

Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves

EFEITO DO SULFATO FERROSO NA DESMINERALIZAÇÃO E
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE BOVINO -
ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SITU*

ARAÇATUBA – SP

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves

EFEITO DO SULFATO FERROSO NA DESMINERALIZAÇÃO E
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE BOVINO -
ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SITU*

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

Orientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem

ARAÇATUBA – SP

2009

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

A474e Alves, Karina Mirela Ribeiro Pinto
Efeito do sulfato ferroso na desmineralização e remineralização do esmalte bovino: estudos in vitro e in situ / Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves. – Araçatuba: [s.n.], 2009.
116 f. : il. + CD ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009.
Orientador: Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Ferro. 2. Esmalte dentário. 3. Desmineralização dentária. 4. Remineralização dentária. 5. Durapatita. 6. Dureza. I.T.

Black D27
CDD 617.6

Dados Curriculares

Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves

Nascimento	12.03.1977 – Tupã – SP
Filiação	João Pinto Alves Maria Helena Ferreira de Carvalho Ribeiro Pinto Alves
1996/1999	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade do Sagrado Coração – USC
1998/1999	Desenvolvimento de projeto de Iniciação Científica, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
2000/2002	Curso de Especialização em Odontopediatria pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo – HRAC/USP
2004/2005	Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2006/2009	Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

A Deus

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo e guiando os meus passos. Obrigada por me deixar repousar em seus braços e por encher a minha vida com teu cuidado e amor. Agradeço todas as bênçãos concedidas a mim todos esses anos.

À minha família

Aos meus pais, João e Maria Helena, por ensinarem com suas vidas a importância do trabalho árduo, da honestidade e da caridade. Agradeço por me apoiarem nas minhas escolhas e por não medirem esforços para que eu realize meus sonhos. Quisera eu um dia poder retribuir a vocês tudo o que recebi.

Aos meus irmãos, Maria João, João Paulo e Ricardo por se fazerem presentes em minha vida, mesmo que fisicamente distantes.

Aos meus amados sobrinhos, Amanda, Carolina, Gabriela e Guilherme por existirem e tornarem meus dias mais alegres sempre.

Dedico a vocês este trabalho, pois devo a vocês tudo o que tenho e sou. A cada dia que passa percebo que a família é dom de Deus. Sou grata por fazer parte da nossa.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof.Dr Alberto Carlos Botazzo Delbem

Pelo exemplo de dedicação à pesquisa e perseverança. Agradeço pela confiança e, pela orientação a qual possibilitou a elaboração deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade, paciência e apoio durante todos estes anos.

À Profª Drª Kikue Takebayashi Sasaki

Exemplo de persistência e dedicação à pesquisa. Agradeço pela disponibilidade, auxílio, atenção e paciência a mim dispensada em todos os momentos necessários, que não foram poucos.

À Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente de admirável competência e excepcional pesquisadora. Obrigada por me atender todas as vezes que precisei e por manter as portas do seu laboratório sempre abertas para mim. Espero ainda poder aprender mais contigo.

À minha querida Mama Regina Maura (*in memorian*)

Você foi o meu maior presente em Araçatuba. Não tenho palavras para agradecer tanto carinho e cuidado... Além de mãe, conselheira, companheira, você foi minha grande amiga. Obrigada por encher meus dias de sol, de alegria e luz. Agradeço a Deus todos os momentos maravilhosos e alegres que tivemos juntas.

Ao meu amado Luba

Obrigada por ter estado ao meu lado durante toda esta caminhada... Por ser meu ponto de apoio, o aconchego... Agradeço pela paciência, por me ouvir e tentar compreender minhas dificuldades e minha ausência. Sei que não foi fácil, mas conseguimos vencer esta etapa juntos. Obrigada por seu amor e carinho... Saiba que foi fundamental para esta conquista.

Ao meu amigo Juliano

Nada que eu diga será capaz de expressar o quanto eu sou agradecida pela nossa amizade... Somos amigos de verdade, inseparáveis... Obrigada por me dar a certeza de que sempre posso contar com você!

Aos meus queridos amigos,

À Roberta, Michelle, Betiza, Fabiano, Carol, Daniel, Kris, Juliano, Leciana e Cláudia

Apesar de não fazerem parte concreta na elaboração deste trabalho, vocês foram os amigos queridos que me deram forças para continuar. Sempre torcendo por mim e me incentivando, mesmo que à distância. Tantas palavras de carinho, quantas coisas compartilhadas... Obrigada por fazerem parte da minha vida. Conviver com vocês é uma alegria constante.

Aos meus queridos amigos de turma de doutorado: Ana Carolina, Karina Bianco, Karine, Luciana e Marcio, pela amizade e convivência sempre agradável.

Às alunas Karina Simões Franco e Luana Godoy Dalto,

Pela grande ajuda na realização da fase laboratorial deste trabalho. Eu não conseguiria sem vocês!

À Maria dos Santos Ferreira Fernandes,

Sua amizade e colaboração foram essenciais para a conclusão desta pesquisa. Agradeço de coração toda ajuda e carinho.

Aos voluntários desta pesquisa: Ana Carolina, Camila, Daniela, Heitor, Juliano, Karina, Luana, Max Douglas e Rebeca

Sem vocês não seria possível completar mais esta etapa, agradeço muito pela enorme paciência e responsabilidade que vocês tiveram, assim como, a amizade demonstrada, pois sei que não é fácil fazer parte de um estudo "*in situ*". Vocês foram excelentes, que bom poder contar com amigos assim!

“Quero um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão, que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades, às pessoas. Que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim... e que valeu a pena!” (Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa dos professores, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, seu Diretor e Prof^a. Dr^a Ana Maria Pires Soubhia, Vice-Diretora, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado nesta instituição.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria, *Prof. Célio Percinoto, Prof^a Cleide, Prof. Robson, Prof^a Danda, Prof^a Sandra*, pela agradável convivência e pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, coordenador do curso, por seu exemplo de dedicação ao ensino da Odontopediatria. Obrigado pelos momentos valiosos de aprendizado durante as disciplinas teóricas e também durante os atendimentos na Clínica de Bebês.

À Prof^a Dr^a Sandra Maria Herondina Coelho Ávila Aguiar, pela oportunidade ímpar de poder ter participado das atividades teóricas e práticas da Disciplina de Assistência Odontológica Integrada a Pacientes Especiais.

Ao Prof. Dr. João Carlos do Departamento de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, pela ajuda nas análises com o FTIR.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Odontopediatria (Mestrado e Doutorado) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela convivência carinhosa.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, Maria Bertolina Mesquita de Oliveira e Mario Luis da Silva, pelo auxílio indispensável e momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório que sempre me incentivaram, ajudaram e compreenderam o esforço na realização desse trabalho, Adelisa, Ana Elisa, Ana Paula (Goiaba), Eduardo, Eliana Takeshita, Emilene, Jaqueline, Lilian, Luciene, Marcelle, Michele, Marcelo, Tuca, Zé Antônio.

Aos meus queridos amigos Max, Karina e Pedro Ivo. Nossa amizade significa muito para mim. Jamais vou esquecer o carinho com que me acolheram... Nossas conversas descontraídas até altas horas e o delicioso café ficarão guardadas para sempre em meu coração.

À Marina, Valéria e Diogo, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, pela atenção e disponibilidade que nos recebem. Em especial à Ana Claudia pela disponibilidade e revisão deste trabalho.

À Família Bortolan, pelo imenso carinho que sempre dedicaram a mim.

À Família Santagostino, pelo carinho com que me receberam em sua casa e por me ensinarem o valor da família.

À querida Tia Lu, pelo auxílio na revisão ortográfica. Agradeço muito seu carinho e disponibilidade.

Às professoras do Curso de Especialização em Odontopediatria do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC-USP), Dr^a Beatriz Costa, Dr^a Cleide, Dr^a Lucimara e Dr^a Márcia, exemplos de amor e respeito aos pacientes e por serem responsáveis por muito do que sei em Odontopediatria. Obrigada por esta maravilhosa experiência, fundamental na minha formação.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP, em especial a Dr^a Denise Pedrini e Dr. João Eduardo Gomes Filho, pelo exemplo que são e pela convivência sempre agradável.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Doutorado.

A todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão...

“A mente humana que se abre a uma nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Resumo Geral

Alves, KMRP. Efeito do sulfato ferroso na desmineralização e remineralização do esmalte bovino - Estudos *in vitro* e *in situ* [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2009.

RESUMO GERAL

O presente trabalho avaliou o efeito do ferro (Fe) na desmineralização e remineralização de esmalte bovino e pó de hidroxiapatita sintetizada, em estudos *in vitro* e *in situ*. Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de Fe (0,33; 0,840; 18,0 e 70,0 µg Fe/mL), na forma de sulfato ferroso, em 3 capítulos distintos: na desmineralização e remineralização do esmalte bovino, usando modelos de ciclagem de pH (capítulo 1); na remineralização de lesões de cárie artificial em esmalte bovino *in situ* (capítulo 2); e na ciclagem de pH utilizando hidroxiapatita sintetizada (capítulo 3). No primeiro e segundo capítulos, blocos de esmalte tratados com Fe foram avaliados por meio de análise da microdureza de superfície e longitudinal. As análises de F, Ca, P e Fe presentes no esmalte foram determinadas após desmineralização (*in vitro*) e remineralização (*in vitro* e *in situ*). No terceiro capítulo, a análise da hidroxiapatita tratada com soluções de Fe e F foi realizada por meio de espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier, além de análises de F, Ca, P e Fe nas soluções de ciclagem de pH. Houve redução da desmineralização do esmalte quando este foi tratado com 18,0 µg Fe/mL ($p < 0,05$); embora, o grupo controle tenha apresentado maior recuperação da dureza na lesão de cárie quando comparado aos grupos tratados com Fe ($p < 0,05$) *in vitro*. No estudo *in situ*, nenhuma concentração de Fe promoveu remineralização da lesão de cárie quando comparada ao grupo controle ($p < 0,05$). Um aumento nas concentrações de Fe no esmalte foi observado quando maiores concentrações (18,0 e 70,0 µg Fe/mL) foram utilizadas *in vitro* e *in situ* ($p < 0,05$). A taxa Ca/P diminuiu com a presença do Fe na hidroxiapatita ($p < 0,05$) e um aumento do carbonato foi observado na presença das diferentes concentrações de Fe ($p < 0,05$). Concluiu-se que o tratamento com solução de 18,0 µg Fe/mL reduziu a desmineralização do esmalte *in vitro*, porém nenhuma concentração de Fe foi capaz de promover a remineralização das lesões de cárie *in vitro* e *in situ*. Os resultados desfavoráveis obtidos quando soluções com

sulfato ferroso são utilizadas podem estar associados a alterações da cristalinidade da hidroxiapatita, devido à substituição do fosfato por carbonato, aumentando a solubilidade do esmalte.

Palavras-chave: Ferro. Desmineralização. Remineralização. Dureza. Hidroxiapatita.

General Abstract

Alves KMRP. Effect of iron on bovine enamel demineralization and remineralization - *In vitro* and *in situ* studies [thesis]. Araçatuba: São Paulo State University; 2009.

GENERAL ABSTRACT

The present study evaluated the effect of iron (Fe) on enamel demineralization and remineralization of bovine enamel and synthesized hydroxiapatite, using *in vitro* e *in situ* models. Different concentrations of Fe, as ferrous sulphate (0.33; 0.840; 18.0 and 70.0 µg Fe/mL) were evaluated in 3 distinct chapters: in bovine enamel demineralization and remineralization, using pH-cycling models (chapter 1); in remineralization of artificial caries lesions on bovine enamel *in situ* (chapter 2); and in pH cycling using synthesized hydroxiapatite (chapter 3). In the first and second chapters, enamel blocks treated with Fe were evaluated by superficial and longitudinal microhardness. The concentrations of F, Ca, P and Fe present in enamel were also determined after demineralization (*in vitro*) and remineralization (*in vitro* and *in situ*). In the third chapter, the analysis of hydroxyapatite treated with solutions of Fe and F were performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, in addition to the analysis of F, Ca, P and Fe in pH cycling solutions. A reduction on enamel demineralization was observed after treatment with 18.0 µg Fe/mL ($p < 0.05$), although the control group presented the greatest recovery of the hardness of caries lesions when compared to groups treated with Fe *in vitro* ($p < 0.05$). In the *in situ* study, none of the concentrations evaluated promoted remineralization of caries lesions when compared to the control group ($p < 0.05$). Increases in Fe concentrations in enamel were observed when higher concentrations (18.0 and 70.0 µg Fe/mL) were used *in vitro* and *in situ* ($p < 0.05$). The Ca/P rate decreased in the presence of Fe in hydroxyapatite ($p < 0.05$) and an increase of carbonate was observed in the presence of different concentrations of Fe ($p < 0.05$). It was concluded that treatment with a Fe-containing solution at a concentration of 18.0 µg Fe/mL reduced enamel demineralization *in vitro*, but no concentration of Fe was able to promote the remineralization of caries lesions *in vitro* and *in situ*. The unfavorable results obtained when Fe-containing solutions were used seem to be associated to changes in

crystallinity of hydroxyapatite, due to the replacement of phosphate by carbonate, which increased enamel solubility.

Keywords: Iron. Demineralization. Remineralization. Hardness. Hydroxyapatite.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 Values (mean \pm EP; $n=10$) of the surface hardness before (SH) and after (SH₂) (A), integrated subsurface hardness (Δ KHN) (B), calcium, phosphorus (C), fluoride and iron (D) in enamel after the demineralization pH-cycling. Means followed by distinct lower case letters show significant difference in each variable. (Kruskall Wallis, $p<0.05$; $n=10$). 43
- Figura 2 Values (mean \pm EP; $n=10$) of the post caries surface hardness (SH₁) and SH₂ (A), integrated subsurface hardness (Δ KHN) (B), calcium, phosphorus, (C), fluoride and iron (D) in enamel after the remineralization pH-cycling. Means followed by distinct lower case letters show significant difference in each variable. (Kruskall Wallis, $p<0.05$; $n=10$). 44

Capítulo 3

- Figura 1 Representação gráfica do espectro obtido após análise por meio de espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier de acordo com os grupos após ciclagem de pH. A: HAdesm. B: F 1100. C: Fe 0,84. D: Fe 18. E: Fe 70. 86

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1 Valores (média±DP, $n=10$) de dureza inicial (SH), dureza pós-desmineralização (SH₁), dureza pós-tratamento (SH₂), porcentagem de perda mineral (%SH) e dureza integrada de subsuperfície (Δ KHN) no grupo controle (água) e nos grupos de tratamento (soluções contendo 0,84, 18,0 e 70,0 μ g Fe/mL) 67
- Tabela 2 Concentrações (média±DP, $n=10$) de F, Fe, Ca e P no esmalte dentário após tratamento com soluções contendo 0, 0,84, 18,0 e 70,0 μ g Fe/mL 67

Capítulo 3

- Tabela 1 Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais dos fosfatos e hidroxila em relação à hidroxiapatita submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HAdesm) 87
- Tabela 2 Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais de carbonatos e H₂O em relação à hidroxiapatita submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HAdesm) 87
- Tabela 3 Valores médios (\pm dp, $n=5$) das concentrações (mg/g) de fluoreto, ferro, cálcio e fósforo e proporção molar (Ca/P) de acordo com os grupos 88

