistent with the data in Fig. 3 when one allows for the difference in photon energy (27 keV in Fig. 3 and 20 keV in Table 1).

Figure 4 shows a numerical section through specimen 25rd along a plane perpendicular to the DEJ. A parallel array of linear gray lines are visible in the dentin and extend from the DEJ; the orientation suggests these features are tubules. One estimates a mean line spacing in Fig. 4a of $6\text{-}7 \mu\text{m}$, and, as shown in the following section (Discussion), this is consistent with earlier reported tubule spacings. The width of each line is on the order of one voxel, that is $\sim 1.5 \mu\text{m}$. Note that these estimates are intended only for identifying the features and not as a precise quantification. In Fig. 4, the contrast between the gray lines and the background is highly variable, and this makes quantification rather difficult in this section and even more difficult in the slice plane where the tubules could not be identified reliably.

In the cut of Fig. 4a, the interface between the enamel and the DEJ appears quite sharp. The dentin-DEJ transition, however, is much more gradual. This complicates

measurement of the DEJ thickness but is probably an intrinsic feature of the gradient interface.

The width of the DEJ visible in the reconstruction of specimen 25rd was measured two ways. The first involved paging through a stack of slices of specimen and, at a predetermined coordinate, identifying the slice at which the DEJ first appeared at this position and the slice in which the DEJ could last be observed. The second method (which should be equivalent to the first) was direct measurement of the width of the contrast band in Fig. 4a. Both thicknesses for specimen 25rd were $\sim 40 \mu\text{m}$.

Figure 4b shows a tracing of the sharp interface of the visible DEJ with enamel seen in Fig. 4a. The position of the interface was determined visually at 35 nearly equally spaced positions, and the least squares fit to the points' positions (schematically indicated by the dashed line in Fig. 4b) was taken to be the nominal enamel-DEJ interface. The mean departure of the actual interface from the nominal plane was $\sim 8.5 \mu\text{m}$ with a standard deviation of $\sim 4.5 \mu\text{m}$. Over the $\sim 520 \mu\text{m}$ of the nominal plane shown in Fig. 4a, the actual interface deviated up to $\pm 15 \mu\text{m}$ (i.e., $15 \mu\text{m}$ to either side).

Figure 5 shows typical slices from specimen 91a before and after compression perpendicular to the DEJ (i.e., along the direction of the large white arrow). The DEJ is parallel to the slightly curved top surface of the enamel and makes a slight angle ($\sim 15\text{-}20^\circ$) relative to the cut dentin surface (at the bottom of the images). The relatively small visible thickness of the DEJ can be appreciated relative to the $\sim 1.5 \text{ mm}$ enamel thickness. The voxel size in these reconstructions (as well as those in Fig. 6) is somewhat larger than those in Fig. 2 and 4 ($2.8 \mu\text{m}$ vs $1.5 \mu\text{m}$). After testing, the enamel of specimen 91a was heavily cracked and fragmented (dark linear features in Fig. 5b), and the right side of Fig. 5b shows a particularly large fragment that separated from the bulk of the sample. No cracks were observed in the dentin, either propagating through the DEJ or initiating at the dentin's free surfaces.

The majority of cracks in specimen 91a were parallel and at an angle of $60\text{-}65^\circ$ or so to the enamel surface and to the DEJ plane. Some cracks propagated laterally across the enamel, from lateral free surface to lateral free surface (small arrows in Fig. 5b), linking the array of parallel cracks closer to the enamel surface. Below the marked lateral

crack, there were fewer cracks, and these deviated toward the lateral free surfaces of the specimen. No cracks were noted in the DEJ except in the immediate vicinity of a free surface.

Figure 6 shows typical slices of specimen 41b. In Fig. 6a, several cracks are visible that were produced by sample drying; some cracks showed prominent, diffuse white borders (asterisks) and others did not (black disks). Figure 6b is of a slightly different portion of sample 41b, and loading parallel to the DEJ (along the direction indicated by the large white arrow in Fig. 6a) produced cracks running, for the most part, perpendicular to the enamel surface and to the DEJ. The cracks do not appear to have any special spacing and tend to deflect partway between the enamel surface and the DEJ (“#” in Fig. 6b). Interestingly, one of the cracks extended nearly to the DEJ and propagated parallel to it within the enamel a few micrometers away (inset in Fig. 6b). No cracks were observed in the dentin of specimen 41b.

Discussion

At 20 keV the mean linear attenuation coefficient for dentin was 7.4 cm^{-1} . Both dentin and cortical bone have, as a first approximation, nearly the same volume fraction of mineral although the nanoscale organization of the two tissues differs. Cortical bone has a tabulated mass attenuation coefficient $\mu/\rho \sim 4.0 \text{ cm}^2/\text{g}$ at 20 keV (Hubble and Seltzer 2006), and, using a density for cortical bone of 1.9 g/cm^3 (Currey 1979), this corresponds to $\mu = 7.6 \text{ cm}^{-1}$ which is as good an agreement as can be expected from such an approximate calculation.

The standard deviation of the linear attenuation coefficient of the DEJ is three times larger than those of either dentin or enamel. This clearly indicates that the DEJ is much more heterogeneous at the micrometer level than either dentin or enamel, and the spread of the DEJ values is much greater than simple mixing of the distributions for enamel and for dentin. The data presented above (histograms, mean linear attenuation coefficients) indicate decreased mineral density (compared to dentin or to enamel) within the DEJ zone visualized with microCT. Fourier transform infrared microspectroscopy

(reflection mode) and quantitative backscattered electron imaging have also shown higher mineral content in the bulk dentin than near/at the DEJ (Tesch et al. 2001).

The nonphysical values of the linear attenuation coefficient ($\mu < 0$) in the DEJ histogram (Fig. 3) revealed the presence of a high density of internal interfaces. When an x-ray source with high spatial coherence (such as at 2-BM of the APS) images an interface between two materials with differing electron densities, light and dark diffraction fringes (hot edges) are produced in radiographs (Cloetens et al. 2000). The hot edges propagate into reconstructed slices as regions of anomalously high and unphysically low linear attenuation coefficients bordering the interfaces (Stock et al. 2003). The large number of voxels in the DEJ with $\mu < 0$ indicate that structure within the DEJ cannot be extracted with the degree of confidence one would like: this is the product of the voxel size, the specimen-detector separation and the range of feature sizes in the DEJ.

The estimates of the DEJ structural width are very approximate. Paging through a stack, for example, provides a measurement along the specimen rotation axis which Fig. 4a shows is $\sim 15^\circ$ from the average plane of the enamel-DEJ boundary; accounting for this factor corrects the estimated width from $\sim 40 \mu\text{m}$ to $\sim 30 \mu\text{m}$. The estimate of DEJ width from the contrast visible in the cut in Fig. 4a is also quite approximate and subjective because only one side of the visible DEJ is sharply defined. The second, fuzzy interface would be difficult to identify with simple segmentation methods, and use of more complex boundary definitions might not be warranted given that prior destructive, ultrastructural studies have clearly shown the interface is graded over a substantial distance.

The structural width of the DEJ has been measured previously with different techniques. Fong et al. (2000) observed the polished and etched junction with AFM and found an interpenetrating structure with width comparable to the functional width they found with nanoindentation (about $20 \mu\text{m}$). Optical spectroscopic imaging ($\sim 1 \mu\text{m}$ spatial resolution) of polished human third molars revealed widths from $7\text{-}15 \mu\text{m}$ with a median of $10 \mu\text{m}$ (Gallagher et al. 2003). The results reported here are, therefore, consistent with the literature, especially when one considers the differences in imaging methods.

The functional width of the DEJ, revealed by indentation mapping or fracture mechanics, is expected to be larger than the structural width revealed by microCT or other imaging techniques. White et al. (2000) studied the DEJ in human incisors using Vickers microhardness. Mapping with 15 g load revealed: a biomechanical transition between bulk properties of enamel and dentin of $\sim 100 \mu\text{m}$; a small peak in hardness (relative to the bulk value) on the enamel side of the junction and a very slight dip in hardness on the dentin side with a peak-dip separation of $\sim 50 \mu\text{m}$; a linear hardness transition extending between 25 and 30 μm at the center of the DEJ. Fong et al. (2000) used nanoindentation of carefully polished human incisors to measure DEJ width at $20 \pm 5 \mu\text{m}$; one of their plots of hardness vs position across the DEJ showed the peak in enamel hardness at one side of the interface and dip in dentin hardness on the opposite side. Marshall et al. (2001), also using nanoindentation, measured a DEJ width (human third molar) of about 12 μm . Moiré interferometry on 1.5 mm thick, bucco-lingual cross-sections of human tooth placed under load revealed a $\sim 200 \mu\text{m}$ wide transition zone between dentin and enamel (Wang and Weiner 1998, Zaslansky et al. 2006). Controlled crack propagation across the DEJ in human tooth produces significant crack deflection within the functional DEJ (relative to the nominal crack paths in enamel and dentin) and led to estimates of DEJ thickness of 50-100 μm (Lin and Douglas 1994) or 100-150 μm (Dong and Ruse 2003).

Although mineralized tissue is well known for its highly variable properties (both inter- and intra-individual), the spread of values for structural and functional DEJ widths probably reflects differences in measurement techniques and procedures. Far away from the DEJ, dentin and enamel have properties which are more-or-less constant with position.

The data show microCT is certainly useful for identifying the geometry and structure of the mineralized portions of the DEJ, but higher resolution synchrotron microCT with voxels 0.7 μm or smaller would probably be required to further define the fine structure of the DEJ; imaging at this spatial resolution is becoming increasingly common (e.g. Ferrie et al. 2006) although this cannot be achieved at all synchrotron microCT facilities.

In the absence of sub-micrometer imaging capabilities, investigating the 3D position of the interface between dentin and enamel portions of the tooth would be another interesting area of research. The DEJ is scalloped at this scale, i.e., the boundary is not smooth but consists of small concave regions. Comparative analyses of DEJ structure across different species (Whittaker 1978, Oliveira et al. 2001) focused on the geometry of the interface, i.e., the presence/absence of scallops and micro-scallops and details of their structure, but quantitative comparisons do not yet appear to have been published. Determinations such as that from Fig. 4 (DEJ roughness, 3D position, concavity/convexity measurements at several scales) are readily extended to 3D as demonstrated by Lee et al. (1998) and Guvenilir et al. (1997) some time ago.

Microscopy of carefully polished sections of bovine dentin revealed tubule diameters in the range of 2-3 μm and nearest-neighbor separations on the order of three or more tubule diameters (Gotliv et al. 2006). The tubule diameter estimated here ($\sim 1.5 \mu\text{m}$) is comparable to the data of Gotliv et al. and is as close as can be expected given the very crude measurement procedure and the voxel dimensions in the reconstructions. Another effect complicating microCT measurement of tubule diameter is the presence of hypermineralized collars of peritubular dentin surrounding tubules (secondary ion mass spectroscopy (SIMS) images of Gotliv et al. (2006) show thickness on the order of the tubule diameter). The casual estimate of tubule spacings from Gotliv et al. ($\sim 6\text{-}9 \mu\text{m}$) is consistent with the estimate derived from Fig. 4 ($6\text{-}7 \mu\text{m}$). Converting the Fig. 4 spacings to number density of tubules yields $2\text{-}5 \times 10^4 \text{ mm}^{-2}$, depending on the assumed spatial distribution; this agrees with values of $2.5\text{-}4.2 \times 10^4 \text{ mm}^{-2}$ measured for tubule densities in human tooth (Kinney et al. 2001).

The surface of the enamel in specimen 91a is slightly rounded and inclined relative to the back surface of the dentin (at the bottom in Fig. 5). Uneven local loading probably resulted in the near-surface volumes of the enamel, and this effect may dominate crack formation. The angle of the cracks (relative to the enamel surface or the DEJ) should not be assumed, therefore, to reflect any intrinsic property of enamel loaded in compression. On the other hand, enamel prisms extend out from the DEJ and are

known to fracture along their interfaces (Rasmussen and Patchin 1984), so the pattern of cracks in Fig. 5b may be related to microstructure.

Earlier, broad flares of contrast were noted around some, but not all, drying cracks in specimen 41b (Fig. 6b). The cracks with this contrast make a small angle with the slice plane, and this produces more visible phase contrast from the edge of the crack just above or below the slice (Stock et al. 2003). Those cracks without this prominent contrast also show borders of white fringes, but, because these cracks make much larger angle with the slices, this contrast is not so noticeable. Such “diffraction fringes” at sharp interfaces between materials with very different electron densities is a commonly observed feature of low emittance synchrotron radiation sources such as APS.

Fewer cracks were produced in specimen 41b than in 91a. Although it is tempting to ascribe this to difference in loading geometry (i.e., parallel to the DEJ vs perpendicular to it), such a conclusion would be premature. The curvature of the enamel surface of specimen 91a is problematic if fracture properties are to be quantified. As the loading experiments were a proof-of-principle study of the effect of the DEJ on strain field distributions as a function of applied stress, no special care was taken to machine the enamel surface parallel to the dentin back face. Mapping used a small diameter, high energy x-ray beam and small translation steps so that the free surface did not dominate the results, but this is not the subject of the present report.

Failure of the cracks to breach the DEJ is not surprising given the toughness of the interface compared to enamel. The plane strain fracture toughness K_{IC} of the DEJ for cracks perpendicular to it was $3.4 \pm 0.4 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ for bovine incisors (Lin and Douglas 1994). For comparison, human DEJ was found to have $K_{IC} = 1.5 \pm 0.3 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$ vs human dentin and enamel values of 2.0 ± 0.2 and $0.8 \text{ MPa}\sqrt{\text{m}}$, respectively (Dong and Ruse 2003). Cracking in enamel and not in dentin is consistent in both loading geometries, therefore, with much lower young's modulus and much higher toughness in dentin (compared to enamel).

Automated or semiautomated mapping of the position of the DEJ in 3D is straightforward and efficient with synchrotron microCT data sets and should add considerably to the understanding of the mechanics of this interface. Quantification over

interface areas millimeters in extent should be very rapid and should allow different structural scales within the DEJ to be probed in detail. With rapid data and automated/semi-automated analysis, investigation of population statistics is feasible, and one can imagine interspecies comparisons possible along the lines of Whitaker (1978) and Oliviera et al. (2001), except numerical and embodying multiple interface parameters and not qualitative in nature. Once variability is known, finite element modeling can be used to fit the observed data and then used to extrapolate to likely behavior in the presence of specific variations, i.e., a more complete investigation of behavior across the structural parameter space.