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
°C	Graus celcius
μ	Micro
μm	Micrometro
μg F/g	Microgramas de flúor por grama
μg Fe/mL	Microgramas de ferro por mililitro
μg/cm ²	Micrograma por centímetro quadrado
Ca	Elemento cálcio
Ca ⁺²	Íon cálcio
CaF ₂	Fluoreto de cálcio
cm	Centímetro
DP	Desvio padrão
EP	Erro padrão
<i>et al.</i>	E colaboradores
F	Flúor
F ⁻	Íon flúor
Fe	Ferro
Fe ²⁺	Íon Fero II
Fe ³⁺	Íon Fero III
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso
FTIR	Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier
<i>g</i>	Gravidade
g	grama
HA	Hidroxiapatita
HA _{sintética}	Hidroxiapatita sintética
HA _{desm}	Hidroxiapatita submetida à ciclagem de pH sem tratamento
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
ISA	Ionic strength adjustor (Ajustador de força iônica)
KHN	Knoop hardness number (número de dureza knoop)
mg/g	Miligrama por grama

mL	Mililitros
mL/mm ²	Mililitros por milímetro quadrado
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros quadrados
mol L ⁻¹	Molaridade
NaF	Fluoreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OH	Hidroxila
P	Fósforo
PO ₄ ³⁻	Íon fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
r	Correlação
s	Segundos
%SH	Porcentagem de recuperação de dureza de superfície
SH	Dureza de superfície inicial
SH ₁	Dureza de superfície pós cárie ou pós desmineralização
SH ₂	Dureza de superfície pós ciclagem ou final
ΔKHN	Dureza integrada de subsuperfície
Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	Nitrato de cálcio
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Fosfato de amônio dibásico
HNO ₃	Ácido nítrico
TISAB	Total Ionic Strength Adjustment Buffer (Tampão ajustador de força iônica)
v ₁	Estiramento simétrico
v ₂	Vibração angular
v ₃	Estiramento assimétrico
v ₄	Vibração angular
>	maior
<	Menor
±	Mais ou menos
=	Igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	22
2 CAPÍTULO 1	26
2.1 Abstract	28
2.2 Introduction	29
2.3 Material and Methods	30
2.4 Results	34
2.5 Discussion	35
2.6 Acknowledgments	38
2.7 References	39
2.8 Figures	43
3 CAPÍTULO 2	45
3.1 Resumo	47
3.2 Abstract	48
3.3 Introdução	49
3.4 Material e Métodos	50
3.5 Resultados	56
3.6 Discussão	57
3.7 Agradecimentos	61
3.8 Referências	62
3.9 Tabelas	67
4 CAPÍTULO 3	68
4.1 Resumo	70
4.2 Abstract	71
4.3 Introdução	72
4.4 Material e Métodos	73
4.5 Resultados	76
4.6 Discussão	78
4.7 Agradecimentos	81
4.8 Referências	82
4.9 Figuras e Tabelas	86
ANEXOS	89

1 Introdução Geral

1 Introdução Geral *

O uso clínico do flúor (F) é um método seguro e efetivo utilizado no controle da cárie dentária, tanto em programas de alcance coletivo como em nível individual. Seu uso, principalmente na forma de dentifrícios e água fluoretada, tem contribuído para a redução da prevalência de cárie dentária nas últimas décadas em países desenvolvidos e em desenvolvimento [Browne, Whelton, O'Mullane, 2005]. Embora o F possa ser administrado por meio de veículos de aplicação tópica e sistêmica, é consenso na literatura que o efeito cariostático do F ocorre pela ação tópica, reduzindo a desmineralização e promovendo a remineralização do esmalte [ten Cate *et al.*, 2004]. Entretanto, os produtos fluoretados têm sido considerados como um fator de risco para o aumento da prevalência da fluorose dentária [Mascarenhas, 2000], o que tem levado à procura de medidas eficazes no controle da cárie dentária, ao mesmo tempo em que minimizam a ingestão de flúor por crianças de tenra idade. Estas medidas incluem redução da quantidade de dentifrício durante a escovação, o uso de dentifrícios com concentração reduzida de flúor, dentifrícios com pH acidulado e dentifrícios suplementados com cálcio ou fosfato [Bergamaschi 2003, Brighenti *et al.*, 2006, Alves *et al.*, 2007, Vilhenha *et al.*, 2008, Takeshita *et al.*, 2009].

Neste sentido, atenção especial tem sido dada aos efeitos do ferro (Fe), o qual tem demonstrado propriedades cariostáticas em estudos *in vitro* [Torell, 1988; Devulapalle & Mooser, 2001; Brookes *et al.*, 2003] e *in situ* [Pecharki *et al.*, 2005; Martinhon *et al.* 2006; Buzalaf *et al.* 2006; Sales-Peres *et al.* 2006], os quais incluem efeitos na colonização bacteriana e redução da dissolução do esmalte. Em acréscimo

* As referências bibliográficas estão no anexo A.

acréscimo, estudos conduzidos em humanos e animais têm demonstrado que os íons ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}), sozinhos ou em combinação com outros íons (flúor e cobre) apresentam efeito significativo na redução do potencial cariogênico do açúcar [Opperman e Rolla, 1980; Rosalen *et al.*, 1996; Miguel *et al.*, 1997].

O efeito do Fe, na forma de sulfato ferroso, no tratamento e prevenção da anemia já é comprovado clinicamente [Lynch SR, 2005]. Considerando que a cárie dentária e a anemia continuam a ser um dos mais prevalentes problemas de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento [Bowen,1995], a confirmação da efetividade do Fe na dinâmica da cárie dentária seria importante na resolução destes dois problemas de saúde pública. Entretanto, o mecanismo de ação do ferro ainda não está claro. Uma possível explicação seria a formação de uma fina camada ácido-resistente na superfície do esmalte [Torell, 1988]. Outros estudos também sugerem a participação do Fe na remineralização do esmalte humano e na nucleação da apatita [Bachra 1970, Rao 1974], substituição do cálcio na apatita [Rao1974, Osaki 1985], aumento da concentração de Fe em cáries remineralizadas em dentina e esmalte [Takuma 1975, Driessens 1986] e inibição da desmineralização [Bachra,1970]. Embora os efeitos do Fe na redução da desmineralização do esmalte tenham sido demonstrados por um número expressivo de estudos, existem poucos trabalhos sobre o efeito do ferro na remineralização do esmalte, e nenhum deles descreve a utilização de soluções de sulfato ferroso como tratamento da lesão de cárie.

Com base no exposto acima, seria interessante avaliar o efeito do íon Fe na desmineralização e remineralização do esmalte, utilizando modelos de ciclagem de pH, o que poderia trazer informações importantes quanto à determinação da concentração ideal a ser utilizada para se assegurar um efeito clinicamente

relevante. Em acréscimo, a avaliação da remineralização de lesões de cárie de esmalte tratadas com Fe *in situ* poderia trazer informações adicionais na elucidação do mecanismo de ação do Fe, uma vez que a ação da saliva permite que as condições sejam mais próximas das reais. A ação do Fe sozinho ou associado com açúcar na desmineralização *in situ* já foi previamente avaliada por Martinhon *et al.*(2006) e Pecharki *et al.*(2005), respectivamente. Porém, este tipo de estudo não foi realizado analisando seu efeito na remineralização. Finalmente, a avaliação do efeito das diferentes concentrações de Fe na hidroxiapatita poderia trazer informações úteis sobre as trocas iônicas que ocorrem no cristal e, conseqüentemente, ajudar a compreender o papel destes íons na dinâmica da desmineralização e remineralização do esmalte dentário após o uso de soluções com Fe.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de Fe na forma de sulfato ferroso na desmineralização e remineralização em estudos *in vitro* e *in situ*, utilizando dentes bovinos e pó de hidroxiapatita sintetizada. Para abordar o tema proposto, o estudo será apresentado em três capítulos distintos, conforme descrito abaixo:

- Capítulo 1: **“Iron effect on enamel demineralization and remineralization *in vitro*”** (artigo aceito pelo periódico Archives of Oral Biology^{**});
- Capítulo 2: **“Efeito do ferro na remineralização do esmalte *in situ*”** (artigo preparado para submissão ao periódico Journal of Dentistry^{***}).
- Capítulo 3: **“Efeito do ferro na dissolução da hidroxiapatita *in vitro*”**. (artigo preparado para submissão ao periódico Archives of Oral Biology^{**}).

^{**} Normas da revista Archives of Oral Biology estão no anexo B

^{***} Normas da revista Journal of Dentistry estão no anexo C

2 Capítulo 1

Iron effect on enamel demineralization and remineralization *in vitro*

Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves¹

Karina Simões Franco¹

Kikue Takebayashi Sasaki²

Marília Afonso Rabelo Buzalaf³

Alberto Carlos Botazzo Delbem^{1*}

¹Department of Pediatric Dentistry, Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP 16015-050, Brazil

²Department of Basic Sciences (Biochemistry), Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP 16015-050, Brazil

³Department of Biological Sciences (Biochemistry), Bauru Dental School, University of São Paulo, Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-77 Bauru, SP 17012-901, Brazil

Running title: Effect of iron on bovine enamel

Key words: Iron. Enamel. Demineralization. Remineralization. Hardness.

Corresponding author:

Alberto Carlos Botazzo Delbem

São Paulo State University - UNESP

R: José Bonifácio 1193

Araçatuba - SP - Brazil

CEP 16015-050

Fax: (55) (18) 3636 3235

Email: adelbem@foa.unesp.br

* De acordo com as normas da revista Archives of Oral Biology (Anexo B)

2.1 Abstract

Objective: To evaluate the effect of ferrous sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) on enamel demineralization and remineralization, using pH-cycling models. *Design:* Enamel blocks had their surfaces polished, allowing their selection by determination of initial surface hardness (SH, $n=100$). Fifty blocks were submitted to a demineralization pH-cycling (DE) during 5 days. Caries lesions were produced, post caries SH were determined (SH_1 , $n=50$) and the blocks were then submitted to a remineralization pH-cycling (RE) during 6 days. Treatments were performed twice a day with different concentrations of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solutions (0.333; 0.840; 18.0 and 70.0 $\mu\text{g Fe/mL}$), besides a control group (deionized water). Final SH was determined (SH_2) and the lesion integrated area (ΔKHN) was calculated. Analysis of fluoride (F), calcium (Ca), phosphorus (P) and iron (Fe) present in enamel ($\mu\text{g/cm}^2$) were measured after acid biopsy. Data distribution were heterogeneous and were analyzed using Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). *Results:* In DE pH-cycling, the group treated with 18.0 $\mu\text{g Fe/mL}$ presented greater values of SH_2 and lower ΔKHN ($p < 0,05$) when compared to the other groups. In RE pH-cycling, control group showed the lowest value of ΔKHN ($p < 0.05$). A decline in Ca and P concentration was observed with the increase of Fe concentration ($p < 0.05$). There was no significant difference on F concentration in enamel when Fe concentration increased ($p > 0.05$), and an increase of Fe in enamel was observed in higher concentrations ($p < 0.05$), regardless of the experiment (DE and RE). *Conclusion:* The results suggest that iron reduces hardness loss, but interferes in the remineralization process, not allowing it to occur.

Keywords: Iron; Enamel; Demineralization; Remineralization; Hardness

2.2 Introduction

Many studies have suggested that iron (Fe) has cariostatic properties. Studies conducted in desalivated rats have shown that Fe added to sucrose, alone or in combination with other ions (like fluoride and copper), has a positive effect on the reduction of cariogenic potential of sucrose.¹⁻⁴ Therefore, it has been suggested that sucrose supplementation with Fe could have an impact on two health problems, dental caries and anemia.⁵ In addition, Fe added to foods and beverages has been regarded as a possible alternative to reduce dental erosion.⁶ Kato et al.⁷ have shown an protective effect of iron in relation to enamel powder dissolution when ferrous sulphate is added to a carbonated beverage; the type of acid in these beverages seems to modulate this effect.

Several studies have shown the influence of Fe on dental biofilm. Devulapalle and Mooser⁸ demonstrated that 6 mmol L⁻¹ of ferrous sulphate topically applied could completely inactivate glycosyltransferase activity *in vitro*. An *in situ* study⁹ has also shown that sucrose containing iron could reduce streptococcus mutans on dental biofilm. However, Martinhon et al.¹⁰ did not verify any reduction on the formation of alkali-soluble polysaccharides on dental biofilm when 15 mmol L⁻¹ of ferrous sulphate was applied, although a reduction on mineral loss was observed. In addition, Buzalaf et al.¹¹ showed that 15 mmol L⁻¹ of ferrous sulphate could be effective on inhibition enamel dissolution *in vitro*. Sales-Peres, Pessan, Buzalaf¹² evaluated the effect of a mouthrinse with 10 mmol L⁻¹ ferrous sulphate solution on human enamel and dentin submitted to erosion followed by toothbrushing and observed a significant reduction on the %SMH in enamel and on dentin wear.

Despite a clear effect of Fe on caries process has been demonstrated by the above-mentioned studies, the mechanism of action of Fe remains unclear. Possible explanations include the decrease on acidogenicity of dental plaque¹³; the effect on bacterial colonization on enamel surface, as well as on sugar metabolism on dental biofilm¹⁴; the formation of a thin acid-resistant coating on enamel surface, reducing the enamel dissolution.¹⁵ Other possibilities have been suggested, which include Fe participation on remineralization of the human enamel and the apatite nucleation¹⁶⁻¹⁷, substitution of calcium in apatite¹⁸, increased concentration in remineralized caries lesion on dentin and enamel¹⁹⁻²⁰ and inhibition of demineralization.¹⁶

Different concentrations of ferrous sulphate have been used in several studies on the effect of Fe on demineralization of dental enamel, but only few studies have been conducted about the effect of this ion on remineralization. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of ferrous sulphate on sound enamel demineralization and on the remineralization of artificial caries on enamel, using a pH-cycling model.

2.3 Material and Methods

2.3.1 Experimental study design

Enamel blocks (4 × 4 mm, $n=100$), obtained from bovine incisors and previously stored in 2% formaldehyde solution (pH 7.0)²¹ (Anexo D), had their enamel surfaces sequentially polished (Anexo E), allowing selection of blocks by surface hardness (SH, $n=100$), (Anexo G). Half of the blocks was submitted to a demineralization pH-cycling (DE, $n=50$) during 5 days. Caries lesions were produced on the other half of enamel blocks, in acetate buffer, pH 5.0²², post caries SH were

determined (SH₁, n=50), and enamel blocks were then submitted to a remineralization pH-cycling (RE, n=50) during 6 days. The treatments were performed with different concentrations of FeSO₄.7H₂O solutions, 0.333; 0.840; 18.0 and 70.0 µg Fe/mL⁹ and a control group (deionized water), during 1 min, twice a day (after de and remineralizing cycles). After pH-cycling, surface hardness (SH₂) and cross-sectional microhardness were evaluated (Anexo H), and integrated subsurface hardness (ΔKHN) was calculated. The amount of fluoride, calcium, phosphorus and iron ions present in enamel were also evaluated (µg /cm²) (Anexo I).

2.3.2 Artificial caries lesion induction

Caries lesions were produced on the selected enamel blocks by the immersion on solution with 1.3 mmol L⁻¹ Ca, 0.78 mmol L⁻¹ P in 0.05 mol L⁻¹ acetate buffer, pH 5.0; 0.03 ppm F (32 mL/block), in a period of 16 hours, at 37° C.²² After treatment, blocks were submitted to post caries hardness test (SH₁).

2.3.3 pH-Cycling (De>Re)

Blocks were submitted individually to a pH-cycling system during five days, 37° C.²¹ The blocks were immersed in demineralizing solutions (2.0 mmol L⁻¹ Ca and P in 0.075 mol L⁻¹ acetate buffer, 0.04 ppm F in pH 4.7 – 2.2 mL/mm²) for 6 hours, and in remineralizing solutions (1.5 mmol L⁻¹ Ca, 0.9 mmol L⁻¹ P, 0.15 mol L⁻¹ KCl in 0.02 mol/L cacodylate buffer, 0.05 ppm F in pH 7.0 – 1.1 mL/ mm²) for 18 hours. The treatments were performed twice a day during 1 minute under agitation (Anexo F).

2.3.4 pH-Cycling (Re>De)

Blocks with artificial caries lesions were submitted to a pH-cycling system during six days²¹, immersed on remineralizing solution (1.5 mmol L⁻¹ Ca, 0.9 mmol L⁻¹ P, 0.15 mol L⁻¹ KCl in 0.02 mol/L cacodylate buffer, 0.04 ppm F, pH 7.0; 4 mL for each block), 37°C, which was changed twice a day. The cariogenic challenge was performed by immersing the blocks in a demineralizing solution (2.0 mmol L⁻¹ Ca and P in 0.075 mol L⁻¹ acetate buffer, 0.03 ppm F, pH 4.7; 12 mL for each block) during two hours. The treatments were performed twice a day during 1 minute under agitation (Anexo F).

2.3.5 Analysis of enamel hardness

Microhardness on enamel surface and in longitudinal section was determined using a Shimadzu HMV-2000 microhardness tester (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), with a load of 25 grams for 10 seconds (Anexo G e H).^{21,23} Five impressions were taken in the central region of the block, separated 100 µm from each other (SH). Post caries SH₁ was also measured. After pH-cycling, surface hardness was again measured (SH₂), 100 µm from the initial ones (SH).²¹ For the cross-sectional microhardness analysis, enamel blocks were split in halves, which were included in acrylic resin and sequentially polished (Anexo H). Three sequences of eight impressions were made at 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 and 330 µm from the enamel external surface, with a 100 µm distance from each other. The mean values at all three measuring points at each distance from the surface were then averaged. Integrated hardness (KHN x µm) for the lesion into sound enamel was calculated by trapezoidal rule (GraphPad Prism, version 3.02) and subtracted from integrated

hardness for sound enamel, to obtain the integrated subsurface hardness (Δ KHN), according to Takeshita et al. (2009).²⁴

2.3.6 Analysis of fluoride, calcium, phosphorus and iron present in enamel

After de and remineralizing pH cycling ($n=100$), the amount of iron, fluoride, calcium and phosphorus in enamel blocks was determined after acid biopsy¹⁰. One enamel layer ($\sim 50 \mu\text{m}$) was removed by the immersion of each half of block ($n=100$) in 0.5 mL HCl 0.5 mol L⁻¹ during 45 seconds, under agitation, and subsequently neutralized by 0.5 mL NaOH 0.5mol L⁻¹ (Anexo I). For analysis of F and Ca, specific electrodes Orion 9609 and Orion 9300 were used, respectively, adapted to an ion analyser (Orion 720A⁺). TISAB II (“total ionic strength adjustment buffer”, Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) and ISA (“ionic strength adjustor”, Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) were added to the F (1:1) and Ca (1:50) samples for determination of fluoride and calcium amounts, respectively. The results were expressed in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Iron analyses were determined by colorimetric method (Laborlab Kit). Phosphorus dosing was realized by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow.²⁵

2.3.7 Statistical analysis

The values for SH, SH₁, SH₂ and Δ KHN, and F, Fe, Ca and P present in the enamel were heterogeneous and therefore submitted to Kruskal-Wallis test. Data were submitted to analysis of Pearson’s correlations. For the statistical analysis, GraphPad Prism (version 3.02) was used, at a significance level of 5%.²⁶

2.4 Results

Figure 1 shows the values of surface hardness before (SH) and after (SH₂) the demineralization pH-cycling, as well as the integrated subsurface hardness (Δ KHN) and the concentrations of calcium, phosphorus, fluoride and iron in enamel after the demineralization pH-cycling. The SH values were similar in all groups ($p > 0.05$). The enamel treatment with the lowest concentration of Fe resulted in SH₂ (Figure 1-A) e Δ KHN (Figure 1-B) similar to the control group ($p > 0.05$). However, the treatment with 18.0 μ g Fe/mL showed higher values of SH₂ and lower Δ KHN. Ca and P concentrations in enamel varied following a similar trend (Pearson's correlation: $r = 0.419$; $p = 0.002$), showing a tendency to increase directly related to Fe concentrations in the solutions, except for the highest concentration (Figure 1-C). The 18.0 and 70.0 μ g Fe/mL groups presented higher amounts of Fe (Figure 1-D) on enamel when compared to the other groups ($p < 0.05$). A significant correlation was observed between Fe concentration in enamel and SH ($r = 0.681$, $p < 0.001$) and Δ KHN ($r = -0.727$; $p < 0.001$). With respect to F on enamel, no difference was observed among the groups ($p > 0.05$) regardless Fe concentration in the solutions.

Figure 2 shows the effect of iron on post caries surface hardness (SH₁) and SH₂ (Figure 2-A), Δ KHN (Figure 2-B), as well as the concentrations of calcium and phosphorus (C), and fluoride and iron (D) in enamel after the remineralization pH-cycling. The control group showed the highest value of SH₂ ($p < 0.05$), with no significant differences among Fe concentrations ($p > 0.05$) (Figure 2-A). The values of SH₁ were similar regardless of group ($p > 0.05$). The control group had the lowest

value of Δ KHN, while higher values were observed among the groups with higher concentrations of Fe (Figure 2-B).

The calcium concentrations on enamel were higher in the groups treated with 0.33 and 18.0 μ g Fe/ mL solutions, but were similar to the control group in the groups treated with other Fe concentrations. (Figure 2-C). A decrease in phosphorus concentrations (Figure 2-C) and an increase Fe concentrations (Figure 2-D) in enamel were observed from the 0.84 μ g Fe/mL concentration. For F, a significant decrease was observed between the groups treated with 0.33 and 18.0 μ g Fe/mL ($p < 0.05$) (Figure 2-D). There was a significant correlation between Fe concentration in enamel and SH_2 ($r = -0.353$, $p = 0.012$) and Δ KHN ($r = -0.635$; $p < 0.001$), as well as between P in enamel and SH_2 ($r = 0.455$, $p = 0.001$), Δ KHN ($r = 0.501$; $p < 0.001$) and Fe in enamel ($r = -0.425$, $p = 0.002$).

2.5 Discussion

The effect of Fe on enamel de- and remineralization processes is not well established. Several *in situ* studies have shown that ferrous sulphate reduces the demineralization of bovine dental enamel submitted to a high cariogenic challenge.⁹⁻¹² Although the same effect was observed in the present study (De>Re), Fe was not able to promote the remineralization of artificial carious lesions according to the protocol used in this study.

In the demineralizing pH-cycling (De>Re), highest values of surface hardness (SH_2) and lowest values of integrated subsurface hardness (Δ KHN) found (Figures 1-A and 1-B) could be related to the formation of an acid-resistant coating of hydrous iron oxide on enamel surface when this is treated with iron salts and subsequent

ferric phosphate precipitation.¹⁵ This coating formation has also been suggested by recent *in situ* studies, which presented either high cariogenic⁹⁻¹⁰ or erosive/abrasive^{7,12,27} challenges, in order to explain their results. Although the protocol followed in this study did not allow the determination of the compound formed on enamel surface, Figure 1 shows that, among the ions determined in enamel, Fe presented both a higher incorporation in enamel directly related to its concentration in the treatment solutions, and a correlation with SH₂ and ΔKHN. Regardless of the compound formed with Fe that would be deposited on enamel surface, Fe showed a potential for reducing demineralization, mainly in the 18.0 and 70.0 µg Fe/mL groups.

When the demineralized enamel blocks were treated with Fe solutions, a reduced capacity in activating enamel remineralization (Re>De) was observed, mainly with 18.0 and 70.0 µg/mL concentrations. These groups exhibited higher concentrations of Fe in enamel (Figure 2-D), which were very similar to those observed after the demineralizing cycling (Figure 1-D). However, a negative correlation between the Fe concentrations in enamel and SH₂ and ΔKHN was observed. The Fe compound probably formed on enamel might have reduced the capacity of the artificial saliva in promoting the remineralization, according to the mechanism proposed by Torell.¹⁵ In the presence of Fe, the substitution of phosphate groups by carbonate groups²⁸ and a reduction of apatite particles growth²⁸⁻³⁰ would also occur, which would lead to an alteration of the structural-mechanical properties of hydroxyapatite. The results of the present study showed a reduction in the P concentration inversely related to Fe concentrations in enamel. These two elements were also correlated to lower surface hardness values (SH₂) and higher subsurface

demineralization areas (Δ KHN), which confirms the negative influence of Fe on enamel remineralization.

It is noteworthy that the highest Fe concentration tested (70.0 μ g Fe/mL) did not increase the concentration of this ion in enamel, but instead promoted the worst results when compared to the 18.0 μ g Fe/mL solution, for the enamel demineralizing protocol. Sutter et al.³¹ observed that hydroxyapatite precipitation in the presence of Fe resulted in a Ca-deficient apatite, because Fe occupied the Ca sites. The substitution of phosphate groups by carbonate groups has also been promoted in the presence of Fe.²⁸ In the present study, a lower concentration of Ca and P in the enamel was found after treatment with the 70.0 μ g Fe/mL solution. This would explain the lowest hardness values (SH_2) and the highest Δ KHN, since the above data related to a low crystallinity apatite when comparing to the 18.0 μ g Fe/mL solution.

The effect of Fe in reducing enamel demineralization has already been demonstrated and confirmed by *in situ* studies.^{9,10,12} However, as the present study demonstrated that Fe inhibited enamel remineralization, it would be important to investigate such phenomenon *in situ*, before Fe-containing products can be recommended for caries control. In summary, our results showed that while the 18.0 μ g Fe/mL concentration showed the highest effect on enamel demineralization, solutions containing iron, regardless the concentration, were not able to promote the remineralization of artificial caries lesions. Due to the reduced number of investigations on this topic, further studies are still necessary in order to provide additional information on the mechanism of action of Fe, alone or in combination with other ions.

Acknowledgement

The authors thank CNPq- National Council of Technological and Scientific Development (Process nº 477349/2004-8) for the financial support and CAPES- Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education for the PhD scholarship.

2.6 References

1. Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Arch Oral Biol* 1996;**41**:1003-10.
2. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. *Caries Res* 1997;**31**:238-43.
3. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated and intact rats. *Caries Res* 1997;**31**:244-8.
4. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Arch Oral Biol* 1997;**42**:377-83.
5. DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anaemia in the world. *World Health Stat Q* 1985;**38**:302-16.
6. Kato MT, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:1109-11.
7. Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder in vitro by carbonated beverages. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:614-7.
8. Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res* 2001;**80**:466-9.
9. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Res* 2005;**39**:123-9.

10. Martinhon CCR, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MFTB, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed "in situ". *Arch Oral Biol* 2006;**51**:471-5.
11. Buzalaf MAR, De Moraes Italiani F, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhaes AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2006;**51**:844-8.
12. Sales-Peres SHC, Pessan JP, Buzalaf MAR. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:128-32.
13. Oppermann RV, Rölla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *Caries Res* 1980;**14**:422-7.
14. Dunning JC, Ma Y, Marquis RE. Anaerobic killing of oral streptococci by reduced, transition metal cations. *Appl Environ Microbiol* 1998;**64**:27-33.
15. Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J* 1988;**12**:113-24.
16. Bachra BN, Van Harskamp GA. The effect of polyvalent ions on the stability of a buffer system for calcification in vitro. *Calcif Tissue Res* 1970;**4**:359-65.
17. Rao SVC. Preparation of solid solutions of calcium and iron hydroxylapatites. *J Inst Chem Calcutta* 1974;**46**:30-1.
18. Okasaki M, Takahashi J, Kimura H. Iron uptake of hydroxyapatite. *J Osaka Univ Dent Sch* 1985;**25**:17-24.
19. Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Res* 1975;**9**:278-85.

20. Driessens FC, Theuns HM, Heijligers HJ, Borggreven JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. *Caries Res* 1986;**20**:398-405.
21. Vieira AE, Delbem AC, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res* 2005;**39**:514-20.
22. Queiroz CS, Hara AT, Leme FP, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J*. 2008;**19**:21-7.
23. Argenta RM, Tabchoury CP, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization . *Pesqui Odontol Bras* 2003;**17**:241-6.
24. Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem ACB: *In vitro* Evaluation of Dentifrice with Low Fluoride Content Supplemented with Trimetaphosphate. *Caries Res* 2009;**43**:50-56.
25. Fiske CH, Subarrow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925; **66**:375-400.
26. Campos, GM: GMC 2002 [computer program]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia; 2003. Available from: URL:<http://www.forp.usp.br/restauradora/gmv/gmc.html#gmc>.
27. Kato MT, Maria AG, Vaz LG, Italiani FM, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron supplementation on the erosive potential of carbonated or decarbonated beverage. *J Appl Oral Sci* 2007;**15**:61-4.
28. Guggenbuhl P, Filmon R, Mabileau G, Baslé MF, Chappard D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism* 2008;**57**: 903-10.

29. Hidaka S, Okamoto Y, Abe K, Miyazaki K. Effects of indium and iron ions on in vitro calcium phosphate precipitation and crystallinity. *J. Biomed. Mater. Res* 1996;**31**:11-8.
30. Morrissey R, Rodríguez-Lorenzo LM, Gross KA. Influence of ferrous ion incorporation on the structure of hydroxyapatite. *J. Mater.Sci.: Mater.Med.* 2005;**16**:387-92.
31. Sutter B, Ming DW, Clearfield A, Hossner LR. Mineralogical and chemical characterization of iron-, manganese-, and copper-containing synthetic hydroxyapatites. *Soil Sci Soc Am J* 2003;**67**:1935-42.

Figures

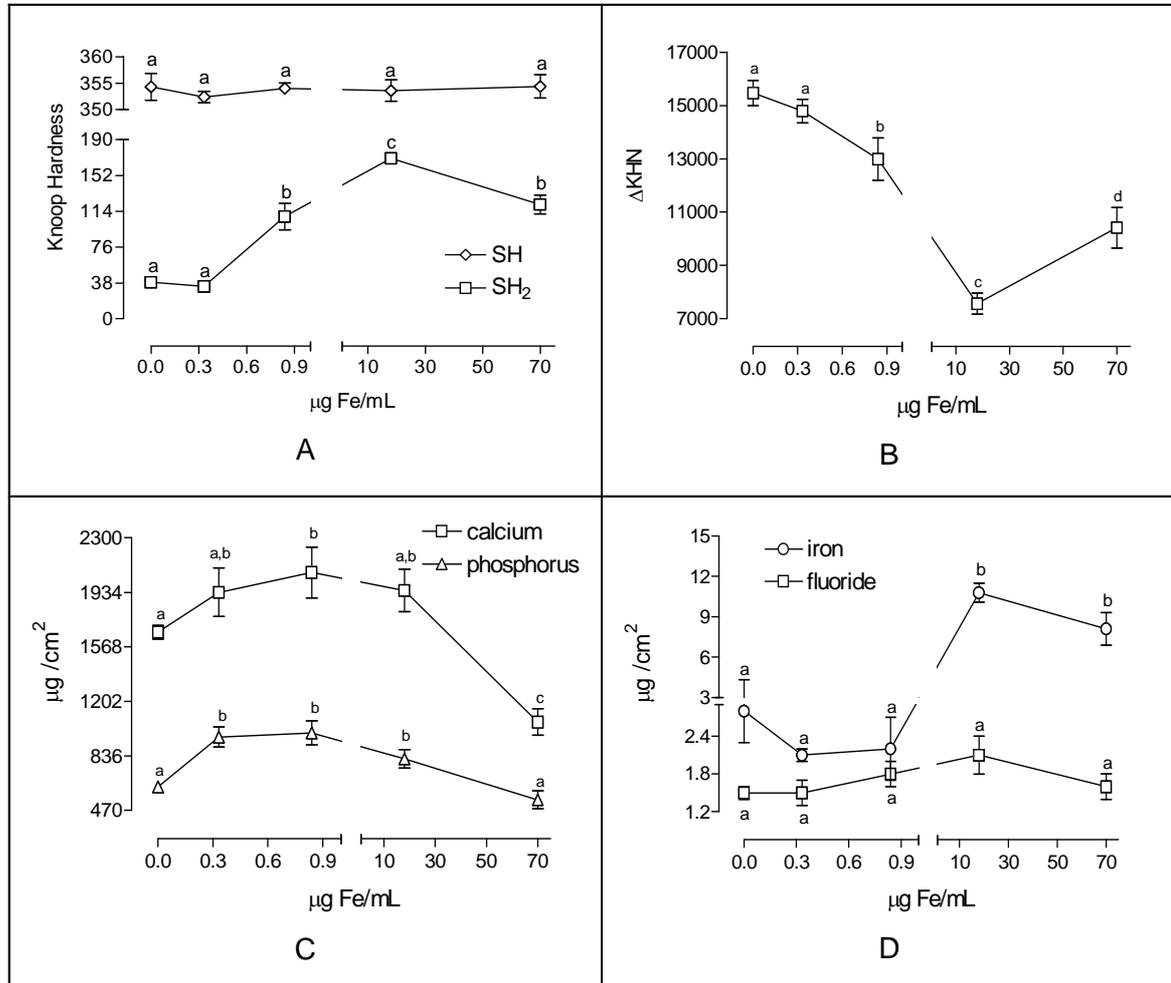


Figure 1 – Values (mean ±EP; $n=10$) of the surface hardness before (SH) and after (SH₂) (A), integrated subsurface hardness (Δ KHN) (B), calcium, phosphorus (C), fluoride and iron (D) in enamel after the demineralization pH-cycling. Means followed by distinct lower case letters show significant difference in each variable. (Kruskall Wallis, $p<0.05$; $n=10$).