Acknowledgments

Use of the Advanced Photon Source was supported by the U. S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, under Contract No. DE-AC02-06CH11357.

References

- JD Almer, SR Stock, Internal strains and stresses measured in cortical bone via high-energy x-ray diffraction, *J Struct Biol* **152** (2005) 14-27.
- JD Almer, SR Stock, Micromechanical response of mineral and collagen phases in bone, *J Struct Biol* **157** (2007) 365-370.
- KU Barthel, Volume Viewer plugin for ImageJ, 2006, <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/volume-viewer.html>.
- A Boyde, Enamel, in BKB Berkovitz, A Boyde, RM Frank, HJ Höhling, BJ Moxham, J Nalbandian, CH Tonge, *Teeth* (Berlin: Springer, 1989) 309-473.
- YS Chu, C Liu, DC Mancini, F De Carlo, AT Macrander, D Shu, Performance of a double multilayer monochromator at 2-BM at the Advanced Photon Source, *Rev Sci Instrum* **73** (2002) 1485-1487.
- P Cloetens, W Ludwig, JP Guigay, J Baruchel, M Schlenker, D vanDyck, Phase contrast tomography, in J Baruchel, JY Buffiere, E Mairie, P Merle, G Peix, eds. *X-ray Tomography in Materials Science* (Hermes: Paris, 2000) 29-44.
- JD Currey, Mechanical properties of bone tissues with greatly differing functions, *J Biomech* **12** (1979) 313-319.
- F De Carlo, X Xiao, B Tieman, X-ray tomography system, automation and remote access at beamline 2-BM of the Advanced Photon Source, in U Bonse, ed. *Developments in X-ray Tomography V* (Bellingham (WA): SPIE, 2006) 6318K-1 to -13.
- ACB Delbem, AM Vieira, KT Sasaki, ML Cannon, SR Stock, X Xiao, F De Carlo, Quantitative analysis of mineral content in enamel using synchrotron microtomography and microhardness analysis, in U Bonse, ed. *Developments in X-ray Tomography V* (Bellingham (WA): SPIE, 2006) 631824-1 to -5.
- XD Dong, ND Ruse, Fatigue crack propagation path across the dentinoenamel junction complex in human teeth, *J Biomed Mater Res* **66A** (2003) 103-109.
- SEP Dowker, GR Davis, JC Elliott, X-ray microtomography: Nondestructive three-dimensional imaging for in vitro endodontic studies, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **83** (1997) 510-516.

- JC Elliott, P Anderson, GR Davis, FSL Wong, XJ Gao, SD Dover, A Boyde, X-ray tomographic studies of bone and teeth, in A Michette, G Morrison, C Buckley, eds. *X-ray Microscopy III* (Berlin: Springer, 1992) 461-464.
- E Ferrie, JY Buffiere, W Ludwig, A Gravouil, L Edwards, Fatigue crack propagation: In situ visualization and 3D simulation using the extended finite element method, *Acta Mater* **54** (2006) 1111-1122.
- H Fong, M Sarikaya, SN White, ML Snead, Nano-mechanical properties profiles across dentin-enamel junction of human incisor teeth, *Mater Sci Eng C* **7** (2000) 119-128.
- RM Frank, J Nalbandian, Structure and ultrastructure of dentine, in BKB Berkovitz, A Boyde, RM Frank, HJ Höhling, BJ Moxham, J Nalbandian, CH Tonge, *Teeth* (Berlin: Springer, 1989) 173-247.
- RR Gallagher, SG Demos, M Balooch, GW Marshall, Jr., SJ Marshall, Optical spectroscopy and imaging of the dentin-enamel junction in third human molars, *I Biomed Mater Res* **64A** (2003) 372-377.
- TN Gardner, JC Elliott, Z Sklar, GAD Briggs, Acoustic microscope study of the elastic properties of fluorapatite and hydroxyapatite, tooth enamel and bone, *J Biomech* **25** (1992) 1265-1277.
- RS Gilmore, JL Katz, Elastic properties of apatites, *J Mater Sci* **17** (1982) 1131-1141.
- BA Gotliv, JS Robach, A Veis, The composition and structure of bovine peritubular dentin: Mapping by time of flight secondary ion mass spectroscopy, *J Struct Biol* **156** (2006) 320-333.
- A Guvenilir, TM Breunig, JH Kinney, SR Stock, "Direct observation of crack opening as a function of applied load in the interior of a notched tensile sample of Al-Li 2090," *Acta Mater* **45** (1997) 1977-1987.
- JH Hubbel, SM Seltzer, Tables of x-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients, <http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/cover.html>, accessed 1/22/2007, NISTIR 5632 (2006).

- JH Kinney, J Oliveira, DL Haupt, GW Marshall, SJ Marshall, The spatial arrangement of tubules in human dentin, *J Mater Sci Mater Med* **12** (2001) 743-751.
- JH Kinney, JR Galdden, GW Marshall, SJ Marshall, JH So, JD Maynard, Resonant ultrasound spectroscopy measurements of the elastic constants of human dentin, *J Biomech* **37** (2004) 437-441.
- JJ Kruzic, RK Nalla, JH Kinney, RO Ritchie, Crack blunting, crack bridging and resistance-curve fracture mechanics in dentin: effect of hydration, *Biomater* **24** (2003) 5209-5221.
- SB Lee, SR Stock, MD Butts, TL Starr, TM Breunig, JH Kinney, "Pore geometry in woven fiber structures: 0°/90° plain-weave cloth lay-up p reform," *J Mater Res* **13** (1998) 1209-1217.
- CP Lin, WH Douglas, Structure-property relations and crack resistance at the bovine dentin-enamel junction, *J Dent Res* **73** (1994) 1072-1078.
- GW Marshall, Jr., M Balooch, RR Gallagher, SA Gansky, SJ Marshall, Mechanical properties of the dentinoenamel junction: AFM studies of nanohardness, elastic modulus and fracture, *J Biomed Mat Res* **54** (2001) 87-95.
- CA Oliviera, LP Bergqvist, SRP Line, A comparative analysis of the structure of the dentinoenamel junction in mammals, *J Oral Sci* **43** (2001) 277-281.
- W Rasband, ImageJ 1.34, NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 2006.
- ST Rasmussen, RE Patchin, Fracture properties of human enamel and dentin in an aqueous environment, *J Dent Res* **63** (1984) 1362-1368.
- MC Sha, Z Li, RC Bradt, Single-crystal elastic constants of fluorapatite, $\text{Ca}_5\text{F}(\text{PO}_4)_3$, *J Appl Phys* **75** (1994) 7784-7787.
- SR Stock, X-ray microtomography of materials, *Int Mater Rev* **44** (1999) 141-164.
- SR Stock, KI Ignatiev, T Dahl, A Veis, F De Carlo, Three-dimensional microarchitecture of the plates (primary, secondary, and carinar process) in the developing tooth of *Lytechinus variegatus* revealed by synchrotron X-ray absorption microtomography (microCT), *J Struct Biol* **144** (2003) 282-300.

- W Tesch, N Eidelman, P Roschger, F Goldenberg, K Klaushofer, P Fratzl, Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin, *Calcif Tiss Int* **69** (2001) 147-157.
- AEM Vieira, ACB Delbem, KT Sasaki, ML Cannon, SR Stock, Quantitative analysis of mineral content in enamel using laboratory microtomography and microhardness analysis, in U. Bonse, ed. *Developments in X-ray Tomography V* (Bellingham (WA): SPIE, 2006) 631823-1 to -5..
- RZ Wang, S Weiner, Strain-structure relations in human teeth using Moiré fringes, *J Biomech* **31** (1998) 135-141.
- Y Wang, F De Carlo, D Mancini, I McNulty, B Tieman, J Bresnahan, I Foster, J Insley, P Lane, G von Laszewski, C Kesselman, M-H Su, M Thiebaux, High-throughput X-ray microtomography system at the Advanced Photon Source, *Rev Sci Instrum* **72** (2001) 2062-2068.
- SN White, ML Paine, W Luo, M Sarikaya, H Fong, Z Yu, ZC Li, ML Snead, The dentino-enamel junction is a broad transitional zone uniting dissimilar bioceramic composites, *J Am Ceram Soc* **83** (2000) 238-240.
- DK Whittaker, The enamel-dentine junction of human and *Macaca irus* teeth: a light and electron microscopic study, *J Anat* **125** (1978) 323-335.
- P Zaslansky, AA Friesem, S Weiner, Structure and mechanical properties of the soft zone separating bulk dentin and enamel in crowns of human teeth: Insight into tooth function, *J Struct Biol* **153** (2006) 188-199.

Table 1. Linear attenuation coefficient values μ (cm^{-1}) at 20 keV for specimen 20a. The number of voxels N and standard deviation (in parentheses) are also given.

Phase	N	μ
Dentin	45,008	7.4 (1.7)
DEJ	24,832	6.3 (5.1)
Enamel	9,438	13.2 (1.4)

Figure Captions

Figure 1. Schematic of bovine tooth cube (E – enamel, D – dentin and DEJ – dentinoenamel junction in this and subsequent figures) and coordinate axis.

Figure 2. a. Slice of specimen 25rd (plane x-y in Fig. 1 with rotation axis z). The horizontal field of view is 1200 voxels (1.76 mm). b. Enlargement of the lower right corner of the slice, 0.59 mm horizontal field of view. R denotes ring artefacts; and the lighter the pixel, the higher the linear attenuation coefficient. The dashed line approximates the trace of the numerical cut perpendicular to the DEJ shown in Fig. 4.

Figure 3. Histograms of linear attenuation coefficients μ (cm^{-1}) for enamel, dentin and DEJ at 27 keV for specimen 25rd. The number of voxels N for each plot was 40,000, 40,000 and 27,659, respectively.

Figure 4. Numerical cut perpendicular to the DEJ and through 151 slices. The vertical field of view is just over 220 μm .

Figure 5. Reconstructed slices of specimen 91a, a. before and b. after compression. The plane of the slice is x-z defined in Fig. 1 and compression was along z. The vertical field of view is 1100 voxels (just under 3.1 mm). The large white arrow in a. shows the loading direction, and the pair of smaller arrows in b. mark a transverse crack.

Figure 6. Reconstructed slices of specimen 41b before (a.) and after (b.) compression. The plane of the slice is x-z defined in Fig. 1 and compression was along x. The vertical field of view is 1200 voxels (just under 3.4 mm). The inset enlargement (inside the white box) has a vertical field of view of 50 voxels (0.14 mm) and is from the portion of the interface indicated by the dashed line. The various symbols are defined in the text.

Figure 7. Specimen 25c sampled through three orthogonal planes. The horizontal specimen dimension is just under 1.9mm.