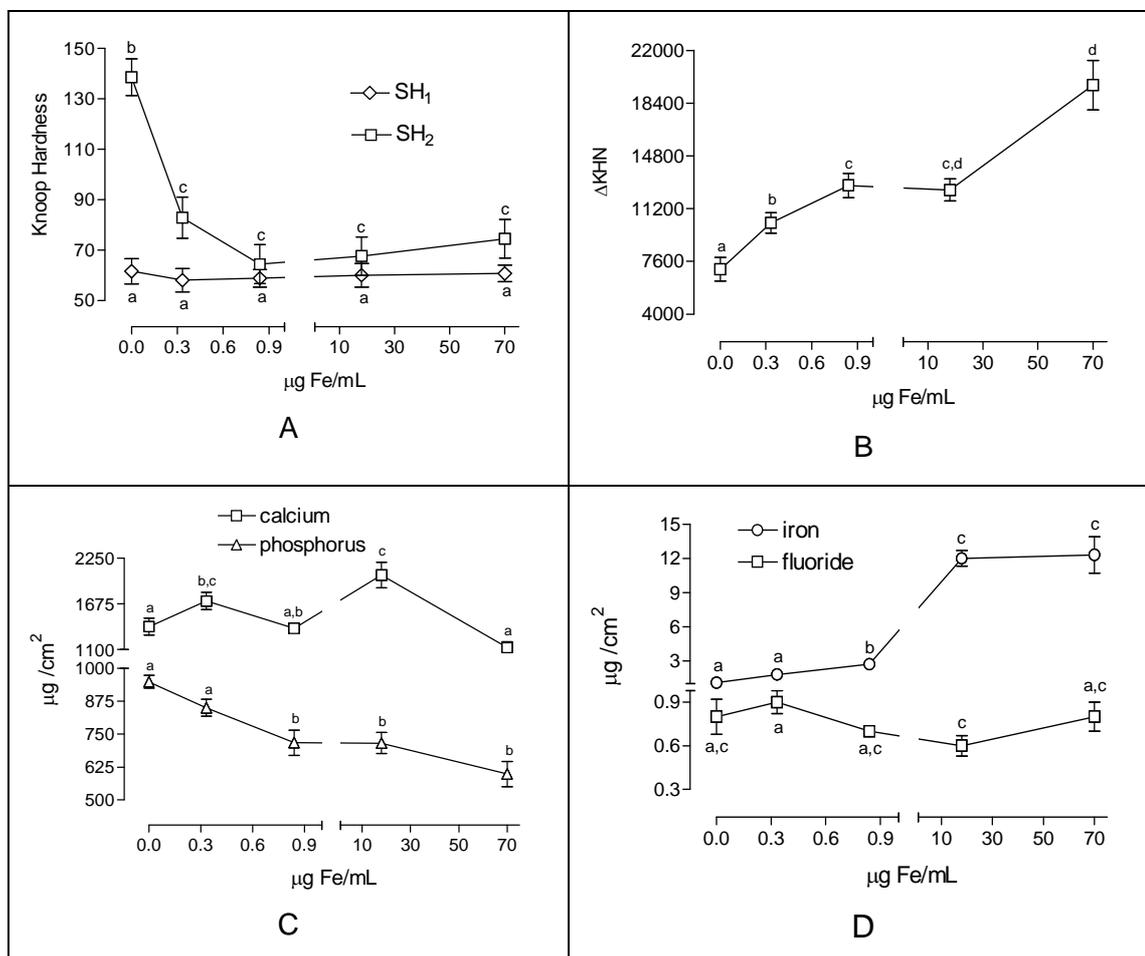


Figure 2 – Values (mean ±EP; $n=10$) of the post caries surface hardness (SH₁) and SH₂ (A), integrated subsurface hardness (Δ KHN) (B), calcium, phosphorus, (C), fluoride and iron (D) in enamel after the remineralization pH-cycling. Means followed by distinct lower case letters show significant difference in each variable. (Kruskall Wallis, $p<0.05$; $n=10$).

3 Capítulo 2

Effect of iron on enamel remineralization *in situ*

Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves¹

Luana Godoy Dalto¹

Kikue Takebayashi Sasaki²

Alberto Carlos Botazzo Delbem^{1*}

¹Department of Pediatric Dentistry, Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP 16015-050, Brazil

²Department of Basic Sciences (Biochemistry), Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP 16015-050, Brazil

Running title: Effect of iron on remineralization

Key words: Iron. Enamel. Remineralization. Hardness.

Corresponding author:

Alberto Carlos Botazzo Delbem

São Paulo State University - UNESP

R: José Bonifácio 1193

Araçatuba - SP - Brazil

CEP 16015-050

Fax: (55) (18) 3636 3235

Email: adelbem@foa.unesp.br

* De acordo com as normas da revista Journal of Dentistry (Anexo C)

Efeito do ferro na remineralização do esmalte *in situ*

3.1 Resumo

Objetivos: Avaliar o efeito do ferro (Fe) na remineralização de lesões de cárie artificial *in situ*. **Método:** Dez voluntários participaram deste estudo cego e linear, dividido em 4 períodos experimentais de 3 dias. Em cada fase, os voluntários fizeram uso de dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte bovino desmineralizados. As soluções de tratamento contendo diferentes concentrações de Fe na forma de sulfato ferroso (0,840; 18,0 e 70,0 µg Fe/mL) e água deionizada foram aplicadas durante 1 min, 2x ao dia. Durante o período experimental, os voluntários utilizaram dentífrício sem fluoreto. Foram realizadas análises de dureza de superfície (SH, SH₁, SH₂), para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH), de dureza em secção longitudinal, para o cálculo da dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN) e da concentração de flúor (F), cálcio (Ca), fósforo (P) e Fe presentes no esmalte (µg/cm²). Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). **Resultados:** Os valores de %SH demonstraram uma tendência a diminuir com o aumento da concentração de Fe (p<0,05). A dureza integrada de subsuperfície nos grupos tratados com Fe foi maior do que no controle (p<0,05). Não houve diferença significativa na concentração de Ca e F entre os grupos com Fe (p>0,05). Somente o grupo 18,0 µg Fe/mL apresentou redução significativa quanto à concentração de P, em relação ao controle (p<0,05). A concentração de Fe no esmalte aumentou de acordo com a concentração na solução de tratamento (p<0,05), não havendo diferença significativa entre os grupos 18,0 e 70,0 µg Fe/mL (p>0,05). **Conclusões:** As soluções de sulfato ferroso não foram capazes de promover a remineralização das lesões de cárie *in situ*.

Palavras-chave: Ferro; Remineralização; Esmalte; Dureza

Effect of iron on enamel remineralization *in situ*

3.2 Abstract

Objectives: To evaluate the effect of iron (Fe) on the remineralization of artificial caries lesion *in situ*. **Methods:** Ten volunteers participated in this blind-linear study, which was divided in four phases of 3 days. For each phase, volunteers wore palatal appliances containing four demineralized bovine enamel blocks. The treatments were performed twice a day with different concentrations of Fe (0.840; 18.0 and 70.0 µg Fe/mL), using FeSO₄.7H₂O solutions and a control group (deionized water). During all the experimental period, volunteers used a placebo dentifrice. The analysis were performed by surface (SH, SH₁, SH₂) and cross-sectional hardness to calculate the percentage of surface hardness recovery (%SH) and the integrated loss of subsurface hardness (ΔKHN). Fluoride (F), calcium (Ca), phosphorus (P) and iron (Fe) present in enamel (µg/cm²) were measured after acid biopsy. Data distribution were homogeneous and were analyzed by ANOVA and Tukey's test (p<0.05). **Results:** Values of %SH showed a tendency to decrease inversely related to Fe concentration in the solutions (p<0.05). Integrated subsurface hardness (ΔKHN) was higher in iron groups than in control group (p<0.05). There was no significant difference on Ca and F concentration (p>0.05) on enamel among the treatment groups. Only 18.0 µg Fe/mL group presented significant reduction on P concentration comparing to control group (p<0,05). An increase on enamel Fe concentrations was observed in higher concentrations (p<0.05), with no significant difference between 18.0 and 70.0 µg Fe/mL groups. **Conclusions:** The ferrous sulphate solutions are not able to promote remineralization of artificial caries lesions *in situ*.

Keywords: Iron; Remineralization; Enamel; Hardness

3.3 Introdução

Embora o uso de produtos fluoretados tenha contribuído para a redução da cárie dentária nas últimas décadas, estes têm sido considerados como um fator de risco para o aumento da fluorose dentária, devido a sua ingestão por crianças de tenra idade.¹ Tal constatação tem levado à procura de outros produtos que reduzam a cárie dentária, porém apresentando um menor risco para o desenvolvimento da fluorose. Neste sentido, trabalhos recentes têm demonstrado que o ferro (Fe) apresenta propriedades cariostáticas.²⁻⁸ Diferentes concentrações de sulfato ferroso têm sido usadas em estudos *in vitro* e *in situ* sobre a ação do ferro na desmineralização do esmalte dentário, demonstrando que o ferro reduz a desmineralização do esmalte em altos desafios cariogênicos.⁵⁻⁸ Também foi verificada a ação do ferro na erosão dentária em estudos *in vitro*⁹⁻¹², os quais comprovaram a efetividade do ferro na redução da dissolução do esmalte dentário.

Entretanto, existem poucos estudos sobre o efeito do ferro na remineralização do esmalte. Alguns estudos *in vitro* avaliaram o efeito da associação de íons (Fe e/ou Al) com flúor no tratamento de lesões de cárie artificial. A associação de ferro e flúor promoveu menor dissolução do esmalte do que o grupo tratado somente com flúor.^{13,14} No entanto, quando uma solução de F-Fe-Al foi utilizada, as lesões de cárie foram mais profundas que nos grupos controle e Duraphat.¹⁵ A presença do íon Fe foi reportada na superfície do esmalte¹⁶ e na superfície da lesão de cárie de dentina¹⁷, porém estes autores não avaliaram a utilização de soluções contendo Fe como tratamento.

Alves *et al.*¹⁸ avaliaram o efeito do ferro na desmineralização e remineralização do esmalte bovino *in vitro*, utilizando diferentes concentrações de

sulfato ferroso e dois modelos de ciclagem de pH (desmineralização e remineralização). Os autores demonstraram que embora a concentração de 18,0 µg Fe/mL tenha reduzido a desmineralização, o Fe não foi capaz de remineralizar as lesões de cárie de esmalte *in vitro*, em nenhuma concentração estudada. Apesar dos resultados obtidos no estudo *in vitro*¹⁸ terem sido desfavoráveis na remineralização, e devido à escassez de estudos na literatura sobre o efeito remineralizador do Fe, seria interessante investigar se os dados observados *in vitro* seriam confirmados em um estudo *in situ*, no qual as condições são mais próximas às reais.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de ferro na remineralização da lesão de cárie em esmalte bovino *in situ*, utilizando soluções contendo sulfato ferroso nas mesmas concentrações utilizadas no estudo de Alves *et al.*¹⁸

3.4 Material e Método

3.4.1 Delineamento Experimental

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia – campus de Araçatuba previamente ao início do estudo (Processo: FOA 2008/02380 – Anexo J). Participaram desse estudo cego e linear, 10 voluntários com idade entre 20 e 35 anos, apresentando boa saúde geral e bucal. Blocos de esmalte (4x4 mm; n=160) foram obtidos de dentes incisivos bovinos estocados em solução de formol a 2% neutra por 30 dias (Anexo D). As superfícies de esmalte dos blocos foram seqüencialmente polidas (Anexo E), permitindo sua seleção através da determinação da dureza de superfície (SH). Após a desmineralização artificial, os blocos de esmalte foram submetidos ao teste de

dureza de superfície pós-desmineralização (SH_1). Foram confeccionados dispositivos para a arcada superior, nos quais se fixaram 4 blocos de esmalte bovino desmineralizados. O estudo foi dividido em quatro períodos e um regime experimental de 3 dias de tratamento, com intervalo de 4 dias de descanso entre os tratamentos, foi estabelecido. As soluções de tratamento foram preparadas com diferentes concentrações de Fe^{2+} na forma de sulfato ferroso (0,840; 18,0 e 70,0 μg Fe/mL) e água deionizada (controle negativo), as quais eram utilizadas durante 1 min, duas vezes ao dia. Decorridos os tempos experimentais realizaram-se a análise de dureza de superfície (SH_2), para o cálculo da porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH), análise de dureza em secção longitudinal, para o cálculo da dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN) e análise das concentrações de flúor (F), cálcio (Ca), fósforo (P) e Fe presentes no esmalte ($\mu g/cm^2$). Foram considerados como fator de variação os tratamentos com sulfato ferroso ou água deionizada, como variáveis, a dureza de superfície (SH, SH_1 , SH_2 e %SH), dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN) e a concentração de F, Ca, P e Fe presentes no esmalte ($\mu g/cm^2$).

3.4.2 Formulação e Dosagem de Fluoreto do Dentifrício Experimental

O dentifrício utilizado no estudo foi manipulado no laboratório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com os seguintes componentes: dióxido de titânio, carboximetilcelulose, metil-p-hidroxibenzoato de sódio, sacarina, óleo de menta, glicerina, sílica abrasiva, laurilsulfato de sódio e água. A determinação do flúor total (FT) e do flúor iônico (FI) foi realizada através do método descrito por Delbem *et al.*¹⁹ utilizando eletrodo

específico combinado para íon F (9609 BN – Orion) acoplado ao analisador de íons (Orion 720 A+).

3.4.3 Seleção dos voluntários

Foram selecionados 10 adultos jovens, sem distinção ao gênero, residentes em área com água de abastecimento otimamente fluoretada, que apresentaram bom estado de saúde geral e bucal.²⁰⁻²² Foram excluídos da amostra fumantes, indivíduos com lesões de cárie ativa, aqueles que receberam aplicações de fluoreto pelo menos até 2 semanas antes do início do experimento, indivíduos que utilizaram nos últimos 2 meses, ou ainda utilizam medicamentos como antidepressivos, narcóticos, diuréticos e anti-histamínicos, os que sofreram irradiação, os que trabalham em ambientes poluídos por compostos de baixo pH (indústrias) e os que possuem doenças sistêmicas (xerostomia, diabetes tipo 1, doenças auto-imunes, má nutrição, problemas gastresofágicos e distúrbios de regurgitação e vômito).

3.4.4 Indução da lesão de cárie artificial

Após determinação da dureza de superfície inicial (SH) foi realizada a desmineralização de subsuperfície do esmalte²³ utilizando um modelo modificado a partir de Queiroz *et al.*²⁴ Os blocos de esmalte bovino foram isolados completamente com uma fina camada de esmalte de unha, com exceção da superfície externa de esmalte (área = 16 mm²), e colocados individualmente em solução desmineralizante (32 mL/bloco) por um período de 16 horas, a 37°C. A solução desmineralizante continha os seguintes componentes: 1,3 mmol/L Ca, 0,78 mmol/L P em tampão

acetato 0,05 mol/L, em pH 5,0; 0,03-0,04 ppm F. A seguir, os blocos foram submetidos à determinação de dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁).

3.4.5 Protocolo do estudo *in situ* e instrução aos voluntários

Antes de iniciar a fase experimental, os voluntários receberam e, nos casos de aceitação, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com o Código de Ética Profissional e Orientações contidas na Resolução 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde para experimentos envolvendo humanos. Orientações por escrito foram fornecidas aos voluntários antes de iniciar a pesquisa, instruindo-os a utilizar os dispositivos diariamente, inclusive para dormir, removendo-os unicamente durante as refeições. Indicações a respeito da não utilização de produtos contendo flúor, com exceção da água fluoretada, assim como de medicamentos e/ou enxagüatórios antibacterianos, também foram fornecidas.

Cada voluntário selecionado foi submetido a uma moldagem do arco superior com alginato para confecção do modelo de gesso pedra e do dispositivo palatino em resina acrílica.²⁰ Quatro blocos de esmalte desmineralizados foram fixados nos dispositivos palatinos (dois de cada lado), os quais ficaram na mesma altura da resina (Anexo G). O estudo contou com um regime experimental (3 dias) de uso do dispositivo palatino e tratamento com soluções de sulfato ferroso (0,840; 18,0 e 70,0 µg Fe/mL) e água deionizada (controle), 2 vezes ao dia, durante 1 minuto. Uma semana antes do início do experimento e durante todo o experimento, os voluntários utilizaram dentífrício sem fluoreto. As escovações poderiam ser realizadas de acordo com a necessidade do voluntário, mas os blocos de esmalte fixados ao dispositivo palatino só poderiam ser escovados 2x ao dia, previamente ao tratamento com as

soluções. Os voluntários foram orientados a permanecer com o dispositivo durante todo o dia e somente removê-lo durante as refeições. Após o término de cada período experimental (3 dias), os voluntários utilizaram dentífrício sem fluoreto durante os 4 dias que antecediam a fase posterior (wash-out).

3.4.6 Análise da dureza do esmalte

Para os testes de dureza (SH) nos blocos de esmalte foi utilizado o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2000 (Shimadzu Corporation - Kyoto - Japan), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA).²⁵ Após preparo e polimento dos blocos de esmalte, foram realizadas 5 impressões na região central do bloco de esmalte, separadas entre si por uma distância de 100 µm (Anexo G). Seguida à produção da lesão de cárie artificial do esmalte, os blocos foram novamente submetidos ao teste de dureza de superfície (SH₁), com impressões 100 µm distantes das iniciais. Decorrido o regime experimental, determinou-se dureza de superfície pós-regime experimental (SH₂) e realizaram-se 5 impressões equidistantes entre si e a 100 µm das impressões iniciais (SH). Calculou-se a porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH) de acordo com a seguinte fórmula: $\%SH_R = ((SH_2 - SH_1)/(SH - SH_1)) \times 100$.²⁵

Na seqüência, os blocos de esmalte foram seccionados longitudinalmente na região central do bloco e uma das metades de cada bloco foi incluída em resina acrílica e seqüencialmente polida para análise da dureza em secção longitudinal. Foram realizadas três seqüências de oito impressões, distantes 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 µm da superfície externa do esmalte, sendo uma na região central do bloco e, outras duas, 100 µm umas das outras, com carga de 25 g, durante 10s

(Anexo H). Os valores médios dos três pontos medidos foram calculados em cada distância. A área integrada da microdureza (KHN x μm) da lesão até o esmalte hígido foi calculada utilizando a regra trapezoidal (GraphPad Prism, versão 3.02) e subtraída da área integrada da dureza do esmalte hígido obtendo a dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN).²⁶

3.4.7 Análise de flúor, cálcio, fósforo e ferro no esmalte

A biópsia ácida foi utilizada para determinar a concentração de flúor, cálcio, fósforo e ferro no esmalte. Uma camada de esmalte ($\sim 50 \mu\text{m}$) foi removida pela imersão de cada metade do bloco de esmalte em 0.5 mL HCl 0,5 mol L⁻¹ durante 45 segundos, sob agitação. A solução resultante foi neutralizada pela adição de 0,5 mL NaOH 0,5 mol L⁻¹ (Anexo I).⁶

Para a análise de F foi utilizado eletrodo específico Orion 9609 e microeletrodo de referência invertido, adaptado ao analisador de íons (Orion 720A⁺). Foram adicionados 40 μL TISAB II (Tampão Ajustador de Força Iônica Total, Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) às amostras (40 μL) para determinação da concentração de fluoreto e os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A concentração de Ca foi determinada pelo método colorimétrico utilizando-se Arsenazo III, de acordo com o método descrito por Vogel *et al.*²⁷ A concentração de ferro foi determinada através da reação com piridil bis-fenil triazina sulfonato, por método colorimétrico (kit comercial da Laborlab, catálogo n^o 01700). A dosagem de fósforo foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow.²⁸

3.4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GMC versão 2002²⁹, adotando-se um limite de significância de 5%. Foram considerados como fatores de variação os grupos Controle, Fe 0,84, Fe 18 e Fe 70 e, como variáveis, os valores de SH, SH₁, SH₂, %SH, ΔKHN e concentração (μg/cm²) de F, Fe, Ca e P presentes no esmalte. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade (Cochran). Os dados de SH, SH₁, SH₂, %SH, ΔKHN e concentração de F, Fe, Ca e P presentes no esmalte apresentaram distribuição normal e homogênea e foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre a concentração de ferro presente no esmalte e os resultados de dureza (SH₂, %SH e ΔKHN).

3.5 Resultados

As concentrações (média±DP) de fluoreto total e iônico nos dentifrícios sem fluoreto (placebo) foram, respectivamente, 8,1 ±1,4 e 8,0 ±1,7 μg F/g.

Os valores médios de dureza de superfície inicial (SH), após desmineralização (SH₁) e após o experimento *in situ* (SH₂), porcentagem de dureza de superfície (%SH) e dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN) estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferenças significativas quanto aos valores de SH, bem como em relação aos valores médios da dureza de superfície pós-desmineralização (SH₁) entre os grupos (p>0,05). Quanto aos valores de dureza de superfície pós-regime experimental (SH₂), estes foram significativamente maiores para o grupo controle (água deionizada), não havendo diferença significativa para os grupos Fe 0,84 e Fe 18 (p>0,05), somente para o grupo Fe 70 (p<0,05). Os resultados de %SH demonstraram uma tendência a diminuir com o aumento da

concentração de Fe ($p < 0,05$). A dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN) foi menor para o grupo controle do que para os demais grupos ($p < 0,05$), sendo diretamente proporcional à concentração de Fe na solução de tratamento.

<Tabela1>

A Tabela 2 apresenta os valores de F, Ca, P e Fe no esmalte após biópsia ácida. Não houve diferenças significativas entre as concentrações de F nos grupos tratados com Fe ($p > 0,05$), mas em todos eles, a concentração de F foi menor que a observada no grupo controle ($p < 0,05$). A concentração de Ca, por sua vez, não apresentou diferença entre quaisquer grupos ($p > 0,05$). Com relação à concentração de Fe, não houveram diferenças significativas entre os grupos Fe 18 e Fe 70 ($p > 0,05$), bem como entre os grupos Fe 0,84 e controle ($p > 0,05$). Entretanto, nos dois primeiros, os valores foram maiores que nos dois últimos ($p < 0,05$). Quanto à concentração de P, o grupo Fe 18 foi o único que apresentou redução estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Observou-se correlação entre concentração de ferro presente no esmalte e os resultados de SH_2 ($r = -0,418$, $p = 0,007$), %SH ($r = -0,537$, $p < 0,001$) e ΔKHN ($r = 0,572$, $p < 0,001$).

<Tabela 2>

3.6 Discussão

Diferentes concentrações de ferro têm sido utilizadas em trabalhos a fim de melhor compreender as propriedades cariostáticas do sulfato ferroso em desafios

cariogênicos.^{5,7,30-33} Entretanto, não existem trabalhos avaliando a remineralização de lesões de cárie utilizando sulfato ferroso como agente remineralizador. Devido à escassez de estudos na literatura sobre o assunto, optou-se por escolher as concentrações de Fe testadas no presente trabalho *in situ* (0,840; 18,0; 70,0 µg Fe/mL) com base em estudos prévios *in vitro*¹⁸ e *in situ*⁵, a fim de se comparar os resultados, embora os estudos realizados previamente tenham testado o efeito do ferro em altos desafios cariogênicos.

Os protocolos *in situ* devem produzir um processo de remineralização pela ação da saliva demonstrando que o modelo permite a troca entre íons, como o cálcio e fosfato. O protocolo de remineralização *in situ* empregado neste estudo foi baseado no trabalho de Oliveira³⁴, no qual três dias de tratamento com dentifrício com 1100 µg F/g foram suficientes para produzir o máximo de remineralização das lesões de cárie artificial quando comparados a sete dias de tratamento. Devido à sua eficácia no estudo, associada a um menor período de uso do dispositivo palatino, o que proporciona maior conforto ao voluntário, e conseqüente melhor colaboração, este regime foi adotado no presente trabalho. Além disso, a eficácia do modelo foi confirmada pelo potencial de remineralização quando o grupo controle foi testado, o qual apresentou média de 23,9%±5,5 (Tabela 1).

A porcentagem de recuperação de dureza de superfície (%SH) apresentou uma tendência a diminuir com o aumento da concentração de sulfato ferroso, demonstrando que o tratamento com o sulfato ferroso reduziu a remineralização da lesão de cárie. Observou-se uma correlação negativa entre a presença de Fe no esmalte e SH₂, %SH e ΔKHN, principalmente nas concentrações de 18,0 e 70,0 µg Fe/mL. Os resultados do presente estudo confirmam achados prévios de um estudo *in vitro*, no qual as mesmas concentrações de Fe foram utilizadas na tentativa de

remineralizar lesões de cárie artificial.¹⁸ No entanto, no estudo *in situ* de Pecharki *et al.*⁵, o tratamento com solução de 70,0 µg Fe/mL provocou redução na desmineralização do esmalte bovino submetidos a alto desafio cariogênico. Segundo Torell², quando o esmalte é tratado com soluções de ferro, ocorre deposição de uma fina camada ácido-resistente (fosfato férrico) pela combinação dos íons ferro com fosfatos dissolvidos da superfície do esmalte. Este fosfato férrico formado precipitaria na superfície do esmalte, e em um desafio ácido, este composto formado se dissolveria primeiramente liberando íons ferro e fosfato para o meio, reduzindo a dissolução do esmalte. Esta seria uma possível explicação para a efetividade de algumas concentrações de Fe em trabalhos com altos desafios cariogênicos e erosivos. No processo de remineralização, possivelmente há pouca dissolução da camada de fosfato férrico depositado, e, portanto, estes depósitos poderiam obliterar os poros do esmalte desmineralizado, dificultando a difusão de íons para o interior da área de desmineralização subsuperficial. De acordo com Lynch *et al.*³⁵, o tipo de lesão de subsuperfície produzida artificialmente neste estudo permite uma rápida remineralização porque os poros na lesão se apresentam em maior número e com diâmetro aumentado. No entanto, o tratamento com ferro não permitiu que esta remineralização ocorresse.

Os resultados da biópsia do esmalte no presente estudo não evidenciam diferenças significativas na concentração de fósforo e cálcio em função da concentração de ferro presente no esmalte (Tabela 2), o que confirma a suposição de que os depósitos de fosfato férrico na superfície do esmalte reduzem as trocas iônicas. O aumento na concentração do ferro no esmalte foi correlacionado com os menores valores de dureza de superfície (SH₂) e maiores áreas de desmineralização de subsuperfície (ΔKHN), confirmando influência negativa do ferro na

remineralização do esmalte. De acordo com Guggenbuhl *et al.*³⁶, na presença do ferro ocorre a substituição dos grupos fosfato por carbonato, levando a uma alteração das propriedades mecânicas estruturais da hidroxiapatita. Podemos observar que há uma tendência à diminuição na concentração de fósforo no esmalte na presença de ferro em relação ao grupo controle, embora esta tenha sido estatisticamente significativa apenas no grupo Fe 18. A substituição de fosfato por carbonato poderia ter sido a responsável pela diminuição da dureza de superfície e subsuperficial observada no presente trabalho.

Alguns aspectos clínicos importantes em relação ao uso do ferro também devem ser considerados, tais como o gosto metálico e manchamento da superfície do esmalte.³⁷ Embora o manchamento possa ser facilmente removido com profilaxia profissional, este efeito colateral não é desejado. Mesmo que a avaliação dos efeitos colaterais do uso do ferro não tenha sido o propósito do presente estudo, vale ressaltar que alguns voluntários relataram o gosto desagradável das soluções, bem como manchamento dos blocos de esmalte tratados com as mesmas.

Embora o efeito do Fe na remineralização do esmalte desmineralizado não tenha apresentado bons resultados em um protocolo *in vitro*¹⁸ e no presente estudo *in situ*, trabalhos desenvolvidos sob condições cariogênicas^{5-8,18} e erosivas⁹⁻¹² demonstraram a eficácia do Fe na redução da dissolução do esmalte. Estes resultados conjuntamente sugerem que o Fe fortalece o esmalte dentário, reduzindo a desmineralização do esmalte. Por outro lado, como o tratamento com solução de Fe não mostrou uma capacidade em promover a remineralização do esmalte em estudos *in vitro* e *in situ*, os resultados indicam que este íon não pode ser considerado como substituto ao tratamento com flúor para o controle da cárie.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que as soluções de ferro não foram capazes de promover a remineralização das lesões artificiais de cárie *in situ*.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos. Agradecemos também à técnica de laboratório do Departamento de Odontologia Social e Infantil, Maria dos Santos Ferreira Fernandes, pela confecção dos dispositivos palatinos utilizados neste estudo e aos voluntários deste estudo, pela paciente colaboração.

3.7 Referências

1. Mascarenhas AK. Risk factors of dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatric Dentistry* 2000;**22**:269-77.
2. Torell P. Iron and dental caries. *Swedish Dental Journal* 1988;**12**:113-24.
3. Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *Journal of Dental Research* 2001;**80**:466-9.
4. Brookes SJ, Robinson C, Shore RC, Kirkham J. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralization. [abstract 132] *Caries Research* 2004;**38**:401.
5. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Research* 2005;**39**:123-9.
6. Martinhon CCR, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MFTB, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed "in situ". *Archives of Oral Biology* 2006;**51**:471-5.
7. Buzalaf MAR, De Moraes Italiani F, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhaes AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel *in vitro*. *Archives of Oral Biology* 2006;**51**:844-8.
8. Sales-Peres SHC, Pessan JP, Buzalaf MAR. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Archives of Oral Biology* 2007;**52**:128-32.
9. Kato MT, Maria AG, Vaz LG, Italiani F de M, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron supplementation on the erosive potential of carbonated or decarbonated beverage. *Journal of Applied Oral Science* 2007;**15**:61-4.

10. Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder in vitro by carbonated beverages. *Archives of Oral Biology* 2007;**52**:614-7.
11. Kato MT, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. *Archives of Oral Biology* 2007;**52**:1109-11.
12. Kato MT, de Moraes Italiani F, de Araújo JJ, Garcia MD, de Carvalho Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. *Journal of Dentistry* 2009;**37**:233-6.
13. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I, Edie J. Microprobe and SEM analysis of surface coatings on caries-like lesions in enamel after metal ion mordanting and APF application. *Journal of Dental Research* 1984;**63**:106-10.
14. Clarkson BH, Wefel JS, Miller I. The effect of polyvalent metal ion mordanting on caries-like lesion progression in enamel. *Journal of Dental Research* 1984;**63**:13-8.
15. Petersson LG, Derand T. Development of artificial carious lesions in enamel after F-varnish (Duraphat) and F-Fe-Al-solution treatment. *Swedish Dental Journal* 1981;**5**:219-23.
16. Driessens FC, Theuns HM, Heijligers HJ, Borggreven JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. *Caries Research* 1986;**20**:398-405.
17. Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Research* 1975;**9**:278-85.

18. Alves KMRP, Franco KS, Sasaki KT, Buzalaf, MAR, Delbem ACB, Iron effect on enamel demineralization and remineralization *in vitro*. *Archives of Oral Biology*. In press 2009.
19. Delbem ACB, Vieira AEM, Cury JA. Cariostatic potencial evaluation of most popular Brazillian dentifrice. *Revista Brasileira de Odontologia* 2002;**59**:14-8.
20. Delbem ACB, Carvalho LP, Morihisa RK, Cury JA. Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization *in situ*. *Caries Research* 2005;**39**:258-60.
21. Kielbassa AM, Schulte-Monting J, Garcia-Godoy F, Meyer-Lueckel H. Initial *in situ* secondary caries formation: effect of various fluoride-containing restorative materials. *Operative Dentistry* 2003;**28**:765-72.
22. Tenuta LM, Ribeiro C C, Goncalves NC, Del Bel Cury AA, Aires CP, Tengan C, Tagliaferro EP, Pecharki GD, Napimoga MH, Tabchoury CP, Cury JA. The short-term *in situ* model to evaluate the anticariogenic potential of ionomeric materials. *Journal of Dentistry* 2005;**33**:491-7.
24. Queiroz CS, Hara AT, Leme FP, Cury JA. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Brazilian Dental Journal* 2008;**19**:21-7.
25. Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF: Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Research* 2005;**39**:514-20.
26. Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Research* 2009;**43**:50-6.

27. Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Research* 1983;**17**:23-31.
28. Fiske CH, Subarrow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 1925;**66**:375-400.
29. Campos, GM: GMC 2002 [computer program]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia; 2003. Available from: URL:<http://www.forp.usp.br/restauradora/gmv/gmc.html#gmc>.
30. Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Archives of Oral Biology* 1996;**41**:1003-10.
31. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. *Caries Research* 1997;**31**:238-43.
32. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated and intact rats. *Caries Research* 1997;**31**:244-8.
33. Miguel JC, Bowen WH, Pearson, SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Archives of Oral Biology* 1997;**42**:377-83.
34. Oliveira RAD. Modelo *in situ* de remineralização para determinar dose-resposta com dentifrícios de baixa concentração de fluoreto utilizando esmalte bovino [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, 2009.