Figure 1

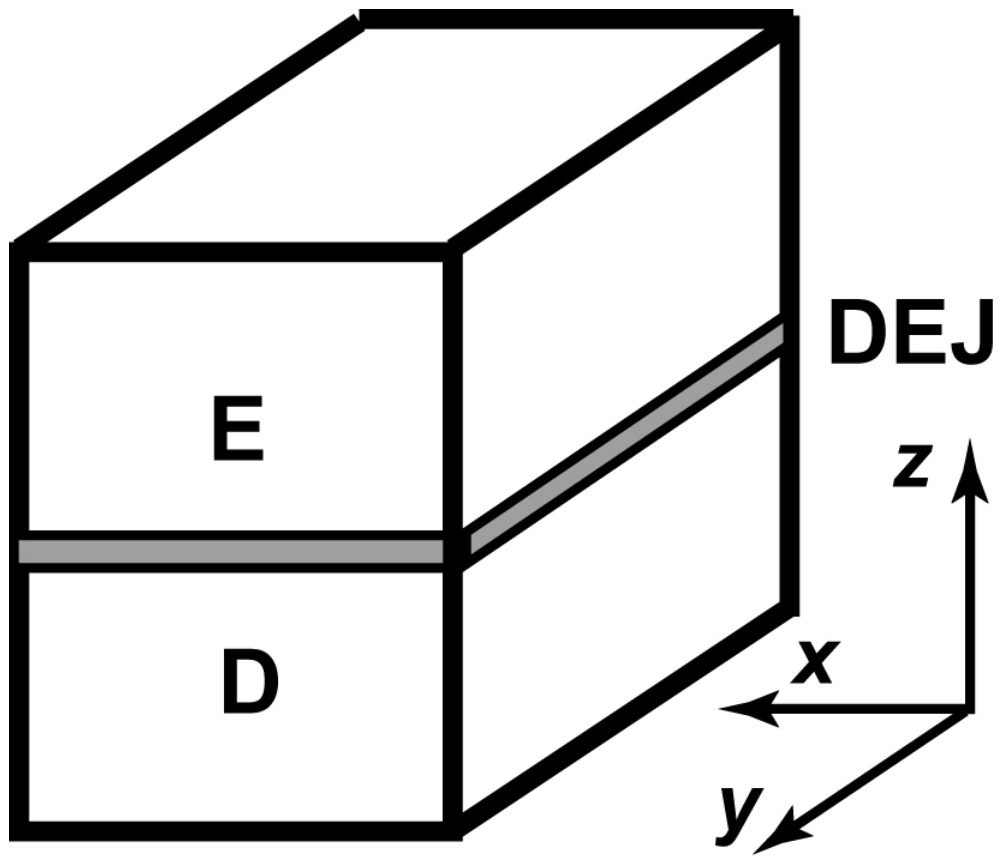


Figure 2

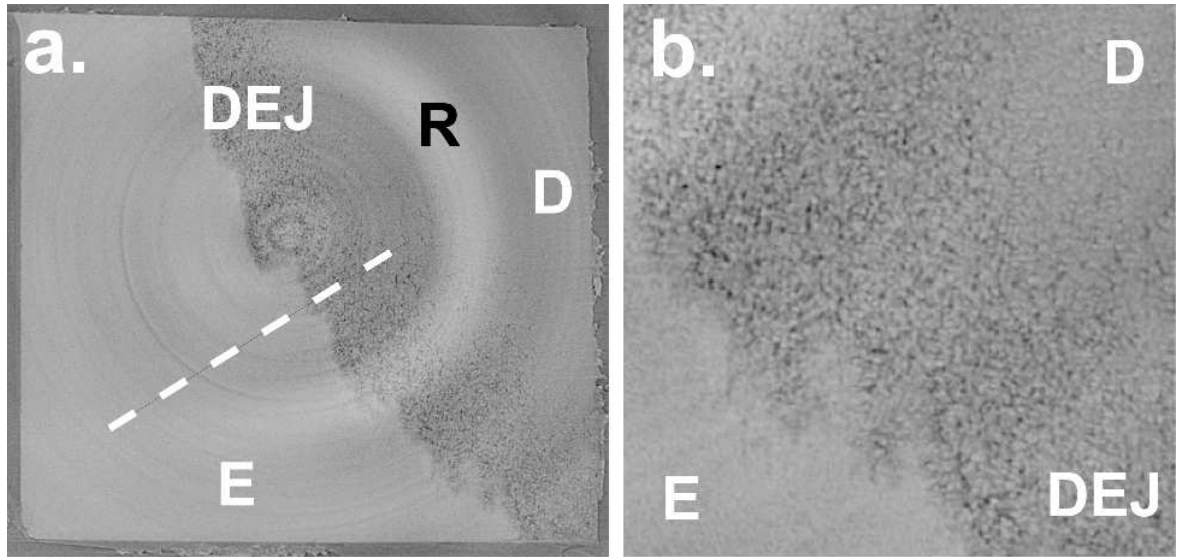


Figure 3

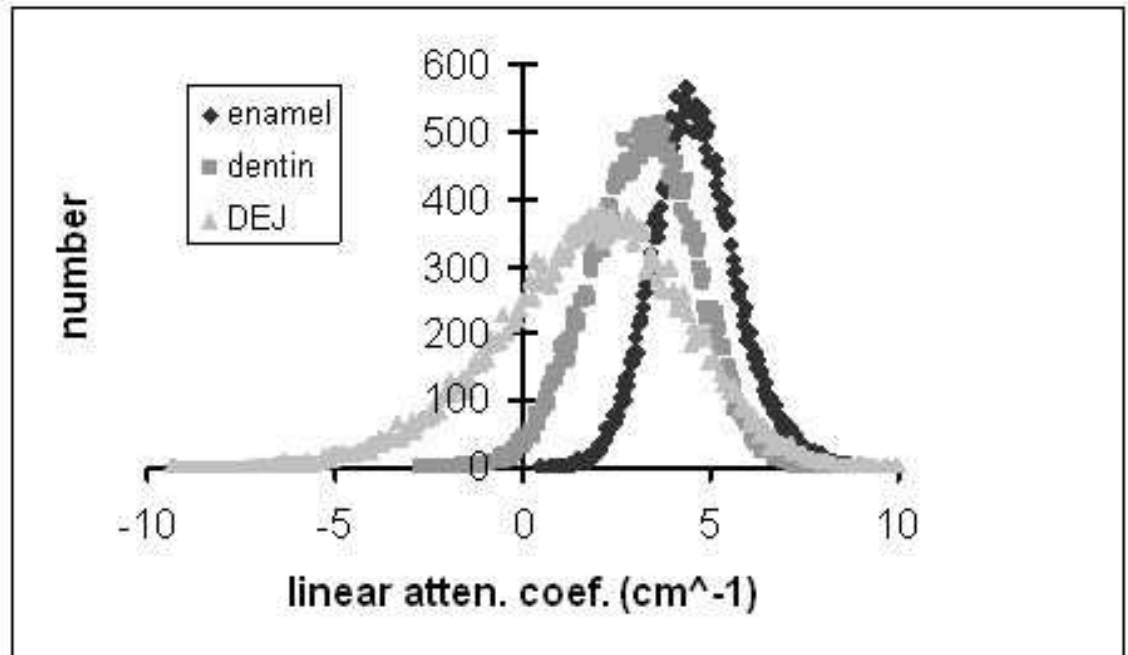


Figure 4.

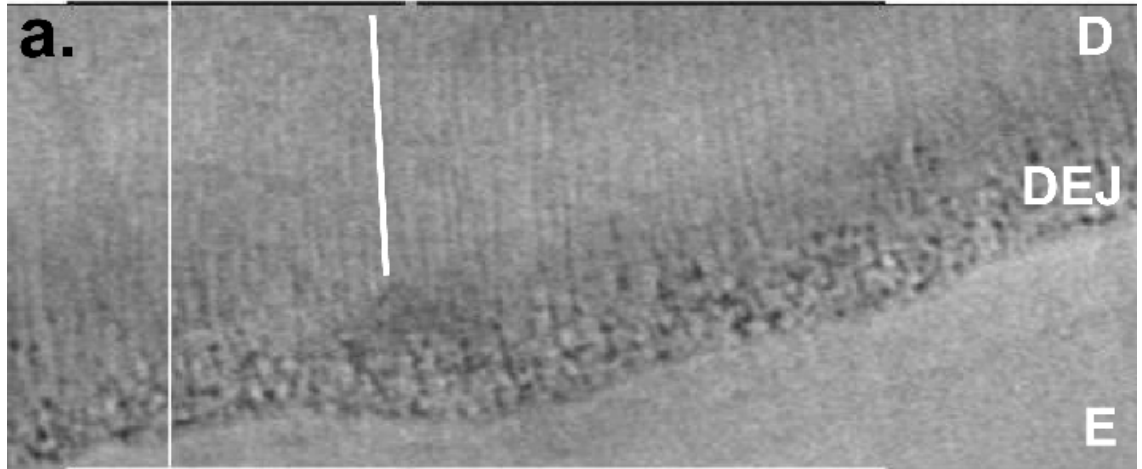


Figure 5

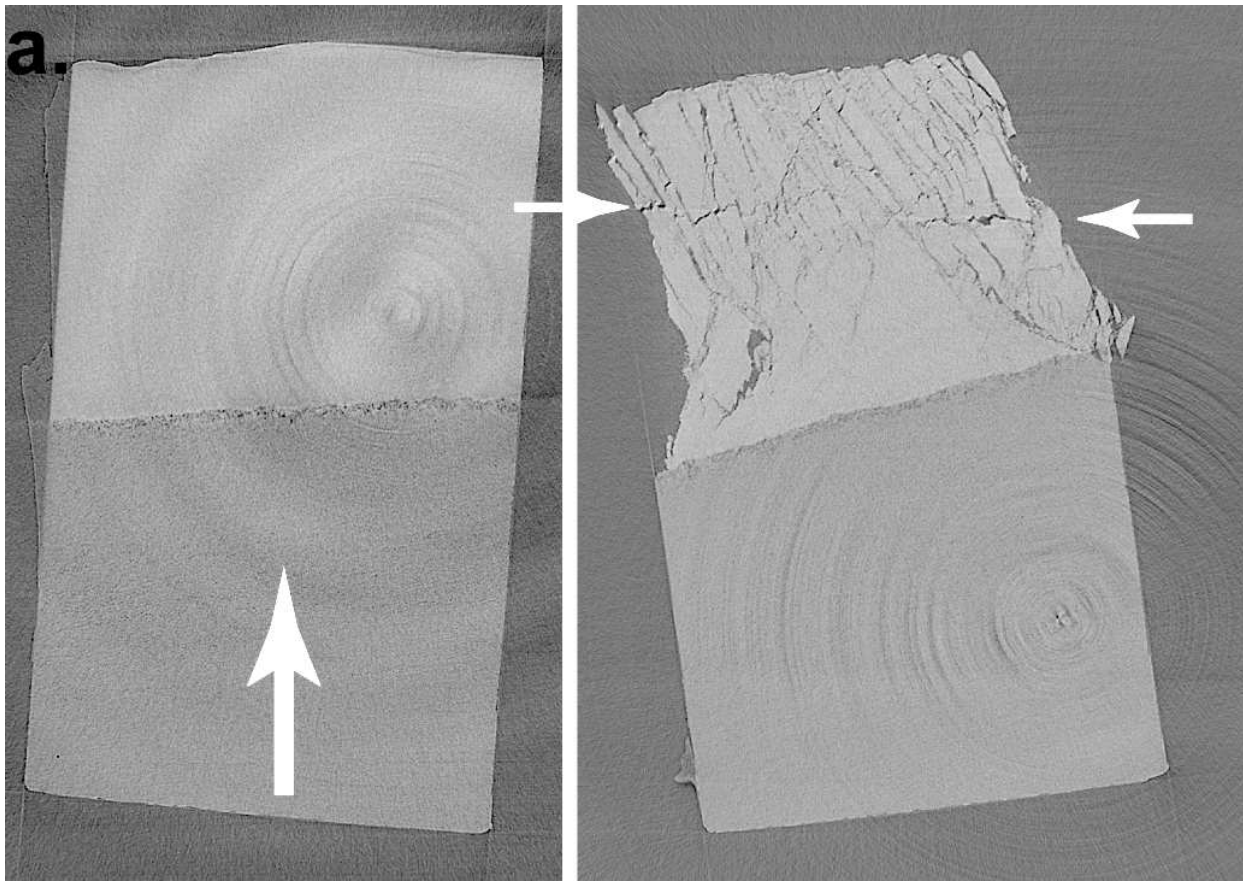


Figure 6

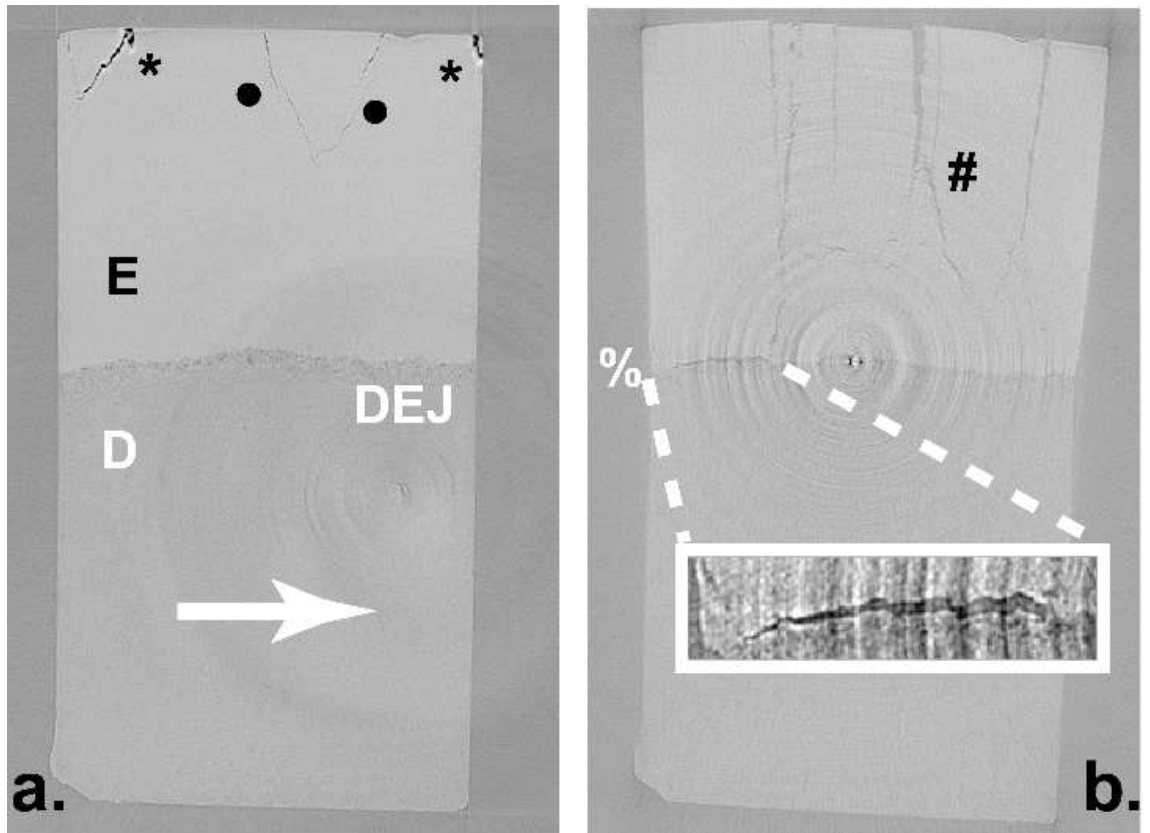
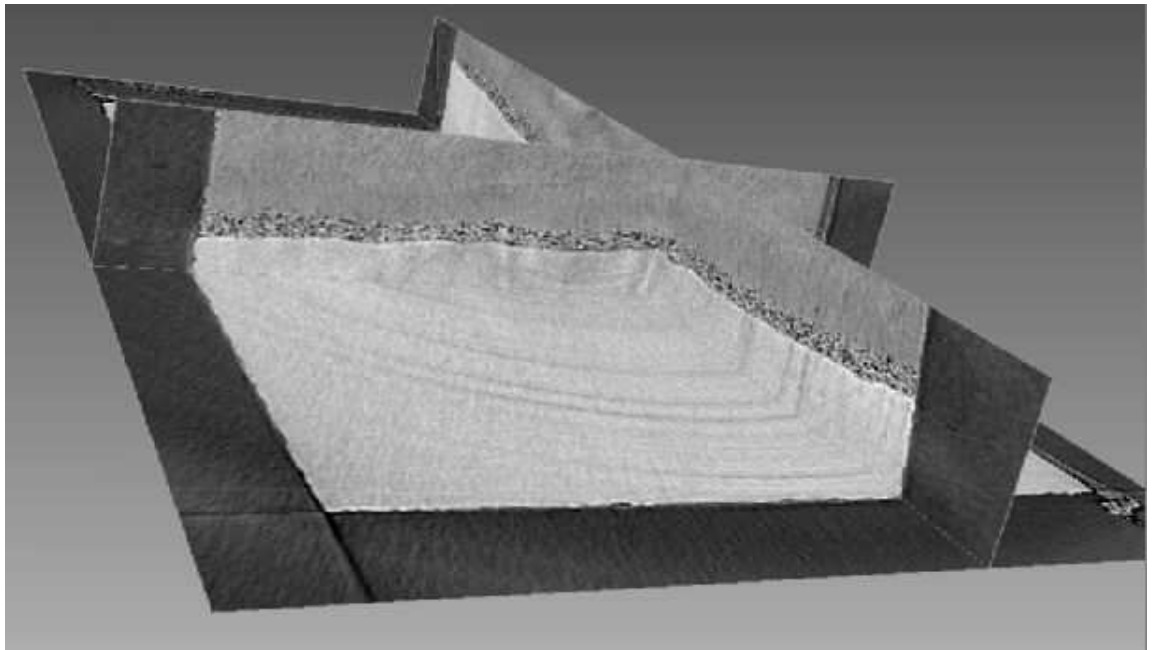