35. Lynch RJM, Mony U, ten Cate JM. Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization in vitro. *Caries Res* 2007;**41**:257-62.
36. Guggenbuhl P, Filmon R, Mabileau G, Baslé MF, Chappard D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism* 2008;**57**:903-10.
37. Addy M, Moran J. Mechanisms of stain formation on teeth, in particular associated with metal ions and antiseptics. *Advances in Dental Research* 1995;**9**:450-6.

Tabelas

Tabela 1 – Valores (média±DP, n=10) de dureza inicial (SH), dureza pós-desmineralização (SH₁), dureza pós-tratamento (SH₂), porcentagem de perda mineral (%SH) e dureza integrada de subsuperfície (ΔKHN) no grupo controle (água) e nos grupos de tratamento (soluções contendo 0,84, 18,0 e 70,0 µg Fe/mL)

Variáveis	Grupos			
	Controle	Fe 0,84	Fe 18	Fe 70
SH	361,9 ±6,3 ^a	361,7 ±4,5 ^a	361,0 ±8,0 ^a	360,7 ±4,5 ^a
SH ₁	60,6 ±6,7 ^a	64,9 ±7,4 ^a	68,4 ±5,5 ^a	66,5 ±5,8 ^a
SH ₂	129,9 ±18,9 ^a	126,2 ±17,7 ^{a,b}	118,7 ±17,8 ^{a,b}	107,7 ±10,9 ^b
%SH	23,9 ±5,5 ^a	21,2 ±5,2 ^{a,b}	17,2 ±6,1 ^{b,c}	13,2 ±3,3 ^c
ΔKHN	4.318,3 ±523,6 ^a	5.911,5 ±692,9 ^b	6.051,2 ±802,9 ^b	7.359,0 ±971,3 ^c

Letras distintas na mesma linha mostram diferença entre os grupos em cada análise (ANOVA: SH - p=0,966; SH₁ - p=0,061; SH₂ - p=0,025; %SH - p<0,001; ΔKHN - p<0,001).

Tabela 2 – Concentrações (média±DP, n=10) de F, Fe, Ca e P no esmalte dentário após tratamento com soluções contendo 0, 0,84, 18,0 e 70,0 µg Fe/mL

Variáveis (µg/cm ²)	Grupos			
	Controle	Fe 0,84	Fe 18	Fe 70
Fluoreto	1,58 ±0,29 ^a	1,20 ±0,27 ^b	1,27 ±0,29 ^b	1,15 ±0,275 ^b
Ferro	0,60 ±0,47 ^a	0,602 ±0,40 ^a	2,01 ±0,49 ^b	2,26 ±0,73 ^b
Cálcio	1294,3 ±198,0 ^a	1120,5 ±196,5 ^a	1072,7 ±238,2 ^a	1176,7 ±122,4 ^a
Fósforo	730,6 ±120,1 ^a	611,5 ±99,1 ^{a,b}	544,0 ±93,0 ^b	628,1 ±73,3 ^{a,b}

Letras distintas na mesma linha mostram diferença entre os grupos em cada análise (ANOVA: Fluoreto - p=0,007; Ferro - p<0,001; Cálcio - p=0,252; Fósforo - p=0,01).

4 Capítulo 3

Effect of iron on hydroxyapatite dissolution *in vitro*

Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves¹

Kikue Takebayashi Sasaki²

João Carlos Silos Moraes³

Alberto Carlos Botazzo Delbem^{1*}

¹Department of Pediatric Dentistry, Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP 16015-050, Brazil

²Department of Basic Sciences, Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP 16015-050, Brazil

³Department of Physics and Chemistry, São Paulo State University, Ilha Solteira, Av. Brasil 56 Ilha Solteira SP 15385-000, Brazil.

Running title: Effect of iron on hydroxyapatite

Key words: Iron. Hydroxiapatite. Fluoride. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Corresponding author:

Alberto Carlos Botazzo Delbem

São Paulo State University - UNESP

R: José Bonifácio 1193

Araçatuba - SP - Brazil

CEP 16015-050

Fax: (55) (18) 3636 3235

Email: adelbem@foa.unesp.br

* De acordo com as normas da revista Archives of Oral Biology (Anexo B)

4.1 Resumo

Objetivos: Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Fe (0,840; 18,0 e 70,0 µg Fe/mL) e fluoreto (F, 1100 µg F/mL) sobre a hidroxiapatita (HA) sintetizada submetida à ciclagem de pH, analisada por meio de espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e da concentração de F, Ca, P e Fe. *Material e Métodos:* O pó de HA (0,5 g) foi suspenso em soluções experimentais (100 mL) de Fe e F e submetidas a um modelo de ciclagem de pH. Duas amostras de cada grupo (Fe 0,84, Fe 18, Fe 70, F 1100, HAdesm) foram analisadas por meio do FTIR. Para a determinação da concentração de F, Ca, P e Fe, cinco amostras de cada grupo (Fe 0,84, Fe 18, Fe 70, F 1100 e HAdesm) foram utilizadas. Os dados de F, Ca, P e Fe foram submetidos a ANOVA, seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). *Resultados:* Houve redução em todas as bandas de fosfatos e da OH⁻ um aumento no modo vibracional ν_3 do carbonato nos grupos contendo Fe. No grupo 1100, observou-se um aumento na intensidade das bandas de fosfatos, bem como uma redução da banda OH. Uma maior concentração de Ca foi observada no grupo F 1100, sem diferença significativa entre os grupos Fe 18 e Fe 70 ($p > 0,05$). Os menores valores de P foram observados nos grupos F 1100 e Fe 0,84, sem diferença entre os grupos tratados ($p > 0,05$). Observou-se também um aumento nas concentrações de Fe no cristal diretamente proporcional à concentração de F nas soluções de tratamento ($p < 0,05$). *Conclusão:* Os resultados do presente estudo permitem concluir que, na presença de ferro, ocorre a formação de uma apatita com baixa cristalinidade e conseqüentemente, maior solubilidade.

Palavras-chave: Ferro; Hidroxiapatita; Fluoreto; Espectroscopia Infravermelho Transformada de Fourier

4.2 Abstract

Objectives: To evaluate the effect of Fe (0.84; 18.0 and 70.0 µg Fe/mL) and fluoride (F, 1100 µg F/mL) in synthetic hydroxiapatite (HA) submitted a pH-cycling model by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and F, Ca, P and Fe analysis.

Materials and Methods: The powder of HA (0.5 g) was suspended in experimental solutions (100 mL) of Fe and F and submitted to pH-cycling. Two samples of each group (Fe 0.84, Fe 18, Fe 70, F 1100, HAdesm) were characterized using FTIR. To determination of F, Ca, P and Fe, five samples of each group were analyzed. The data of F, Ca, P and Fe were submitted to ANOVA, followed by Tukey's test ($p < 0.05$). *Results:* There was a reduction in all bands of phosphates and hydroxyls and an increase in the carbonate vibrational modes ν_3 to the groups with Fe. The intensity of the phosphate bands increased in the group F 1100 and a decreased of the hydroxyls bands. It was observed a higher value of Ca concentration in the group F 1100, with no significant difference between the groups Fe 18 e Fe 70 ($p > 0.05$). Lowest values of P were observed in the groups F1100 and Fe 0.084, with no significant difference among other groups ($p > 0.05$). It was possible to observe an increase in Fe concentration in the HA directly related to the Fe concentrations in the treatment solutions. For F, the higher value was observed in the group 1100 ($p < 0.05$). *Conclusion:* The results of the present study show that the presence of Fe causes the precipitation of an apatite with low crystallinity and high solubility.

Keywords: Iron; Hydroxyapatite; Fluoride; Fourier Transform Infrared Spectroscopy

4.3 Introdução

O íon ferro (Fe) é conhecido pelo seu importante papel no tratamento e prevenção da anemia.¹ Resultados de estudos conduzidos em humanos e animais têm demonstrado que os íons ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) também apresentam propriedades cariostáticas.²⁻⁶ Sozinho ou em combinação com outros íons, tais como flúor e cobre, o ferro tem um ótimo efeito na redução do potencial cariogênico do açúcar.^{2,5,7}

Recentemente, em seu trabalho *in situ*, Alves et al.* avaliaram o efeito do sulfato ferroso na remineralização do esmalte bovino e observaram redução na dureza do mesmo. Essa diminuição na dureza do esmalte pode estar associada à menor cristalinidade do mesmo na presença do ferro. Entretanto, muitos trabalhos *in vitro* e *in situ* sobre a ação do ferro no esmalte dentário demonstram que este íon reduz a desmineralização do esmalte em altos desafios cariogênicos e/ou erosivos⁸⁻¹⁶, os quais comprovaram a efetividade do ferro na redução da dissolução do esmalte dentário.

A hidroxiapatita (HA), com fórmula química $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$, por ser o principal componente mineral de ossos e dentes, vem sendo largamente aplicada como um biomaterial. A estrutura da HA permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade: o Ca^{2+} pode ser substituído por vários metais, entre eles o Fe^{2+} ; os grupos PO_4^{3-} podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos e, os grupos OH^- por carbonatos, flúor e cloro. Estas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a estabilidade, a bioatividade, a biocompatibilidade, a solubilidade e as propriedades

* Alves KMRP, Dalto LG, Sasaki KT, Delbem ACB. Effect of iron on enamel remineralization *in situ*.

de adsorção da estrutura da HA sem que ocorra significativa mudança na simetria hexagonal da estrutura.¹⁷

Guggenbuhl *et al.*¹⁸ demonstraram que a presença de Fe na HA altera a qualidade do cristal com decréscimo da cristalinidade e substituição dos grupos fosfato por carbonato, que poderia levar à diminuição da resistência óssea.

A análise das alterações no cristal da HA ajudaria a esclarecer o mecanismo de ação do ferro. A utilização de testes como a difração de Raios-X, microscopia eletrônica de varredura ou espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR) seriam importantes para o melhor entendimento do que ocorre na superfície do cristal quando o ferro é utilizado.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de Fe (0,840; 18,0 e 70,0 µg Fe/mL) e fluoreto (1100 µg F/mL) sobre a HA sintetizada submetida à ciclagem de pH e analisada por meio de FTIR e da concentração de F, Ca, P e Fe.

4.4 Material e Método

4.4.1 Síntese da hidroxiapatita

A síntese da hidroxiapatita baseou-se no estudo de Qu e Wei¹⁹ e Rintoul *et al.*²⁰ Para isto, soluções de nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich Co., USA] 1 mol L⁻¹ (300 mL) e de fosfato de amônio dibásico [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Sigma-Aldrich Co., USA] 0,3 mol L⁻¹ (600 mL) foram preparadas. O pH de ambas as soluções foi ajustado entre 10-12 utilizando hidróxido de amônio (29,5%). Adicionou-se solução de fosfato de amônio dibásico à solução de nitrato de cálcio lentamente (2 a 5 mL/minuto), sob agitação constante, a 37° C. A maturação dos precipitados foi

realizada durante 7 dias, à temperatura de 37° C, mantendo o pH da solução ao redor de 10. O precipitado foi separado por filtração, utilizando funil de Buchner acoplado a um sistema de vácuo (-600 mm Hg), lavado repetidamente com água deionizada (250 mL/0,5 g de HA) e seco em estufa por 24 horas a 70° C. Decorrida esta fase, o precipitado foi triturado utilizando almofariz de ágata e grãos com 53 µm de diâmetro foram selecionados por meio de peneiras granulométricas (HA sintética) (Anexo K).

4.4.2 Ciclagem de pH e tratamento

Cinco ciclagens de pH foram realizadas para cada grupo testado. Para tanto, soluções (100 mL) de sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck, Alemanha) nas concentrações de 0,84 (Fe 0,84), 18,0 (Fe 18) e 70,0 µg Fe/mL (Fe 70)⁸ foram preparadas, bem como uma solução de NaF contendo 1100 µg F/mL (NaF, Merck, Alemanha), utilizada como controle positivo (F 1100) e água destilada/deionizada, considerada como controle negativo (HA desm). O pó da HA (0,5 g) produzido foi suspenso em cada solução experimental preparada, durante 30 minutos, mantendo-se pH 7,0.

Após este período, o pH das soluções foi reduzido lentamente até 4,0, utilizando-se ácido nítrico (HNO_3 , Merck, Alemanha) 1 mol L⁻¹. Decorridos 30 minutos, o pH de cada solução foi elevado para 7,0, adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH, Merck, Alemanha) 1 mol L⁻¹. Repetiu-se o processo de ciclagem de pH 3 vezes, finalizando a ciclagem em pH 7,0, a 37° C.^{19,20} Realizou-se a maturação dos precipitados durante 24 horas, a 37° C. Após a ciclagem de pH, o precipitado foi filtrado utilizando funil de Büchner acoplado a um sistema de vácuo (-600 mm Hg) e lavado subsequentemente cinco vezes com água deionizada para eliminar resíduos

remanescentes de sódio na solução.²¹ Este precipitado foi seco em estufa por 24 horas a 70° C, e triturado utilizando gral e pistilo de ágata. Os grãos com 53 µm de diâmetro foram selecionados utilizando peneiras granulométricas, para análise de FTIR e determinação de F, Ca, P e Fe nos pós de hidroxiapatita (Anexo K).

4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR)

Duas amostras da hidroxiapatita ciclada de cada grupo (Fe 0,84, Fe 18, Fe 70 e F 1100) foram preparadas e acondicionadas em porta-amostra para a análise de FTIR (Anexo L). Também foram analisadas amostras de HA ciclada sem tratamento com Fe (HA_{desm}). Os espectros das amostras foram obtidos por meio de refletância difusa, utilizando espectrofotômetro marca Nicolet, modelo Magna 760, varredura espectral de 128, com frequência entre 4500 a 450 cm⁻¹ e resolução de 2 cm⁻¹. Após a obtenção dos espectros, estes foram normalizados e as alturas dos picos dos grupos experimentais foram comparadas com o do grupo controle negativo (HA_{desm}).

4.4.4 Análise de Fluoreto, Cálcio, Fósforo e Ferro na Hidroxiapatita

Para a determinação de F, Ca, P e Fe, cinco amostras de cada grupo (Fe 0,84, Fe 18, Fe 70, F 1100 e HA_{desm}) foram utilizadas (Anexo L). Pesou-se 5 mg de hidroxiapatita ciclada em microtubos de polipropileno (Injeplast, PR, Brasil) e acrescentou-se 0,5 mL de solução de ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹. Após agitação durante 1 hora (Mesa Agitadora Orbital, TE-141, Tecnal), foi acrescentado ao frasco 0,5 mL de NaOH 1,0 mol L⁻¹.

Para dosagem de F utilizou-se o eletrodo específico (Orion 9409) e eletrodo de referência invertido (Orion 900100) acoplado a um analisador de íons (Orion

720A⁺). O eletrodo foi previamente calibrado com padrões variando de 0,060 a 0,0960 µg F/mL e 5,40 a 86,40 µg F/mL nas mesmas condições das amostras. Alíquotas de 40 uL da amostra acrescidas de 40 uL de TISAB II (tampão ajustador de força iônica, pH 5,2) foram utilizadas para a determinação da concentração de F. A concentração de Ca foi determinada pelo método colorimétrico utilizando-se Arsenazo III, de acordo com o método descrito por Vogel *et al.*²² A concentração de ferro foi determinada através da reação com piridil bis-fenil triazina sulfonato, por método colorimétrico (kit comercial da Laborlab. O fósforo foi dosado pelo método colorimétrico descrito por Fiske e Subbarow.²³

4.4.5 Análise dos resultados

Os dados do FTIR foram descritos em função da presença e intensidade (%) das bandas de acordo com os grupos submetidos à ciclagem de pH em relação à HA controle negativo (HA_{desm}). Os valores da concentração (mg/g) de F, Fe, Ca e P na HA foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade, Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Os dados de Ca e P apresentaram distribuição normal e homogênea e foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste de Tukey. Os resultados de F e Fe foram submetidos a análise paramétrica, como descrito anteriormente, após transformação logarítmica e raiz cúbica, respectivamente. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GMC versão 2002²⁴ com limite de significância de 5%.