Figure 7



Capítulo 4

ANÁLISE DO POTENCIAL ANTI-
CÁRIE DE SELANTES
LIBERADORES DE FOSFATO DE
CÁLCIO ATRAVÉS DE
MICROTOMOGRÁFIA
SÍNCROTRON

**ANÁLISE DO POTENCIAL ANTI-CÁRIE DE SELANTES
LIBERADORES DE FOSFATO DE CÁLCIO ATRAVÉS DE
MICROTOMOGRÁFIA SÍNCROTRON**

AEM Vieira¹, ACB Delbem¹, KT Sasski¹, M Danelon¹, MRE Santo¹,
SR Stock², ML Cannon³, X Xiao⁴, F De Carlo⁴, ACB Delbem⁵

¹ São Paulo State University – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil

² Dept. of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Feinberg
School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL USA

³ Children's Memorial Medical Center, Chicago, IL, USA

⁴ Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, IL,
USA

⁵ University of São Paulo – USP, São Carlos, São Paulo, Brasil

Palavras-chave: esmalte - bovino, ciclagem de pH, desmineralização,
fosfatos de cálcio, dureza, síncrotron

Ana Elisa de Mello Vieira

Rua Afonso Pena 325 – ap. 92

Araçatuba – SP- Brasil

Cep 16010-370

Tel. 18-3621-2375

aemvieira@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi analisar o potencial anti-cárie de selantes de fósulas e fissuras contendo fosfato de cálcio amorfo (ACP) através da microtomografia (XMT) síncrotron. Cinquenta blocos de esmalte (4x3 mm) foram selecionados pelo teste de microdureza de superfície. Corpos-de-prova foram confeccionados a partir dos materiais Ultraseal (selante resinoso sem flúor), Embrace (selante resinoso com flúor), Aegis (selante resinoso com ACP), Selante experimental (ACP+F) e o ionômero de vidro Vitremer diluído ¼ (pó/líquido), e adaptados aos blocos de esmalte. A seguir, os espécimes foram submetidos individualmente à ciclagem de pH [Vieira et al. 2005] para promover a desmineralização. A microdureza de superfície foi determinada e os blocos submetidos à microtomografia (XMT) síncrotron, para o cálculo da concentração mineral ($g_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$), em diferentes áreas do esmalte. Baseado nos resultados deste estudo in vitro, concluiu-se que o fosfato de cálcio amorfo incorporado a selantes resinosos apresenta baixa capacidade de reduzir a perda mineral no esmalte, e que o fosfato de cálcio amorfo associado ao flúor incorporado a selantes resinosos apresenta características potencializadas quando comparado ao selante com CPP-ACP apenas.

Introdução

A cárie dentária constitui, ainda, um dos assuntos mais estudados pelos pesquisadores, pois, além de ser uma condição clínica multi-fatorial, difere de indivíduo para indivíduo, de dente para dente, como também de superfície para superfície [Eklund e Ismail, 1991].

A complexa configuração anatômica apresentada pelas fósulas e fissuras propicia, consideravelmente, a retenção de resíduos alimentares, assim como de microrganismos, tornando esta condição clínica agravada pela dificuldade de auto-limpeza e pela realização inadequada da escovação dental nessa área. Dessa forma, pela superfície oclusal ser uma região altamente susceptível ao desenvolvimento da cárie dental, métodos preventivos foram desenvolvidos para o controle dessa lesão [Sundefeld, 2001].

O selamento de fósulas e fissuras é um método efetivo para o controle da cárie, já que o selante atua como uma barreira física [Simonsen, 2002], obliterando as imperfeições ali presentes. Desde a introdução do selamento de fósulas e fissuras por Cueto & Buonocore [1967], diferentes materiais foram lançados no mercado com as mais diversas vantagens. Serra et al. [1999] postularam que apesar da comprovada eficiência apresentada pelos selantes resinosos, em função da barreira mecânica estabelecida por sua presença na fissura, os inoméricos estariam particularmente indicados em pacientes com alto risco ou atividade de cárie, por agirem como dispositivos de liberação lenta e contínua de flúor, auxiliando a saliva na remineralização de lesões de cárie.

A saliva age como uma defesa natural por ser uma fonte natural de íons cálcio e fosfato para a remineralização [Schemehorn et al., 1999a,b]. Entretanto, as variações do pH, capacidade tampão e fluxo salivar determinarão o limite de sua capacidade de proteção dos dentes (concentração de cálcio e fosfato no meio). O benefício cariostático do flúor é mediado via íons cálcio e fosfato, supridos pela secreção salivar [Schemehorn et al., 1999b]. Se uma concentração suplementar de íons

cálcio e fosfato pudesse ser fornecida à saliva sem insolubilizar o flúor, a eficiência do flúor poderia ser aumentada.

O sal de fosfato de cálcio com características amorfas, denominado fosfato de cálcio amorfo (ACP) [Eanes, 1998], é solúvel em solução e a sua pronta transformação em fases cristalinas como apatita pode ser de grande relevância biológica [Eanes, 2001]. Estudos recentes mostram que compósitos contendo fosfato de cálcio amorfo podem liberar níveis supersaturados de íons cálcio e fosfato em proporções favoráveis para formação de apatita [Skrtic et al., 1996].

O objetivo do presente estudo foi analisar o potencial anti-cárie de selantes de fôssulas e fissuras contendo fosfato de cálcio amorfo (ACP) através de microtomografia (XMT) síncrotron.

Material e Método

Delineamento experimental

Para a realização deste estudo, cinquenta blocos de esmalte (4x4mm) foram obtidos de dentes incisivos de bovinos mantidos em formol 2%, pH 7,0, durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental [Delbem e Cury, 2002]. Esses blocos tiveram sua superfície de esmalte polida seqüencialmente. Secções transversais foram realizadas a uma distância de 1 mm da borda do bloco, sendo a parte maior (4x3 mm) do bloco utilizada no experimento. Blocos selecionados através da determinação da microdureza (Knoop) de superfície inicial (SMH_0) e os materiais testados (Tabela 1) foram submetidos à ciclagem de pH. A microdureza de superfície foi determinada (SMH_1) e os blocos submetidos à microtomografia síncrotron, para o cálculo da concentração mineral ($g_{HAP} \text{ cm}^{-3}$), em diferentes áreas do esmalte. Foram considerados fatores de variação os materiais utilizados e as áreas analisadas e, como variáveis, SMH_0 , SMH_1 e concentração mineral.

Confecção do material e adaptação ao bloco de esmalte

Foram confeccionados para cada material (Tabela 1), 10 corpos-de-prova, obtidos a partir de matrizes metálicas que apresentam uma cavidade de 3 mm de comprimento, 2 mm de largura e 1 mm de espessura. Estes foram adaptados às faces seccionadas dos blocos de esmalte e fixados com auxílio de cera pegajosa. Em seguida, este conjunto (bloco de esmalte + corpo-de-prova) foi isolado com esmalte de unha deixando a superfície de esmalte do bloco e do corpo-de-prova expostos.

Ciclagem de pH (Des>Re)

Esta fase avaliou o efeito do material utilizado em interferir com a dinâmica do processo de cárie, onde o desafio cariogênico é maior que a remineralização, utilizando o modelo preconizado por Vieira et al. [2005]. Os conjuntos “bloco + corpo-de-prova” foram submetidos a 5 ciclagens de pH, a uma temperatura de 37°C, sendo imersos nas soluções desmineralizante (6 horas – Ca e P 2,0 mmol L⁻¹ em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, 0,04 ppm F em pH 4,7 - 2,2 mL/mm²) e remineralizante (18 horas – Ca 1,5 mmol L⁻¹, P 0,9 mmol L⁻¹, KCl 0,15 mol L⁻¹ em tampão Tris 0,02 mol L⁻¹, 0,05 ppm F em pH 7,0 – 1,1 mL/mm²). Após remoção das soluções Des-Re, os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30 segundos. Após o 5º dia, os blocos permaneceram na solução remineralizadora durante 48 horas.

Análise da microdureza de superfície

Para os testes de microdureza de superfície (SMH), foi utilizado o microdurômetro Shimadzu HMV-2.000, com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos. Para a seleção dos blocos utilizando a microdureza de superfície inicial (SMH₀), foram realizadas 5 impressões no esmalte separadas entre si por uma distância de 100 µm, nas distâncias de 300 e 600 µm da borda seccionada, totalizando 10 impressões. Concluída a ciclagem de pH, os blocos de esmalte foram submetidos ao teste de microdureza de

superfície final (SMH_1), utilizando a mesma metodologia anteriormente descrita. A 300 e 600 μm do material foram realizadas 5 impressões, entre as 5 impressões iniciais, separadas entre si por uma distância de 100 μm (Figura 1). Avaliou-se, a seguir, a percentagem de alteração da microdureza de superfície ($\%SMHC = [(SMH_1 - SMH_0)/SMH_0] \times 100$) em cada distância.

Análise da microtomografia síncrotron

Secções longitudinais e transversais foram feitas no centro de cinco blocos de cada grupo e amostras no tamanho aproximado de 1,5mm x 2,0mm foram submetidas à microtomografia síncrotron, na estação 2-BM do Advanced Photon Source, IL, EUA. Os fótons de raio-X com energia de 20 KeV foram obtidos através de um duplo monocromático multi-camada (DMM) descrito por Chu et al. [2002]. Foi utilizada uma câmara CCD 2K x 2K acoplada (via lentes AXIOPLAN®) a um cintilador CdWO4 de único cristal. Os registros foram feitos a cada 0,25° de 0° a 180° e normalizados quanto a não-uniformidades. A reconstrução foi realizada com 2,8 μm voxels isotrópicos (lentes: 2,5X).

Após captura e reconstrução, as imagens foram analisadas utilizando o Software Image J [Rasband, 2006]. Para cada bloco, 4 *slices* da área mais central e polida foram selecionados. Todas as análises foram baseadas nas concentrações minerais, calculadas das mensurações do coeficiente de atenuação linear (μ) e expressas como massa da hidroxiapatita pura ($\rho=3.15 \text{ g cm}^{-3}$) por volume unitário de tecido ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$) [Dowker et al., 2003; Dowker et al., 2004]. A profundidade no esmalte analisada foi de 221,2 μm e o valor médio da concentração mineral ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$) a cada 2,8 μm foi determinado em cada *slice*. Três áreas de análise foram delineadas de acordo com a distância ao material: 1) distância = 0 a 300 μm ; 2) distância = 300 a 600 μm ; 3) 300 μm mais distantes do material (Figura 2). Para a comparação entre grupos e entre áreas, em cada *slice*, quatro regiões de maior variação do conteúdo mineral foram selecionadas (R1 = 2,8 μm ; R2 = 14,0 μm ; R3 = 25,0 μm ; R4 = 61,6 μm). A área integrada ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3} \times \mu\text{m}$) do esmalte hígido (Z) e

do esmalte pós-ciclagem de pH (Z_1) da área 1 e 2 foi determinada até 40 μm . O conteúdo mineral foi calculado através da fórmula $\Delta Z=(Z_1-Z)$.

Análise Estatística

Os dados obtidos da SMH_0 , SMH_1 , %SMHC, $g_{HAP} \text{ cm}^{-3}$ nas 4 regiões de maior variação do conteúdo mineral em cada distância e ΔZ , após comprovação de sua homogeneidade, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Realizou-se teste de correlação Pearson para comparação entre os valores de SMH_2 e ΔZ . As análises foram feitas utilizando o software GMC versão 2002 [Campos, 2003] e o nível de significância estabelecido foi de 5%.

Resultado

A média dos valores obtidos para SMH_0 nas duas regiões analisadas (300 e 600 μm da borda seccionada) para todos os blocos dos grupos foi $354,6 \pm 8,2$ KHN ($p>0,05$), não diferindo entre os tratamentos. Na Tabela 2, observa-se que não houve diferença significativa entre as distâncias, em relação à média final da SMH_1 , no grupo Ultraseal; para os demais materiais, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). A média final da SMH_1 para o selante com ACP (Aegis) a 600 μm foi similar ao do grupo Ultraseal ($p<0,05$). A 300 μm , o grupo Aegis apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo Ultraseal, porém o seu efeito foi bem menor quando comparado aos grupos Vitremer e Embrace. O selante experimental mostrou um efeito maior nas distâncias de 300 e 600 μm quando comparado ao grupo Aegis, entretanto, não foi tão efetivo quanto o grupo Vitremer e Embrace ($p>0,05$).

A média dos valores obtidos para a concentração mineral para o esmalte bovino hígido dos blocos analisados foi de $2,40 \pm 0,06$ $g_{HAP} \text{ cm}^{-3}$. Os resultados de ΔZ da XMT síncrotron (Tabela 2) mostram, nas 3 áreas analisadas, que não houve diferença significativa entre os grupos Ultraseal e Aegis ($p>0,05$). O selante experimental apresentou

concentração mineral similar ao Embrace na área 1. Após comparação dos valores de SMH_1 e ΔZ obtidos para cada grupo, observou-se uma correlação positiva (300 μm : $r=0,9696$ e $p=0,0160$; 600 μm : $r=0,9920$ e $p=0,0000001$).

Os gráficos referentes ao perfil de lesão de cada grupo em função da profundidade no esmalte (μm), após ciclagem de pH, estão agrupados na Figura 3. O esmalte superficial está indicado no Gráfico B e as regiões selecionadas para comparação da concentração mineral ($g_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$) entre os grupos estão demarcadas no Gráfico C. A figura 4 apresenta as médias da distribuição da concentração mineral ($g_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$) nas quatro regiões de maior variação. Na camada mais superficial do esmalte (R1), a maior concentração mineral foi encontrada nos produtos que contém agentes anti-cárie. Na região 2 (base da lesão), independentemente da área analisada, os grupos Ultraseal e Aegis apresentaram menor concentração mineral quando comparados com os outros grupos.

Discussão

Com a preocupação de melhorar a eficiência dos materiais odontológicos em reduzir a progressão da lesão de cárie, a inclusão de agentes anti-cárie de liberação lenta tem sido estudada. Apesar do flúor presente nos cimentos ionoméricos apresentar comprovada eficácia em reduzir a perda mineral, a literatura relata que com o uso de selantes resinosos este efeito é menor. Entretanto, neste estudo *in vitro*, os resultados das médias da microdureza de superfície e análise da concentração mineral através da XMT síncrotron (Tabela 2) indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Vitremer (cimento ionomérico) e Embrace (selante resinoso). Vale a pena ressaltar que o Vitremer foi utilizado neste estudo na sua forma diluída (proporção pó/líquido de 1/4:1), método preconizado para o selamento de fósulas e fissuras.