4.5 Resultados

As bandas características de apatita correspondentes aos grupos funcionais dos fosfatos (PO₄³⁻), hidroxilas (OH⁻), carbonatos (CO₃²⁻) e H₂O foram observadas

neste estudo (Figura 1-A). O grupo fosfato apresentou 2 bandas: uma nas regiões de 1086-1093 (estiramento simétrico – ν_1) e 1173-1188 cm^{-1} (estiramento assimétrico – ν_3) e outra nas regiões de 582-590 (vibração angular – ν_2) e 623-629 cm^{-1} (vibração angular – ν_4). A banda da hidroxila foi observada nas regiões de 631-650 e 3570 cm^{-1} . O grupo carbonato apresentou 3 bandas: uma na região 866-879 cm^{-1} (ν_2) e as outras duas, nas regiões de 1419-1425 e 1452-1460 cm^{-1} (ν_3).

< Figura 1 >

O tratamento com fluoreto (F 1100) produziu um aumento nas bandas de fosfatos, exceto para a região de 1173-1188 cm^{-1} , quando comparado aos demais grupos (Tabela 1). O tratamento com Fe 0,84 promoveu leve aumento nas regiões de 582-590 e 623-629 cm^{-1} . Os grupos Fe 18 e Fe 70 apresentaram redução em todas as bandas de fosfatos (Tabela 1). A banda referente à hidroxila, na região de 3570 cm^{-1} reduziu em relação à HA_{desm}, independente do tratamento. Na região de 631-650 cm^{-1} ocorreu uma redução mais intensa nos grupos F 1100 e Fe 0,84.

< Tabela 1 >

Os modos vibracionais (estiramento) do carbonato ν_2 e ν_3 apresentaram bandas nas regiões de 866-966 cm^{-1} e 1419-1425, 1452-1458 e 1641-1660 cm^{-1} , respectivamente (Tabela 2). A HA submetida à ciclagem de pH com 1100 $\mu\text{g F/mL}$ apresentou uma diminuição da intensidade das bandas de carbonatos em todos os modos vibracionais em relação à HA_{desm}. Com o tratamento da HA em soluções de Fe observou-se um aumento das bandas de carbonatos com maior intensidade nas

regiões de 1419-1425 e 1641-1660 cm^{-1} (Tabela 2). A banda referente à água aumentou em relação à HA_{desm} com os tratamentos com Fe.

< Tabela 2 >

A concentração de fluoreto na HA foi maior no grupo F 1100 ($p < 0,05$). Com o aumento na concentração de ferro nas soluções de ciclagem, ocorreu maior presença destes íons na hidroxiapatita ($p < 0,05$) (Tabela 3). Uma maior concentração de Ca foi observada no grupo F 1100, sem diferença significativa entre os grupos Fe 18 e Fe 70 ($p > 0,05$). A concentração de cálcio foi semelhante entre os grupos HA_{desm}, Fe 0,84, Fe 18 e Fe 70 ($p > 0,05$). Os menores valores de fósforo foram observados nos grupos F 1100 e Fe 0,84 ($p > 0,05$). O grupo F 1100 apresentou menor concentração de fósforo e maior relação Ca/P, quando comparado aos outros grupos (Tabela 3).

< Tabela 3 >

4.6 Discussão

Os achados de Alves et al.^{*8} demonstraram que soluções de Fe, na forma de sulfato ferroso, não foram capazes de remineralizar lesões de cárie *in vitro* e *in situ*, porém, observou-se uma redução na desmineralização do esmalte bovino *in vitro*. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que o Fe possui um efeito em desafios ácidos.⁸⁻¹⁶ É consenso na literatura, que o F possui um efeito cariostático, por sua ação tópica, reduzindo a desmineralização e promovendo a remineralização do esmalte.²⁵ A utilização de soluções contendo Fe ou F com hidroxiapatita foram

*Alves KMRP, Dalto LG, Sasaki KT, Delbem ACB. Effect of iron on enamel remineralization *in situ*.

utilizadas neste estudo a fim de melhor entender a aplicação destas na dinâmica da cárie.

Após o processo de diminuição (dissolução) e aumento de pH (re-precipitação) nas soluções contendo fluoreto (1100 µg F/mL) e hidroxiapatita sintetizada (HA), o espectro do FTIR mostrou que a HA precipitada apresentou uma maior cristalinidade. De acordo com Antonakosa *et al.*²⁶ e Coates²⁷, os modos vibracionais dos fosfatos se mostram mais intensos em apatitas bem mineralizadas. No presente estudo, ocorreu um aumento na intensidade das bandas de fosfatos nos espectros do grupo F1100 nas regiões entre 582-590, 623-629 e 1086-1093 cm⁻¹. Além disso, houve redução nas bandas de carbonatos (Figura 1 Tabela 2) confirmando o aumento do fosfato, pois, quando os carbonatos estão presentes na hidroxiapatita, estes ocupam os sítios dos fosfatos na estrutura do cristal.^{26,28,29} Somando-se a isto, houve uma redução da banda OH⁻ nas regiões 631-650 e 3570 cm⁻¹, o que sugere a substituição pelo F. A redução destas bandas está relacionada com um aumento do fluoreto e melhor cristalinidade da apatita.^{30,31} De acordo com Rintoul *et al.*²⁰ e Sundaram *et al.*³¹, a presença da banda OH⁻ na região de 631-647 cm⁻¹ é indicativo de precipitação de hidroxiapatita. Além disso, a redução da intensidade deste pico significa uma ligação do fluoreto a OH⁻, sem substituição. A substituição parcial ou completa desta banda ocorre quando a hidroxiapatita é submetida a altas temperaturas onde observamos o aparecimento de um pico na região de 745-747 cm⁻¹.^{20, 31} Os dados de dosagem de F no grupo F 1100 mostram a presença de F na estrutura da HA. De acordo com a análise de FTIR, não houve a precipitação de fluorapatita, mas de uma hidroxiapatita fluoretada com uma relação molar Ca/P similar a de uma apatita bem cristalinizada (Tabela 3).

Quando a HA sintetizada foi misturada às soluções contendo Fe^{2+} e ciclada, todas as bandas de fosfatos mostraram redução (Figura 1 e Tabela 1) quando comparadas à HA_{desm}. Observou-se, também, um aumento no modo vibracional ν_3 do carbonato. Estas alterações entre a presença de fosfato e carbonato são demonstradas nos trabalhos de Gibson *et al.*²⁹ e Barinov *et al.*³² A redução na intensidade das bandas de fosfato e sua substituição por carbonatos está relacionada à diminuição da cristalinidade da hidroxiapatita.¹⁸ O aumento de carbonatos na estrutura da hidroxiapatita promove uma liberação de íons Ca do cristal. A presença ou aumento de carbonato provoca um déficit de carga negativa que é compensado pela liberação de íons cálcio a fim de equilibrar as cargas da estrutura da hidroxiapatita.³³ No presente estudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à concentração de Ca. Entretanto na relação Ca/P observa-se uma redução destes valores quando se utilizou soluções contendo Fe (Tabela 3). Observou-se uma maior concentração de Fe no cristal (Tabela 3) com o aumento da concentração nas soluções de tratamento. O Fe^{2+} e Fe^{3+} podem ser incorporados à estrutura da hidroxiapatita substituindo o cálcio em sua estrutura^{18,34,35} e diminuindo a relação molar Ca/P. Segundo Sutter *et al.*³⁵, a precipitação da hidroxiapatita na presença do ferro resultaria em uma apatita deficiente em Ca, onde o Fe estaria ocupando os sítios do Ca. A redução da banda da hidroxila na presença do ferro (Figura 1 e Tabela 1) pode indicar apatitas pobremente cristalinizadas.³⁶ Apesar da ausência de fluoreto nestes grupos (Tabela 3), a intensidade do modo vibracional da hidroxila diminuiu, o que sugere uma substituição desta banda por carbonato^{29,32} e o pico na região $631\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ praticamente não se alterou nos grupos Fe 18 e Fe 70. A presença do pico de carbonato na região $1641\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ é um indicativo desta possibilidade.

A substituição de fosfato por carbonato pode ter sido a responsável pela diminuição da dureza de superfície e subsuperficial observada no recente estudo de Alves et al.*, onde se utilizam as mesmas concentrações de Fe, porém avaliando-se a remineralização de esmalte bovino *in situ*.

A redução da intensidade das bandas de fosfato e da hidroxila aliado ao aumento da banda de carbonato encontrados no presente trabalho permite concluir que na presença de ferro ocorre produção de uma apatita com baixa cristalinidade e, conseqüentemente, maior solubilidade.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos.

* Alves KMRP, Dalto LG, Sasaki KT, Delbem ACB. Effect of iron on enamel remineralization *in situ*.

4.7 Referências

1. Lynch SR. The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;**18**:333-46.
2. Oppermann RV, Rölla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque in vivo. *Caries Res* 1980;**14**:422-7.
3. Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Arch Oral Biol* 1996;**41**:1003-10.
4. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. *Caries Res* 1997;**31**:238-43.
5. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated and intact rats. *Caries Res* 1997;**31**:244-8.
6. Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Arch Oral Biol* 1997;**42**:377-83.
7. Brookes SJ, Robinson C, Shore RC, Kirkham J. Inhibitory effect of metal ions on acid demineralization. [abstract 132] *Caries Res* 2004;**38**:401.
8. Alves KMRP, Franco KS, Sasaki KT, Buzalaf, MAR, Delbem ACB, Iron effect on enamel demineralization and remineralization in vitro. *Arch Oral Biol*. In press 2009.
9. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2005;**39**:123-9.

10. Martinhon CCR, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MFTB, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed "in situ". *Arch Oral Biol* 2006;**51**:471-5.
11. Buzalaf MAR, De Moraes Italiani F, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhaes AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel in vitro. *Arch Oral Biol* 2006;**51**:844-8.
12. Sales-Peres SHC, Pessan JP, Buzalaf MAR. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an in situ/ex vivo study. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:128-32.
13. Kato MT, Maria AG, Vaz LG, Italiani FM, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron supplementation on the erosive potential of carbonated or decarbonated beverage. *J Appl Oral Sci* 2007;**15**:61-4.
14. Kato MT, Maria AG, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on the dissolution of bovine enamel powder in vitro by carbonated beverages. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:614-7.
15. Kato MT, Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Effect of iron on acid demineralisation of bovine enamel blocks by a soft drink. *Arch Oral Biol* 2007;**52**:1109-11.
16. Kato MT, de Moraes Italiani F, de Araújo JJ, Garcia MD, de Carvalho Sales-Peres SH, Buzalaf MA. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. *J Dent* 2009;**37**:233-6.
17. Hench LL, Wilson J, editors. Introduction to bioceramics. Singapore: World Scientific; 1993.
18. Guggenbuhl P, Filmon R, Mabileau G, Baslé MF, Chappard D. Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism* 2008;**57**:903-10.

19. Qu H, Wei M. Synthesis and characterization of fluorine-containing hydroxyapatite by a pH-cycling method. *J Mater Sci Mater Med* 2005;**16**:129-33.
20. Rintoul L, Wentrup-Byrne E, Suzuki S, Grondahl L. FT-IR spectroscopy of fluoro-substituted hydroxyapatite: strengths and limitations. *J Mater Sci Mater Med* 2007;**18**:1701–9.
21. Wei M, Evans JH, Bostrom T, Gröndahl L: Synthesis and characterization of hydroxyapatite, fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2003;**14**:311-20.
22. Vogel GL, Zhang Z, Carey CM, Ly A, Chow LC, Proskin HM: Composition of plaque and saliva following use of an α -tricalcium-phosphate-containing chewing gum and a subsequent challenge. *J Dent Res* 2000;**79**:58-62.
23. Fiske CH, Subarrow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;**66**:375-400.
24. Campos, GM. GMC 2002 [computer program]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia; 2003. Available from: URL: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmv/gmc.html#gmc>.
25. ten Cate JM. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Res* 2004;**38**:254-7.
26. Antonakosa A, Liarokapisa E, Leventouri T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 2007;**28**:3043-54.
27. Coates J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons; 2000. p. 10815-37.

28. Vignoles M, Bonel G, Holcomb DW, Young RA. Influence of preparation conditions on the composition of Type-B carbonated hydroxyapatite and on the localization of the carbonate ions. *Calcif Tissue Int* 1988;**43**:33-40.
29. Gibson IR, Rehman I, Best SM, Bonfield W. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to b-tricalciumphosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2000;**12**:799-804.
30. Jha LJ, Best SM, Knowles JC, Rehman I, Santos JD, Bonfield W. Preparation and characterization of fluoride-substituted apatites. *J Mater Sci Mater Med* 1997;**8**:185-91.
31. Sundaram CS, Viswanathan N, Meenakshi S. Defluoridation chemistry of synthetic hydroxyapatite at nano scale: equilibrium and kinetic studies. *J Hazard Mater* 2008;**30**:206-15.
32. Barinov SM, Rau JV, Cesaro SN, Durisin J, Fadeeva IV, Ferro D, Medvecky L, Trionfetti G. Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range. *J Mater Sci Mater Med* 2006;**17**:597–604.
33. Wopenka B, Pasteris JD. A Mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater Sci Engin* 2005;**25**:131-43.
34. Katz JL, Reick MR, Herzog RE, Parsieglia KI: Calcite growth inhibition by iron. *Langmuir* 1993;**9**:1423-30.
35. Sutter B, Ming DW, Clearfield A, Hossner LR. Mineralogical and chemical characterization of iron-, manganese-, and copper-containing synthetic hydroxyapatites. *Soil Sci Soc Am J* 2003;**67**:1935-42.
36. Rodríguez-Lorenzo LM, Hart JN, Gross KA. Influence of fluorine in the synthesis of apatites. Synthesis of solid solutions of hydroxy-fluorapatite. *Biomaterials* 2003;**24**:3777–85.

Figuras

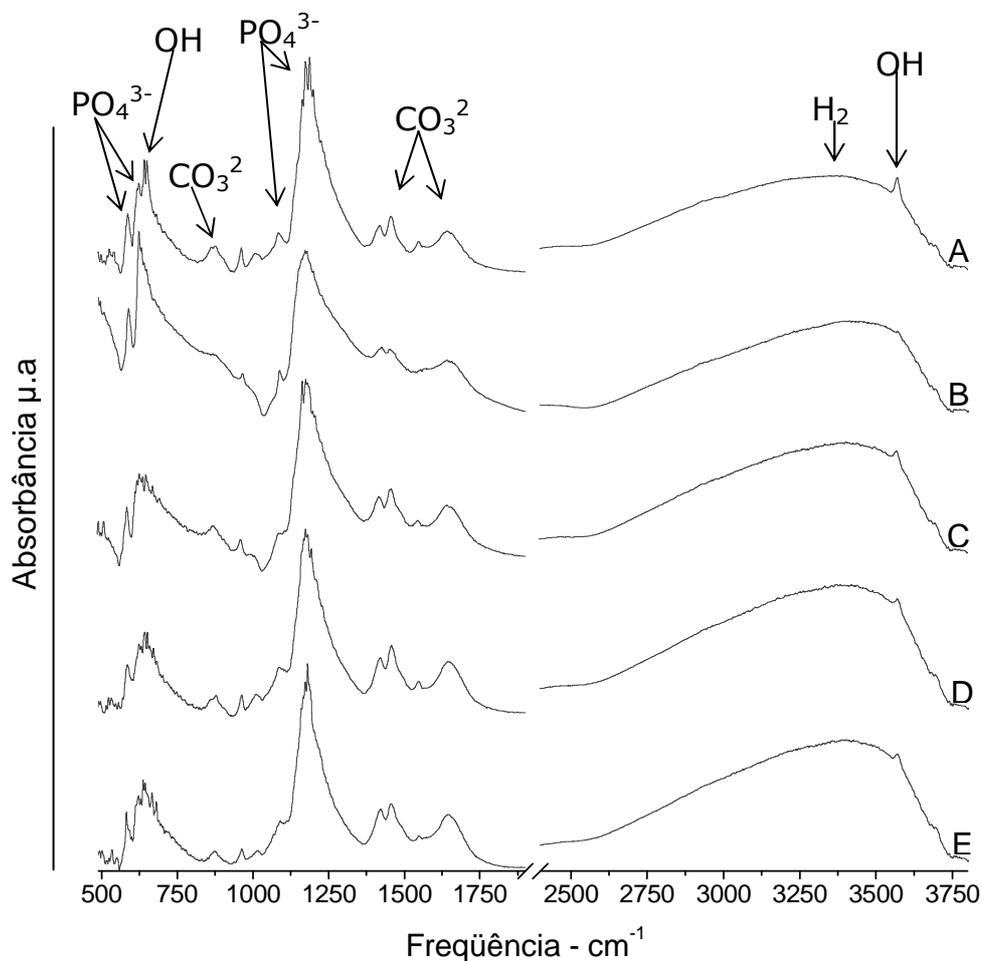


Figura 1 – Representação gráfica do espectro obtido após análise por meio de espectroscopia no infravermelho transformada por Fourier de acordo com os grupos após ciclagem de pH. A: HA_{desm}. B: F 1100. C: Fe 0,84. D: Fe 18. E: Fe 70.