De qualquer forma, com o objetivo de melhorar a performance dos selantes resinosos em relação aos ionoméricos, tem-se testado outros compostos que apresentam a função de liberar para o meio cálcio e fosfato. O uso do cálcio e fosfato nos produtos pode tornar isto possível, pois fazem parte, juntamente com o flúor, do processo de prevenção da doença cárie. Considerações teóricas indicam que íons cálcio e fosfato, em quantidades adequadas na placa dental, podem diminuir a dissolução do esmalte [Schemehorn et al., 1999b]. Experimentos com compostos contendo cálcio e/ou fosfato vem estudando a supersaturação na saliva e placa dental destes elementos com objetivo de aumentar a proteção do esmalte [GAFFAR *et al.*, 1993; SCHEMCHORN *et al.*, 1999b; KASHKET, 1999; WHITFORD *et al.*, 2005].

A comparação dos resultados da SMH e XMT síncrotron mostra uma relação positiva (área 1: $r=0,9696$ e área 2: $r=0,9920$) entre a microdureza de superfície e concentração mineral ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$), quando analisamos os dados de ΔZ até a profundidade de 40 μm (região da lesão de subsuperfície). A microdureza de superfície variou de acordo com a concentração mineral na área 1 e 2 da lesão permitindo uma avaliação adequada da perda mineral. Entretanto, quando se relacionou os valores de microdureza aos dados de concentração mineral na camada mais superficial (2,8 μm) não houve correlação entre os resultados, mesmo analisando as regiões com menor concentração mineral.

Através da análise de microdureza de superfície foi possível determinar diferenças nas distâncias de 300 e 600 μm da borda seccionada (Tabela 2), pois foi realizada em pontos específicos, não considerando uma área e o corpo da lesão como um todo. A XMT síncrotron é capaz de determinar a concentração mineral no corpo da lesão e por esse motivo tal diferença não foi detectada (Tabela 2). Entretanto, ao analisar a concentração mineral nas regiões de maior variação foi possível detectar diferenças entre as áreas analisadas (Figura 4).

Apesar dos recentes estudos mostrarem as vantagens do cálcio e fosfato no processo de remineralização, no presente estudo, o

selante contendo fosfato de cálcio amorfo (Aegis[®]) apresentou um dos piores resultados em termos de reduzir a perda mineral. Entretanto, observou-se um aumento na concentração mineral ($2,63 \text{ g}_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$) na superfície do esmalte ($2,8 \mu\text{m}$) quando comparado ao esmalte hígido ($2,40 \text{ g}_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$) na área I. Quando se associou o fosfato de cálcio amorfo (ACP) ao flúor (Selante experimental) a perda foi menor em comparação ao Aegis ($p < 0,05$). Assim, a melhora nos resultados encontrada com o selante experimental em relação ao Aegis, foi devido à presença do flúor e não da sua associação com ACP, mantendo concentração similar ao esmalte hígido (Figura 4).

No geral, os resultados obtidos não foram positivos em termos de associar uma fonte de cálcio e fosfato a uma fonte de flúor para reduzir o processo de desmineralização. Porém, não ocorreu a insolubilização do flúor na presença do ACP no interior do material, pois os resultados indicam a potencialização da capacidade anti-cárie. Além disso, os materiais que liberaram flúor aumentaram a concentração em relação a HAp na camada mais superficial do esmalte, em relação ao esmalte hígido ($2,40 \text{ g}_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$), na área 1 (próxima ao material): 2,91, 2,77 e 2,72 $\text{g}_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$ para o Vitremer, Selante experimental e Embrace, respectivamente. Estes valores são similares aos relatados para o esmalte humano hígido ($2,78\text{-}2,83 \text{ g}_{\text{HAp}} \text{ cm}^{-3}$) [Dowker et al., 2004].

Baseado nos resultados deste estudo in vitro, concluiu-se que o fosfato de cálcio amorfo incorporado a selantes resinosos apresenta baixa capacidade de reduzir a perda mineral no esmalte, e que o fosfato de cálcio amorfo associado ao flúor incorporado a selantes resinosos apresenta características potencializadas quando comparado ao selante com CPP-ACP apenas. Entretanto, estudos in situ devem ser realizados para a confirmação dos dados relatados neste estudo.

Referências Bibliográficas*

Campos GM: GMC 2002. Ribeirão Preto: School of Dentistry, n.d. Available at: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html#gmc>. Accessed on Feb 21, 2003.

Chu YS, Liu C, Mancini DC, de Carlo F, Macrander AT, Shu D: Performance of a double multilayer monochromator at 2-BM at the Advanced Photon Source. *Rev Sci Instrum* 2002;73:1485-1487.

Cueto EJ, Buonocore MG: Sealing of pits and fissures with an adhesive resin: its use in caries prevention. *J Am Dent Assoc* 1967;75:121-128.

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* 2002;15:169-172.

Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wassif HS: Longitudinal study of the three-dimensional development of subsurface enamel lesions during in vitro demineralization. *Caries Res* 2003;37:237-245.

Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P: Synchrotron X-Ray microtomographic investigation of mineral concentrations at micrometer scale in sound and carious enamel. *Caries Res* 2004;38:514-522.

Eanes ED: Historical perspective on the discovery of amorphous calcium phosphate (ACP). *J Dent Res* 1998;77:6-7.

Eanes ED: Amorphous calcium phosphate. *Monogr Oral Sci* 2001;18:130-147.

* de acordo com as normas do periódico internacional *Caries Research*

Eklund SA, Ismail AI: Time of development of occlusal and proximal lesions implications for fissure sealants. J Public Health Dent 1991;46:114-121.

Gaffar A, Blake-Haskins SJ, Mellberg J. In vivo studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. Int Dent J 1993;43:81-88.

Kashket S: Historical review of remineralization research. J Clin Dent 1999;10:56-64.

Serra MC, Pimenta LAF, Paulillo LAMS. Dentística e manutenção de saúde bucal. IN: KRIEGER, L. ABOPREV. Promoção de saúde bucal. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999. 475p.

Simonsen RJ: Pit and fissure sealant: review of the literature. Pediat Dent 2002;24:393-414.

Schemehorn BR, Wood GD, Winston AE: Laboratory enamel solubility reduction and fluoride uptake from enamelon dentifrice. J Clin Dent 1999a;10(Spec. n. 1):9-12.

Schemehorn BR, Orban JC, Wood GD, Fischer GM, Winston AE: Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. J Clin Dent 1999b;10(Spec. n. 1):13-16.

Skrtic D, Hailer AW, Takagi S, Antonucci JM, Eanes ED. Quantitative assessment of the efficacy of amorphous calcium phosphate/methacrylate composites in remineralizing caries-like lesions artificially produced in bovine enamel. J Dent Res 1996;75:1679-1686.

Sundefeld RH: A eficiência da aplicação de selantes na prevenção das lesões de fósulas e fissuras. análises clínico-fotográfica e clínico-computadorizada. Araçatuba, 2001. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista. http://www.foa.unesp.br/corpo_docente/renatosundefeld/index.htm

Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, Waller JL: Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Res* 2005;39:100-107.

Rasband W: ImageJ 1.34. NIH. Available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 2006.

Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cunha RF, Cury JA: Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Research* 2005;39:514-520.

Tabela 1 – Identificação dos materiais testados

Material	Fabricante	Classificação	Lote
Ultraseal XT [®] plus [™]	Ultradent	Selante fotopolimerizável resinoso	B 0997
Aegis [®]	Bosworth Company	Selante fotopolimerizável resinoso com CPP-ACP	0407-397
Selante experimental	Bosworth Company	Selante fotopolimerizável resinoso com flúor e CPP- ACP	HJB6-203A
Embrace [®]	Pulpdent Corporation	Selante fotopolimerizável resinoso com flúor	040923
Vitremer [®] (proporção pó/líquido de ¼:1)	3M/ESPE	Cimento de ionômero de vidro modificado por resina	22015

Tabela 2 – Microdureza de superfície no esmalte após ciclagem de pH (SMH_1) e concentração mineral (ΔZ) (média \pm dp)

GRUPO	Análise				
	SMH ₁ (Knoop)		ΔZ (g _{HAP} cm ⁻³ x μ m)		
	300 μ m	600 μ m	Área 1	Área 2	Área 3
Ultraseal	^A 47,9 \pm 20,8 ^a	^A 47,5 \pm 20,8 ^a	^A -25,2 \pm 5,5 ^a	^A -31,1 \pm 9,9 ^a	^A -28,5 \pm 6,3 ^a
Aegis	^A 94,7 \pm 45,1 ^b	^B 55,9 \pm 48,6 ^a	^A -19,4 \pm 4,8 ^{a,b}	^{A,B} -25,1 \pm 8,5 ^a	^B -27,8 \pm 4,5 ^a
Selante experimental	^A 213,9 \pm 37,0 ^c	^B 154,4 \pm 35,7 ^b	^A -14,6 \pm 4,9 ^{b,c}	^A -15,6 \pm 0,8 ^b	^A -20,5 \pm 0,9 ^b
Embrace	^A 285,6 \pm 21,3 ^d	^B 229,1 \pm 32,7 ^c	^A -9,0 \pm 4,6 ^{c,d}	^A -7,5 \pm 6,0 ^c	^A -10,4 \pm 4,7 ^c
Vitremer	^A 288,9 \pm 19,8 ^d	^B 247,0 \pm 31,0 ^c	^A -5,0 \pm 2,5 ^d	^A -5,2 \pm 2,6 ^c	^A -9,2 \pm 3,4 ^c

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas referem-se à comparação entre as áreas em cada grupo;

Letras minúsculas referem-se à comparação entre os grupos em cada área.

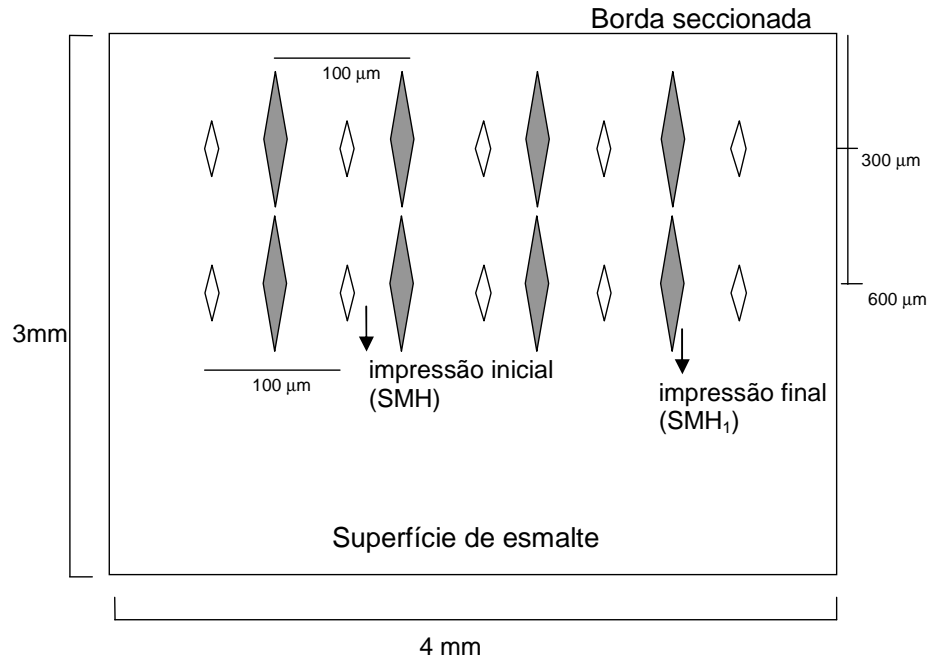


Figura 1 – Ilustração dos testes de microdureza de superfície.

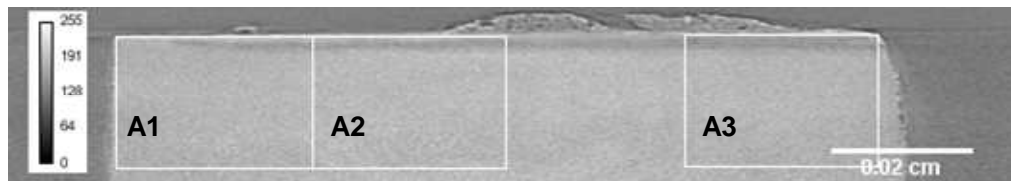


Figura 2 – Um dos slices de um bloco do grupo Aegis após ciclagem de pH. As áreas (A) foram delineadas de acordo com a distância ao material (A1 = 0 a 300 μm ; A2 = 300 a 600 μm ; A3 = 300 μm mais distantes).

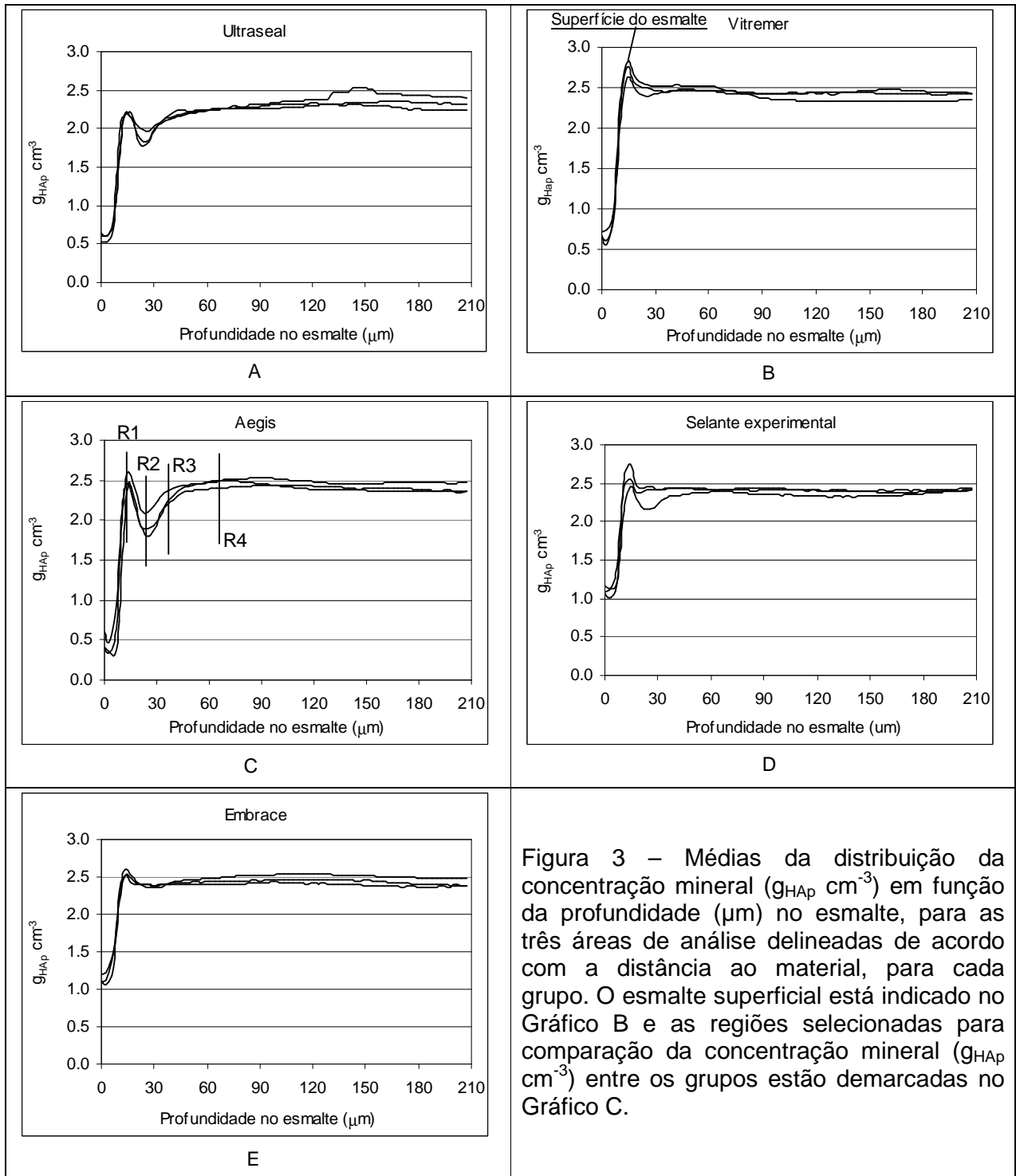


Figura 3 – Médias da distribuição da concentração mineral ($g_{HAP} \text{ cm}^{-3}$) em função da profundidade (μm) no esmalte, para as três áreas de análise delineadas de acordo com a distância ao material, para cada grupo. O esmalte superficial está indicado no Gráfico B e as regiões selecionadas para comparação da concentração mineral ($g_{HAP} \text{ cm}^{-3}$) entre os grupos estão demarcadas no Gráfico C.

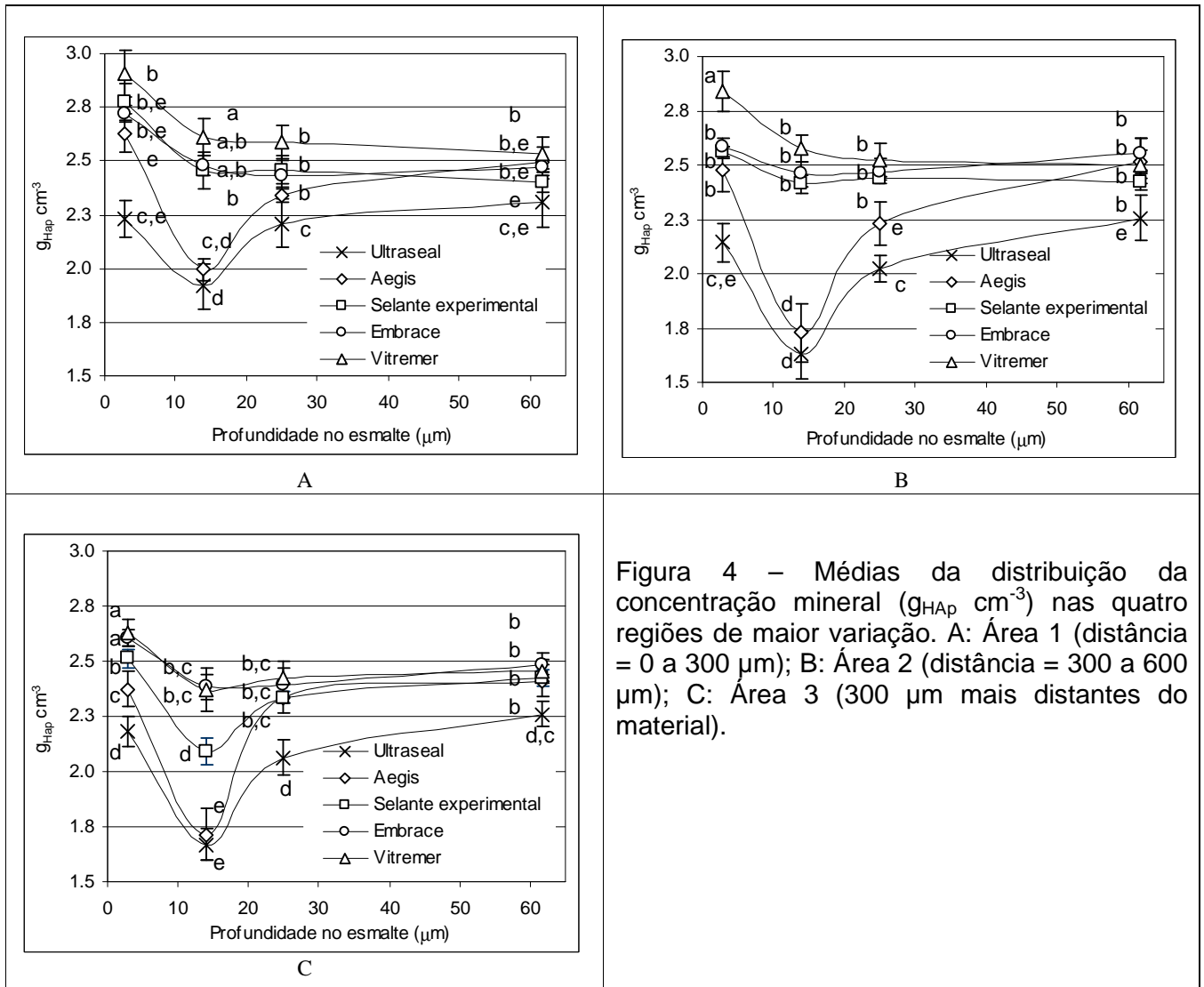


Figura 4 – Médias da distribuição da concentração mineral ($g_{HAp} \text{ cm}^{-3}$) nas quatro regiões de maior variação. A: Área 1 (distância = 0 a 300 μm); B: Área 2 (distância = 300 a 600 μm); C: Área 3 (300 μm mais distantes do material).

Capítulo 5

DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO
MINERAL DE ESMALTE BOVINO
APÓS APLICAÇÃO DE PASTA
CONTENDO FOSFATO DE
CÁLCIO AMORFO ATRAVÉS DE
MICROTOMOGRAFIA
SÍNCROTRON

**DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO MINERAL DE ESMALTE BOVINO
APÓS APLICAÇÃO DE PASTA CONTENDO FOSFATO DE CÁLCIO
AMORFO ATRAVÉS DE MICROTOMOGRAFIA SÍNCROTRON**

AEM Vieira¹, ACB Delbem¹, KT Sasski¹, M Danelon¹, E Rodrigues¹,
SR Stock², ML Cannon³, X Xiao⁴, F De Carlo⁴, ACB Delbem⁵

¹ São Paulo State University – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil

² Dept. of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Feinberg
School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL USA

³ Children's Memorial Medical Center, Chicago, IL, USA

⁴ Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, IL,
USA

⁵ University of São Paulo – USP, São Carlos, São Paulo, Brasil

Palavras-chave: esmalte - bovino, ciclagem de pH, remineralização,
fosfato de cálcio, dureza, síncrotron

Ana Elisa de Mello Vieira
Rua Afonso Pena 325 – ap. 92
Araçatuba – SP
Cep 16010-370
Tel. 18-3621-2375
aemvieira@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi determinar o conteúdo mineral do esmalte bovino após aplicação de pasta contendo fosfato de cálcio amorfo através da microtomografia síncrotron. Lesões artificiais de cárie foram produzidas em sessenta blocos de esmalte selecionados após microdureza de superfície. Os tratamentos (Controle, Gel fluoretado neutro 1min, Pasta MI 3min, Gel 1 min + Pasta MI 3 min, Pasta MI 3h, Pasta MI 8h) foram realizados e os blocos de esmalte foram mantidos em saliva humana não estimulada durante 30 minutos previamente à ciclagem de pH [Vieira et al., 2005]. A microdureza de superfície foi determinada e os blocos submetidos à microtomografia (XMT) síncrotron, para o cálculo da concentração mineral ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$), em diferentes áreas do esmalte. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos Controle, Pasta MI 3h e Pasta MI 8h, quando da avaliação da percentagem de alteração da microdureza de superfície. Os resultados da XMT síncrotron referente aos grupos Pasta MI 3h e Pasta MI 8h, revelaram uma lesão de cárie com duas zonas escuras, sugerindo uma remineralização na parte mais interna da lesão. Baseado nos resultados deste estudo in vitro, concluiu-se que o fosfato de cálcio amorfo não foi eficiente para ativar a remineralização do esmalte dental.

Introdução

No final de 2002, foi introduzida no mercado a Pasta MI (GC Dental) que é um creme com RECALDENT™ (CPP-ACP), uma proteína especial derivada do leite que auxilia na remineralização dos dentes. Segundo o fabricante, a Pasta MI libera uma grande quantidade de íons cálcio e fosfato ao esmalte [Reynolds, 1998; Reynolds, 1999; Sato et al., 2003], ajudando a manter um estado de super-saturação de cálcio e fosfato na superfície dentária, ativando a remineralização. É capaz de prevenir e reverter lesões iniciais de cárie (manchas brancas) [Reynolds, 1995] e, associada ao flúor do dentifrício, fortifica o esmalte dental mais efetivamente quando comparada à ação do flúor somente.

O seu efeito cariostático é devido à ação química da fosfoproteína caseína, pois tem a capacidade de estabilizar fosfato de cálcio na solução através de fosfato de cálcio amorfo (ACP). Isto leva à formação de pequenos “clusters” de CPP-ACP [Yamaguchi et al., 2006]. Os fosfopeptídeos de caseína (CPP) são peptídeos multifosforilados, derivados do leite de vaca. Assim o CPP estabiliza os íons cálcio e fosfato em solução como um fosfato de cálcio amorfo. Pode reter até 25 íons cálcio, 15 íons fosfato e 5 íons flúor por molécula. Assim, o CPP-ACP fica ligado à superfície do dente, e durante desafios cariogênicos pode liberar cálcio e fosfato, mantendo a supersaturação dos íons nas proximidades, diminuindo a desmineralização e aumentando a remineralização [Reynolds, 1997; Reynolds, 1998; Yamaguchi et al., 2006]. O CPP-ACP promove aumento dos pontos de adesão na película da saliva, à superfície de bactérias e placa dental para o cálcio e fosfatos inorgânicos [Rose, 2000; Reynolds et al., 2003], tornando a difusão dos íons mais lenta, reduzindo a perda mineral da placa.

O objetivo do presente estudo foi determinar o conteúdo mineral do esmalte bovino após aplicação de pasta contendo fosfato de cálcio amorfo através da microtomografia síncrotron.

Material e Método

Delineamento experimental

Para a realização deste estudo, blocos de esmalte (4x4mm) foram obtidos de dentes incisivos de bovinos mantidos em formol 2%, pH 7,0, durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental [Delbem e Cury, 2002]. Esses blocos tiveram sua superfície de esmalte polida seqüencialmente, o que permitiu a seleção através da determinação da microdureza de superfície inicial (SMH_0). Lesões artificiais de cárie foram produzidas nos blocos de esmalte e determinou-se então a microdureza de superfície pós-desmineralização (SMH_1). O delineamento experimental foi casualizado e os blocos divididos em seis grupos experimentais de dez espécimes cada: Controle - sem tratamento; Gel 1 min - aplicação de gel fluoretado neutro pH 7,0 (2%NaF, Vigodent, Brasil) durante 1 minuto; Pasta MI 3 min – aplicação da pasta MI (GC Corporation, Japão) durante 3 minutos; Gel + Pasta MI – aplicação do gel fluoretado neutro durante 1 minuto seguido da aplicação da Pasta MI durante 3 minutos; Pasta MI 3h – aplicação da Pasta MI por 3 h; Pasta MI 8h – aplicação da Pasta MI por 8h. Os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30 segundos e mantidos em saliva humana não estimulada (2mL/bloco) durante 30 minutos previamente à ciclagem de pH. Foram então submetidos durante seis dias consecutivos a seis ciclagens de pH à temperatura de 37° C [Vieira et al., 2005]. A microdureza de superfície foi determinada (SMH_2) e os blocos submetidos à microtomografia síncrotron, para o cálculo da concentração mineral ($g_{HAP} \text{ cm}^{-3}$), em diferentes áreas do esmalte. Foram considerados fatores de variação os materiais utilizados e, como variáveis, SMH_0 , SMH_1 e SMH_2 e concentração mineral.

Indução da lesão artificial de cárie

Lesões artificiais de cárie foram produzidas, após SMH , através da imersão em 32 mL de solução contendo 1,3 mmol L⁻¹ Ca, 0,78 mmol L⁻¹ P em tampão acetato 0,05 mol L⁻¹, em pH 5,0; 0,03 ppm F, por

um período de 16 horas, a uma temperatura de 37°C, para produção de cárie [Queiroz et al., 2003]. Os blocos foram submetidos à análise de microdureza de superfície pós-desmineralização (SMH₁), quando as indentações distanciaram a 100 µm das impressões iniciais.

Ciclagem de pH (Re>Des)

Esta fase avaliou o efeito dos produtos testados em promover a remineralização da lesão de cárie artificial, utilizando o modelo preconizado por Vieira et al. [2005]. Blocos de esmalte bovino, isolados com uma fina camada de esmalte de unha, foram submetidos individualmente durante seis dias a seis ciclagens de pH, à temperatura de 37° C, sendo imersos em solução remineralizadora (1,5 mmol L⁻¹ Ca, 0,9 mmol L⁻¹ P, 0,15 mmol L⁻¹ KCl em tampão cacodilato 0,02 mmol L⁻¹, 0,02 ppm F, em pH 7,0; 4 mL por bloco), a qual foi trocada duas vezes ao dia (8 e 16 horas). Os desafios cariogênicos foram realizados com a solução desmineralizadora (2,0 mmol L⁻¹ Ca e P em tampão acetato 0,075 mol L⁻¹, 0,03 ppm F, em pH 4,7; 12 mL para cada bloco) durante duas horas (12 às 14 horas). Os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30 segundos, após remoção das soluções Des-Re, que foram trocadas diariamente.

Análise da microdureza de superfície

Para os testes de microdureza de superfície (SMH), foi utilizado o microdurômetro Shimadzu HMV-2.000, com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos. Para a seleção dos blocos utilizando a microdureza de superfície inicial (SMH₀), foram realizadas 5 impressões no esmalte separadas entre si por uma distância de 100 µm na região central de cada bloco. Os blocos foram submetidos à análise de SMH₁, como anteriormente descrito, e, após a ciclagem de pH, realizaram-se cinco indentações (SMH₂) a 100 µm das impressões de SMH₁. A percentagem de alteração de dureza de superfície (%SMHR) foi então calculada [%SMHR = ((SMH₂–SMH₁)/(SMH₀–SMH₁))x100].

Análise da microtomografia síncrotron

Secções longitudinais foram feitas no centro de seis blocos de cada grupo e amostras no tamanho aproximado de 2,0mm x 4,0mm foram submetidas à microtomografia síncrotron, na estação 2-BM do Advanced Photon Source, IL, EUA. Os fótons de raio-X com energia de 20 KeV foram obtidos através de um duplo monocromático multi-camada (DMM) descrito por Chu et al. [2002]. Foi utilizada uma câmara CCD 2K x 2K acoplada (via lentes AXIOPLAN®) a um cintilador CdWO₄ de único cristal. Os registros foram feitos a cada 0,25° de 0° a 180° e normalizados quanto a não-uniformidades. A reconstrução foi realizada com 2,8 µm voxels isotrópicos (lentes: 2,5X).

Após captura e reconstrução, as imagens foram analisadas utilizando o Software Image J [Rasband, 2006]. Para cada bloco, 6 *slices* da área mais central e polida foram selecionados. Todas as análises foram baseadas nas concentrações minerais, calculadas das mensurações do coeficiente de atenuação linear (μ) e expressas como massa da hidroxiapatita pura ($\rho=3.15 \text{ g cm}^{-3}$) por volume unitário de tecido ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$) [Dowker et al., 2003; Dowker et al., 2004]. A profundidade no esmalte analisada foi de 221,2 µm e o valor médio da concentração mineral ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$) a cada 2,8 µm foi determinado em cada *slice*. Para a comparação entre grupos, em cada *slice*, cinco regiões de maior variação do conteúdo mineral foram selecionadas (2,8 µm; 11,2 µm; 16,2 µm; 25,2 µm; 42,0 µm). A área integrada ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3} \times \mu\text{m}$) do esmalte hígido (Z) e do esmalte pós-ciclagem de pH (Z₁) foi determinada até 40 µm. O conteúdo mineral foi calculado através da fórmula $\Delta Z=(Z_1-Z)$.

Análise Estatística

Os dados obtidos da SMH₀, SMH₁, SMH₂, %SMHR, $g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$ nas 5 regiões e ΔZ , após comprovação de sua homogeneidade, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Realizou-se teste de correlação Pearson para comparação entre os valores de SMH₂ e ΔZ . As análises foram feitas utilizando o software

GMC versão 2002 [Campos, 2003] e o nível de significância estabelecido foi de 5%.

Resultado

A média dos valores obtidos para SMH_0 para todos os blocos dos grupos foi $362,6 \pm 11,3$ KHN ($p > 0,05$) e SMH_1 foi $62,7 \pm 24,7$ KHN ($p > 0,05$), não diferindo entre os tratamentos. Os grupos Gel 1 min, Gel + Pasta MI e Pasta MI 3 min apresentaram aumento significativo da %SMHR, sendo diferentes entre si ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos Controle, Pasta MI 3h e Pasta MI 8h (Tabela 1).

A média dos valores obtidos para a concentração mineral para o esmalte bovino hígido dos blocos analisados foi de $2,46 \pm 0,07$ $g_{HAp} cm^{-3}$. Os resultados de ΔZ da XMT síncrotron mostram que o grupo Gel 1 min apresentou maior concentração mineral quando comparado aos demais grupos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos Gel 1 min e Pasta MI 3 min, e entre os grupos Pasta MI 3 min e Gel + Pasta MI (Tabela 1). Houve correlação inversa entre os valores de SMH_2 e ΔZ obtidos para cada grupo ($r = -0,8634$; $p = 0,0274$).

Os gráficos referentes ao perfil de lesão em função da profundidade no esmalte (μm), após ciclagem de pH, estão agrupados na Figura 1. O esmalte superficial está indicado no Gráfico B e as áreas selecionadas para comparação da concentração mineral ($g_{HAp} cm^{-3}$) entre os grupos estão demarcadas no Gráfico F, referente a um dos grupos que apresentou a maior variação de conteúdo mineral. Na tabela 2, estão especificadas as cinco regiões de maior variação do conteúdo mineral que foram selecionadas para comparação entre os grupos. Os Gráficos F e G (Figura 1) mostram superfície de esmalte pouco mineralizada dos grupos Pasta MI 3h e 8h, mas semelhantes ao grupo Controle (Tabela 2), e uma lesão de cárie com duas zonas escuras (Figuras 3 e 4). O grupo Gel 1 min apresentou maior concentração mineral ($p < 0,05$) na camada mais superficial ($2,8 \mu m$) juntamente com o grupo Pasta MI ($p > 0,05$). Na

profundidade de 11,2 μm o grupo Gel 1 min diferiu dos demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos Pasta MI 3h e 8h apresentaram concentração mineral semelhante ao grupo Controle na profundidade de 11,2 μm ($p > 0,05$). Na profundidade de 25,2 μm os dois grupos mantiveram os mesmos resultados, porém com menor concentração mineral quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$). A Figura 2 ilustra uma lesão de cárie subsuperficial do grupo Controle após análise com luz síncrotron.

Discussão

A remineralização de lesões iniciais de cárie pode ocorrer através da ação de íons cálcio e fosfato da saliva ou de outras fontes (dentifrícios, gomas de mascar, bebidas...) [Tung e Eichmiller, 2004] liberação de íons flúor de fonte sistêmica (água de abastecimento, sal fluoretado, comprimidos...) ou tópica (dentifrícios, vernizes, géis, espumas...) [Legeros, 1999]. Neste estudo, a ação do fosfato de cálcio amorfo (ACP) foi avaliada e comparada com a de um gel fluoretado, um dos produtos mais aceitos internacionalmente quando o assunto é remineralização. O objetivo foi verificar, em ciclagem de pH, o efeito dos produtos testados em promover a remineralização da lesão de cárie artificial.

A escolha do modo e tempo de aplicação da Pasta MI seguiu as instruções do fabricante. O grupo Pasta MI 3h foi testado já que está especificado que quanto mais a Pasta MI permanecer na cavidade bucal, mais efetiva será, proporcionando uma liberação de íons cálcio e fosfato durante três horas. A partir deste pensamento, o tempo de 8 horas foi instituído para comparações. Clinicamente, o paciente seria instruído a aplicar a pasta em uma moldeira individual e levá-la à cavidade bucal, onde permaneceria por 3 ou 8 horas. O gel fluoretado foi aplicado durante 1 minuto, de acordo com Delbem e Cury [2002].

A comparação dos resultados da SMH e XMT síncrotron mostra uma relação inversa ($p = -0,8634$; $p = 0,0274$) entre a microdureza de superfície e concentração mineral ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$), quando analisa-se os dados de ΔZ até a profundidade de 40 μm (região da lesão de

subsuperfície). A microdureza de superfície variou de acordo com a concentração mineral na área da lesão permitindo uma avaliação adequada da perda mineral. Entretanto, quando se relacionou os valores de microdureza aos dados de concentração mineral na camada mais superficial (2,8 μm) não houve correlação entre os resultados, mesmo analisando as regiões com menor concentração mineral.

A comparação dos resultados da microdureza de superfície e ΔZ entre os grupos Gel e Gel + Pasta MI mostra que quando a associação dos tratamentos foi realizada, o efeito do gel fluoretado foi alterado pela Pasta MI, levando a uma redução da remineralização. O grupo Gel aumentou a concentração mineral em relação à HAp (2,69 $\text{g}_{\text{HAp}} \text{cm}^{-3}$) na camada mais superficial do esmalte, em relação ao esmalte hígido (2,40 $\text{g}_{\text{HAp}} \text{cm}^{-3}$). Estes valores são similares aos do esmalte humano hígido (2,65-2,83 $\text{g}_{\text{HAp}} \text{cm}^{-3}$) [Dowker et al., 2004]. No grupo Pasta MI 3 min, provavelmente os depósitos de fosfato de cálcio na superfície do esmalte, pouco solúveis, promoveram uma ação mais superficial no esmalte (2,8 μm ; 2,46 $\text{g}_{\text{HAp}} \text{cm}^{-3}$). Estes depósitos de proteína associado ao fosfato de cálcio amorfo podem ter obliterado os poros na superfície do esmalte reduzindo as trocas iônicas ou mesmo terem penetrado no corpo da lesão impedindo a recristalização ou precipitação dos minerais e, conseqüentemente, a remineralização nos grupos Gel +Pasta MI, Pasta MI 3h e 8h. Portanto, os resultados obtidos não foram positivos em termos de associar uma fonte de cálcio e fosfato a uma fonte de flúor para ativar o processo de remineralização. Por outro lado, os resultados do grupo Gel + Pasta MI e Pasta MI 3 min mostram que não ocorreu a insolubilização do flúor na presença do ACP, pois os resultados da associação indicam a potencialização da capacidade anti-cárie.

Os grupos Pasta MI 3h e Pasta MI 8h apresentaram a maior variação de conteúdo mineral. Os resultados da XMT síncrotron expressos nos gráficos referente ao perfil de lesão após ciclagem de remineralização para estes grupos, revelam uma lesão de cárie com duas zonas escuras, sugerindo uma remineralização ou precipitação mineral mais superficial no corpo da lesão e com valores similares ($p>005$) à

superfície do esmalte: 2,11 e 2,10 $\text{g}_{\text{HAP}} \text{cm}^{-3}$ no grupo Pasta MI 3h, respectivamente; e 2,18 e 2,27 $\text{g}_{\text{HAP}} \text{cm}^{-3}$ no grupo Pasta MI 8h. Este padrão de lesão foi observado somente nas amostras destes dois grupos (Figuras 1, 3 e 4). A concentração mineral nestes grupos foi similar ao controle (2,28 $\text{g}_{\text{HAP}} \text{cm}^{-3}$) na região mais superficial do esmalte (2,8 μm). De acordo com a literatura, os depósitos de proteína associados ao fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP) deveriam saturar o meio com íons cálcio e fosfato, favorecendo a remineralização, e aumentar a precipitação de hidroxiapatita no esmalte. É possível que, além de interferir na remineralização, estes depósitos não reduziram a perda mineral durante a ciclagem, mesmo em curto período de tempo (2 horas). Isto pode, também, ajudar a explicar uma lesão de cárie subsuperficial em duas zonas.

Baseado nos resultados deste estudo in vitro, concluiu-se que o fosfato de cálcio amorfo não foi eficiente para ativar a remineralização do esmalte dental.

Referências Bibliográficas*

Campos GM: GMC 2002. Ribeirão Preto: School of Dentistry, n.d.
Available at: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html#gmc>.
Accessed on Feb 21, 2003.

Chu YS, Liu C, Mancini DC, de Carlo F, Macrander AT, Shu D:
Performance of a double multilayer monochromator at 2-BM at the
Advanced Photon Source. *Rev Sci Instrum* 2002;73:1485-1487.

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*
2002;15:169-172.

Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wassif HS: Longitudinal study of the
three-dimensional development of subsurface enamel lesions during *in*
vitro demineralization. *Caries Res* 2003;37:237-245.

Dowker SEP, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P: Synchrotron X-
Ray microtomographic investigation of mineral concentrations at
micrometer scale in sound and carious enamel. *Caries Res* 2004;38:514-
522.

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* 2006;114(Suppl. 1):353-359.

Legeros RZ: Calcium phosphates in demineralization/remineralization
processes. *J Clin Dent* 1999;10:65-73.

* de acordo com as normas do periódico internacional *Caries Research*

Queiroz CS, Hara AT, Leme FP, Cury JA: Avaliação de um modelo de ciclagem de pH na remineralização do esmalte e no efeito dose-resposta do flúor (Resumo pc092). *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(Supl. 2): 221.

Rasband W: ImageJ 1.34. NIH. Available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 2006.

Reynolds EC: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res* 1997;76:1587-1595.

Reynolds EC: Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist* 1998;18:8-16.

Reynolds EC: The role of phosphopeptides in caries prevention. *Dental Perspectives* 1999;3:6-7.

Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD: Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res* 2003;82:206-211.

Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, Perich JW: Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dent Res* 1995;74:1272-1279.

Rose RK: Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol* 2000;45:569-575.

Sato T, Yamanaka K, Yoshii E: Caries prevention potential of a tooth-coating material containing casein phosphopeptide - amorphous calcium phosphate (CPP – ACP).

<http://iadr.confex.com/iadr/2003Goteborg/techprogram/abstract33123.htm>, 2003.

Tung MS, Eichmiller FC: Amorphous calcium phosphates for tooth mineralization. *Compend Contin Educ Dent* 2004;25:9-13.

Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cunha RF, Cury JA: Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Research* 2005;39:514-520.

Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK: Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *J Dent* 2006;34: 230-236.

Tabela 1 – Valores médios (média \pm dp) da microdureza (Knoop) de superfície final (SMH₂; n=10), percentagem de alteração da microdureza de superfície (%SMHR; n=10) e XMT síncrotron (ΔZ ; n=6)

Grupo	ANÁLISE		
	SMH ₂	%SMHR	ΔZ (g _{HAP} cm ⁻³ x μ m)
Controle	115,8 \pm 32,6 ^{a,c}	18,1 \pm 5,1 ^a	-17,6 \pm 3,9 ^a
Gel 1 min	200,6 \pm 21,2 ^{b,d}	46,4 \pm 4,4 ^b	-4,3 \pm 1,0 ^b
Pasta MI 3 min	143,1 \pm 23,9 ^{c,d}	25,3 \pm 4,6 ^c	-7,7 \pm 2,3 ^{c,b}
Gel + Pasta MI	173,9 \pm 15,8 ^d	38,3 \pm 3,1 ^d	-10,7 \pm 5,6 ^c
Pasta MI 3h	102,1 \pm 34,9 ^a	13,3 \pm 7,1 ^a	-17,3 \pm 2,7 ^a
Pasta MI 8h	107,7 \pm 23,6 ^a	14,1 \pm 4,7 ^a	-15,7 \pm 4,3 ^a

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se à comparação entre os grupos em cada análise.

Tabela 2 – Valores médios (média \pm dp, n=6) de concentração mineral ($g_{\text{HAP}} \text{ cm}^{-3}$) no esmalte de acordo com os grupos e regiões analisadas

Regiões	Grupos					
	Controle	Gel 1 min	Pasta MI 3 min	Gel + Pasta MI	Pasta MI 3h	Pasta MI 8h
1 (2,8 μm)	^A 2,28 \pm 0,15 ^a	^A 2,69 \pm 0,18 ^b	^A 2,46 \pm 0,07 ^b	^{A,B} 2,20 \pm 0,18 ^a	^A 2,10 \pm 0,34 ^a	^A 2,27 \pm 0,14 ^a
2 (11,2 μm)	^B 1,64 \pm 0,07 ^a	^B 2,33 \pm 0,19 ^b	^B 2,05 \pm 0,09 ^c	^A 2,01 \pm 0,27 ^c	^B 1,77 \pm 0,15 ^a	^B 1,86 \pm 0,18 ^a
3 (16,8 μm)	^A 2,11 \pm 0,12 ^a	^B 2,39 \pm 0,15 ^b	^A 2,38 \pm 0,12 ^b	^{A,B} 2,26 \pm 0,17 ^{b,c}	^A 2,11 \pm 0,10 ^{a,c}	^A 2,18 \pm 0,08 ^{a,b}
4 (25,2 μm)	^A 2,15 \pm 0,11 ^a	^B 2,42 \pm 0,16 ^b	^A 2,35 \pm 0,11 ^{b,a}	^B 2,39 \pm 0,14 ^{b,a}	^B 1,70 \pm 0,18 ^c	^B 1,91 \pm 0,21 ^c
5 (42,0 μm)	^A 2,17 \pm 0,15 ^a	^{A,B} 2,51 \pm 0,16 ^b	^A 2,41 \pm 0,04 ^{b,a}	^B 2,45 \pm 0,13 ^b	^C 2,40 \pm 0,06 ^{b,a}	^A 2,37 \pm 0,13 ^{b,a}

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si estatisticamente ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas referem-se à comparação entre as regiões em cada grupo;

Letras minúsculas referem-se à comparação entre os grupos em cada região.

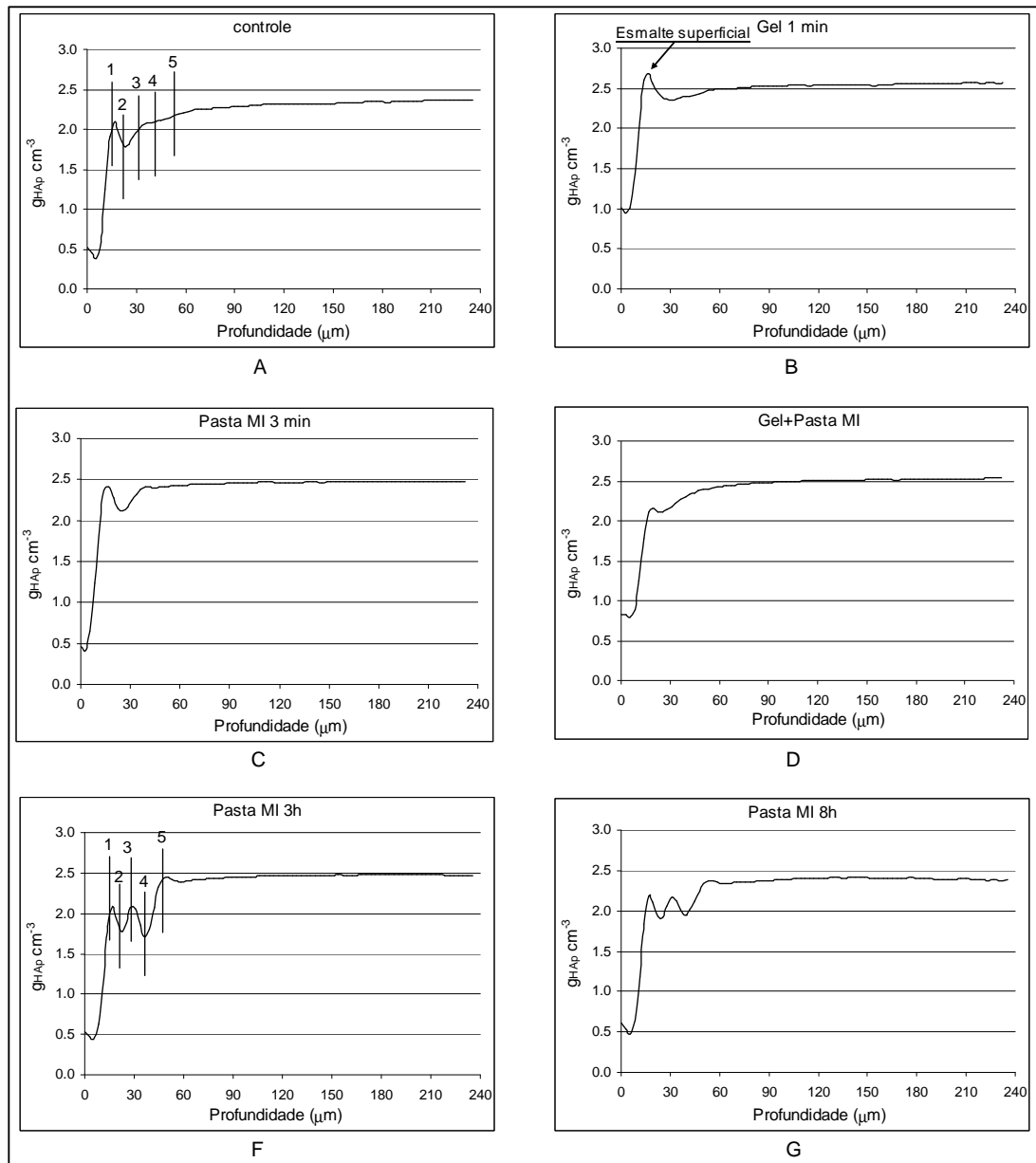


Figura 1 – Gráficos referente ao perfil de lesão de cada grupo, após ciclagem de remineralização, em função da profundidade no esmalte (μm). O esmalte superficial está indicado no Gráfico B e as áreas seleccionadas para comparação da concentração mineral ($g_{HAp} \text{ cm}^{-3}$) entre os grupos estão demarcadas no Gráfico A e F.

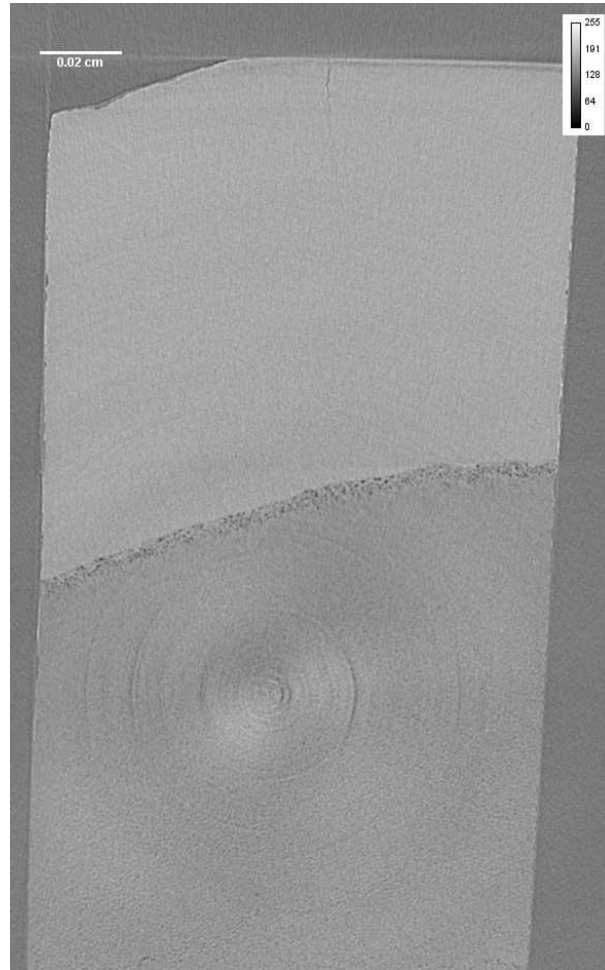


Figura 2- Fotomicrotomografia após análise com luz síncrotron (grupo Placebo).

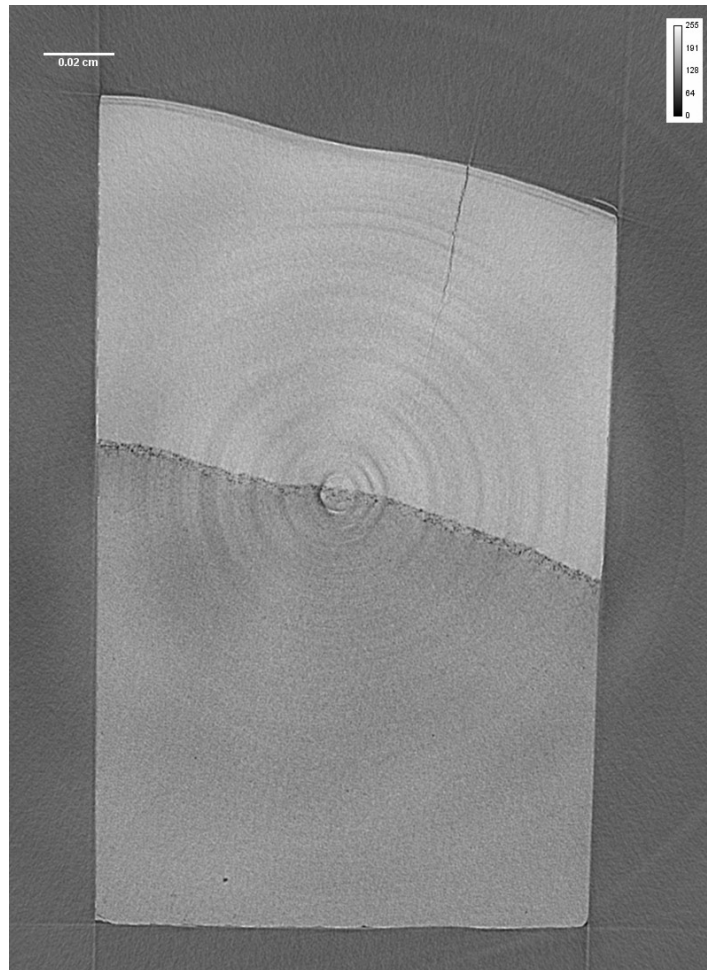


Figura 3 - Fotomicrotomografia após análise com luz síncrotron (grupo Pasta MI 8h).

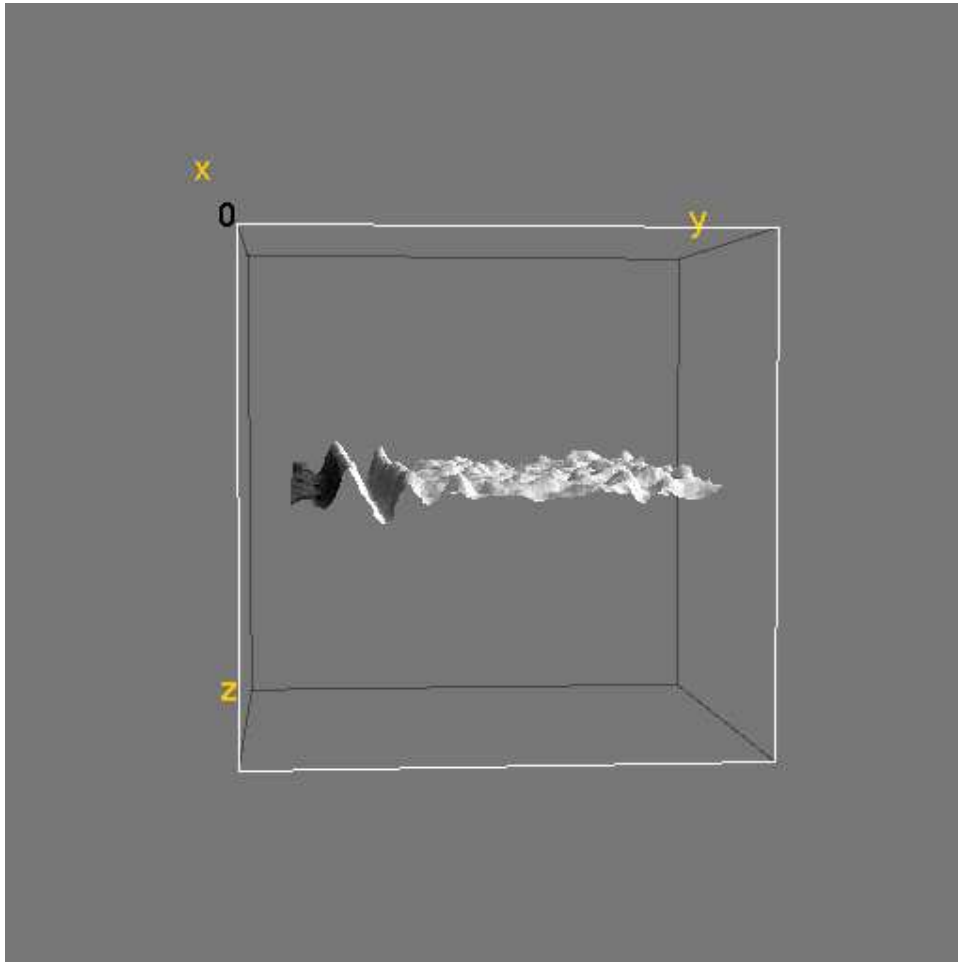


Figura 4 - Fotomicrotomografia 3D após análise com luz síncrotron (grupo Pasta MI 8h).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)