Tabelas

Tabela 1 – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais dos fosfatos e hidroxila em relação à hidroxiapatita submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HA_{desm})

Frequência cm ⁻¹	Grupo funcional	Grupos*			
		F 1100	Fe 0,84	Fe 18	Fe 70
582-590	PO ₄ ³⁻ - ν ₂	+73	+10	-11	-3
623-629	PO ₄ ³⁻ - ν ₄	+104	+11	-16	-18
631-650	OH ⁻	-82	-32	-9	+9
1086-1093	PO ₄ ³⁻ - ν ₁	+69	-94	-77	-86
1173-1188	PO ₄ ³⁻ - ν ₃	-25	-11	-14	-4
3570	OH ⁻	-93	-58	-72	-68

Tabela 2 – Variação da intensidade (%) dos grupos funcionais de carbonatos e H₂O em relação à hidroxiapatita submetida à ciclagem de pH sem tratamento (HA_{desm})

Frequência cm ⁻¹	Grupo funcional	Grupos			
		F 1100	Fe 0,84	Fe 18	Fe 70
866-879	CO ₃ ²⁻ - ν ₂	-93	-39	-10	-36
1419-1425		-53	+19	+70	+65
1452-1460	CO ₃ ²⁻ - ν ₃	-72	+8	+61	+35
1641-1647		-44	+30	+68	+43
3371-3415	H ₂ O	-3	+34	+36	+31

Tabela 3 – Valores médios ($\pm dp$, $n=5$) das concentrações (mg/g) de fluoreto, ferro, cálcio e fósforo e proporção molar (Ca/P) de acordo com os grupos

Grupos	Análises (mg/g)				Ca/P
	Fluoreto	Ferro	Cálcio	Fósforo	
HA _{desm}	0,001 \pm 0,000 ^a	-0,29 \pm 0,07 ^a	252,0 \pm 25,4 ^a	170,6 \pm 22,7 ^a	1.15
F 1100	8,56 \pm 0,63 ^b	-0,33 \pm 0,13 ^a	321,4 \pm 40,3 ^b	140,9 \pm 9,2 ^b	1.77
Fe 0,84	0,008 \pm 0,002 ^c	1,62 \pm 0,52 ^b	240,8 \pm 50,0 ^a	140,7 \pm 26,7 ^b	1.32
Fe 18	0,017 \pm 0,002 ^d	6,44 \pm 0,51 ^c	276,4 \pm 35,2 ^{a,b}	159,1 \pm 7,7 ^{b,a}	1.36
Fe 70	0,010 \pm 0,001 ^c	11,88 \pm 0,69 ^d	261,3 \pm 22,6 ^{a,b}	159,6 \pm 7,3 ^{b,a}	1.27

Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos em cada análise (ANOVA: fluoreto – $p=0.0387$; ferro – $p<0,001$; cálcio – $p<0,001$; fósforo – $p=0,002$).

Anexos

ANEXO A

Referências

- 1- Browne D, Whelton H, O'Mullane D. Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent.* 2005;33:177-86.
- 2- ten Cate JM. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Res* 2004;38:254-7.
- 3- Mascarenhas AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent.* 2000;22:269-77.
- 4- Bergamaschi M. Validação do modelo de ciclagem de pH e avaliação da efetividade de dentifrícios suplementados com cálcio e fosfato e baixa concentração de flúor [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP; 2003.
- 5- Brighenti FL, Delbem AC, Buzalaf MA, Oliveira FA, Ribeiro DB, Sasaki KT. In vitro evaluation of acidified toothpastes with low fluoride content. *Caries Res* 2006;40:239-44.
- 6- Alves KM, Pessan JP, Brighenti FL, Franco KS, Oliveira FA, Buzalaf MA, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of the effectiveness of acidic fluoride dentifrices. *Caries Res* 2007;41:263-7.
- 7- Vilhena FV, Silva HM, Peres SH, Caldana Mde L, Buzalaf MA. The drop technique: a method to control the amount of fluoride dentifrice used by young children. *Oral Health Prev Dent* 2008;6:61-5.
- 8- Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 2009;43:50-6.
- 9- Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J* 1988;12:113-24.
- 10- Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res* 2001;80:466-9.

- 11-Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Res* 2005;39:123-9.
- 12-Martinhon CCR, Italiani FM, Padilha PM, Bijella MFTB, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed "in situ". *Arch Oral Biol* 2006;51:471-5.
- 13-Buzalaf MAR, De Moraes Italiani F, Kato MT, Martinhon CCR, Magalhaes AC. Effect of iron on inhibition of acid demineralisation of bovine dental enamel *in vitro*. *Arch Oral Biol* 2006;51:844-8.
- 14-Sales-Peres SHC, Pessan JP, Buzalaf MAR. Effect of an iron mouthrinse on enamel and dentine erosion subjected or not to abrasion: an *in situ/ex vivo* study. *Arch Oral Biol* 2007;52:128-32.
- 15-Oppermann RV, Rölla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogeny of dental plaque *in vivo*. *Caries Res* 1980;14:422-7.
- 16-Rosalen, PL., Pearson, SK., Bowen, WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Arch Oral Biol* 1996;41:1003-10.
- 17- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. *Caries Res* 1997;31:238-43.
- 18-Lynch SR, The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:333-46.
- 19-Bowen WH. Are current models for preventive programs sufficient to the needs for tomorrow? *Adv Dent Res* 1995;9:77-81.
- 20-Bachra BN, Van Harskamp GA. The effect of polyvalent ions on the stability of a buffer system for calcification *in vitro*. *Calcif Tissue Res* 1970;4:358-65.
- 21-Rao SVC. Preparation of solid solutions of calcium and iron hydroxylapatites. *J Inst Chem Calcutta* 1974;46:30-1.

- 22-Okasaki M, Takahashi J, Kimura H. Iron uptake of hydroxyapatite. *J Osaka Univ Dent Sch* 1985;25:17-24.
- 23-Takuma S, Ogiwara H, Suzuki H. Electron-probe and electron microscope studies of carious dentinal lesions with a remineralized surface layer. *Caries Res* 1975;9:278-85.
- 24-Driessens FC, Theuns HM, Heijligers HJ, Borggreven JM. Microradiography and electron microprobe analysis of some natural white and brown spot enamel lesions with and without laminations. *Caries Res* 1986;20:398-405.

ANEXO B

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY – GUIDE FOR AUTHORS

Submissions

Authors are requested to submit their original manuscript and figures online via Editorial Manager [replace with EES]. Editorial Manager [replace with EES] is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Please register at: <http://ees.elsevier.com/aob>

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland and Professor P M Speight

c/o Libby Calvert, Administrative Editor, *Archives of Oral Biology*, Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK. Tel: +44 (0)1865 843418; fax: +44 (0)1865 843992; Email: AOB@elsevier.com.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Each manuscript must be accompanied by a statement signed by the corresponding author that the manuscript in its submitted form has been read and approved by all authors. Authors should supply details of related papers submitted or recently published elsewhere.

If the manuscript reports experiments or observations using animals or human subjects a statement must be included in the letter of submission indicating that the protocol has been examined and approved by an institutional review board.

Authors are invited to suggest upto three referees they consider suitable to review their submission. Full postal and Email addresses should be included. The editors may or may not, at their discretion, utilise these suggestions.

Scientific Standards

The aim of Editors and referees is to maintain a high standard of scientific communication. Normally papers are assessed by two referees selected by the Editor, and decisions regarding acceptance are based mainly upon the advice of the referees. Where appropriate, the referees' views are forwarded to the authors for their consideration. Authors may occasionally consider referees' suggestions to be ill-conceived but if their text is misunderstood by referees it is likely to be misunderstood by readers of the journal.

Types of Contributions

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Manuscript Preparation

Papers should be as concise as possible and, in view of the international character of the journal, English usages that may present difficulties to readers whose first language is not English should be avoided. The spellings used can be in English or American, but must be consistent within the manuscript. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the author is stating what is known or concluded. Original papers should follow the pattern of: Introduction, Materials and Methods, Results or Findings, Discussion.

Authors will gain much assistance by consulting: Edward J. Huth, *Scientific Style and Format* (Sixth Edition). The Council of Biology Editors Manual for Authors, Editors and Publishers, Cambridge.

Editors reserve the right to revise the wording of papers in the interest of the Journal's standards of clarity and conciseness.

General

Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. For hardcopy submissions, good quality printouts are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal.

Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

Text

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgments, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Title page

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from keywords in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic or histochemical etc. A "running title" with not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstracts

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995;273: 27- 34). In brief, the abstract should be divided into sections including the following: (1) Objective; (2) Design -if clinical to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Received/Accepted Dates

A received date will be added to all papers when they are received by the Accepting Editor. An accepted date will also be added when the papers are received at the publishing office.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal experiments were humane; for instance, the mode of anaesthesia and of killing should be specified. In human experimentation, authors should state briefly that the subjects gave informed consent, and preferably that the work was approved by an appropriate ethics committee or review board.

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

It is usually necessary to analyze numerical results statistically. A statement of the number, their mean value and some appropriate measure of their variability is usually sufficient. The method of analysis followed should be indicated. A statement that the difference between the mean values of two groups of data is statistically significant should give the probability level set as significant by the investigator and indicate the statistical test used. It is not sufficient to quote the use of a statistical package without naming the tests used.

Discussion

This section presents the inferences drawn from the Results: these should be recapitulated only sparingly, sufficient to make the argument clear.

Acknowledgments

As appropriate.

References:

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to British Standard 4148: 1975 (or left in full), year, volume, and first and last pages.

For example:

1. Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. *Arch Oral Biol* 2002; **47**: 423-427.
2. For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

2. Gorlin RJ, Pindborg JJ, Cohen MM Jr. *Syndromes of the Head and Neck*, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill, 1976.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Units and Symbols

In general, *Archives of Oral Biology* will use the recommended SI (Système Internationale) units and symbols. The use of the litre, usually better written in full, in place of SI dm³ and ml³ in place of SI cm, will continue to be accepted. For details of the SI symbols, authors are referred to: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology Editors Style Manual (1978) 4th edn, published by Council of Biology Editors Inc. Units of enzyme activity must be clearly defined, preferably using SI units. Centrifugal force should be stated in multiples of g, rather than as rev/min.

Units and abbreviations

As *Archives of Oral Biology* is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below should be avoided if possible. Examples of abbreviations which maybe used without definition:

ADP,

AMP,

ATP

DEAE-cellulose

DNA, RNA

EDTA

EMG

tris

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page.

Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Bacterial nomenclature. Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and underlined to denote italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case roman not underlined, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to underline e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case roman e.g. 'meningococcus'.

Numbers, measurements and statistics. Numbers one to nine are spelled unless they are measurements (e.g. 5 mL). Numbers greater than nine are spelled out if they begin in a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 ml/h rather than -1 or per.

Abbreviations. Use capitals for: MIC, MBC, WBC, RBC, DNA, RNA, Group A, B etc. for antigenic or other groups, PHLS, CDSC, CDC, WHO, CSF, MSU, EMU, CSU. Use cfu, pfu, mm, m, min, h, in, ft, g, kg, mL, L, im, iv, iu, P(probability). Use sp. and spp. (species, singular and plural). Use Gram's stain and Gram-negative bacillus. Use in-vitro (adjective) but in vitro (adverb), post-mortem (adjective) but post mortem (adverb). Spelling. Use British spellings: Haemophilus, haematology, paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology; but note neutropenia, fetal. Please note the journal uses UK 'z' spelling (e.g., colonizes).

Drugs. These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary.

Proprietary Names

So far as possible, proper names should be used instead of proprietary names. Where it is desirable to indicate a particular brand of preparations, the proprietary name and source should be given in parentheses after the proper name, e.g. Testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, 327 Farm Road, London E23).

Illustrations

In the initial online submission and review stage, authors are required to provide electronic versions of their illustrations. When an article has been accepted, authors must be prepared to provide all illustrations in electronic and camera-ready format, (suitable for reproduction, which may include reduction, without retouching).

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on www.elsevier.com/arkworkinstructions. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

General: Information relating to the preferred formats for Artwork and Illustrations may be found at www.elsevier.com/authors. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All hard copy illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Line drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome.

Please note that if figures are supplied in colour, they will automatically be available online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Acceptance

After acceptance, authors **may** be requested to provide Elsevier with hard-copy and electronic versions of their manuscript and their figures. The electronic copy, on floppy disk, CD-ROM or ZIP, should match the hardcopy exactly, therefore always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from www.elsevier.com/authors

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from www.elsevier.com/authors.

Hardcopy submissions

Authors should submit an electronic copy of their paper with the final version of the manuscript. The electronic copy should match the hardcopy exactly. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from Author Services at Elsevier.

Proofs

Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multiauthored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be possible, so please ensure that your first communication is complete. Should you choose to mail your corrections, please return them to: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon EX1 2AH, UK.

Offprints

Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders placed late (after publication) for reprints will incur a 50% surcharge.

Copyright

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does

not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit www.elsevier.com/authors. This website provides information on article submission as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

ANEXO C

JOURNAL OF DENTISTRY – GUIDE FOR AUTHORS

Submissions

The requirements for submission are in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals," *Annals of Internal Medicine*, 1977, **126**, 36-47.

Authors are requested to submit their original manuscript and figures via the online submission and editorial system for Journal of Dentistry. Using this online system, authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process. Please register at: <http://ees.elsevier.com/jiod>

Authors unable to submit online should contact the Editorial office: Marie Dymond, Journal Manager, Journal of Dentistry, Elsevier, Bampfylde Street, Exeter, UK, EX1 2AH. JOD@elsevier.com TEL: +44 (0)1392 285809 Fax: +44 (0)1865 853132.

Contributions falling into the following categories will be considered for publication:

- Original Research Reports: maximum length 6 printed pages approximately 20 typescript pages, including illustrations and tables.
- Review articles: maximum length 10 printed pages, approximately 33 typescript pages, including illustrations and tables.
- Short communication for rapid publication: maximum length 2 printed pages, approximately 7 typescript pages, including illustrations.
- Letters providing informed comment and constructive criticism of material previously published in the Journal.
- Authors are urged to write as concisely as possible.

Articles should be arranged in the following order. *Title, Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Tables and Legends to Illustrations.*

Summary: should not exceed 250 words and should be presented under the following subheadings: Objectives, Methods; Results; Conclusions (For Reviews: Objectives; Data; Sources; Study selection; Conclusions). These subheadings should appear in the text of the summary. Please repeat the title of the article at the top of the abstract page.

Introduction: must be presented in a structured format, covering the following subjects, although not under subheadings: succinct statements of the issue in question; the essence of existing knowledge and understanding pertinent to the issue; and the aims and objectives of the research being reported.

Keywords: up to 10 keywords should be supplied.

Abbreviations and acronyms: terms and names to be referred to in the form of abbreviations or acronyms must be given in full when first mentioned.

Units: SI units should be used throughout. If non-SI units must be quoted, the SI equivalent must immediately follow in parentheses.

The complete names of individual teeth must be given in the text. In tables and legends for illustrations individual teeth should be identified using the FDI two-digit system.

Illustrations: The following are acceptable ways to present illustrations: white card or plastic; high quality computer generated line drawings; unmounted glossy photographs.

Illustrations should be clearly labeled on the back with the title of the article, the figure number and an arrow to indicate the top edge.

When preparing illustrations authors should consider that the majority of illustrations will be reduced to the width of a single column (approximately 85 mm). Authors can indicate if they feel an illustration should be full page width.

All typescripts must be accompanied by a Permission Note. This is a letter signed by each author (not just the corresponding author), affirming that the paper has been submitted solely to *Journal of Dentistry* and that it is not concurrently under consideration for publication in another journal. All of the named authors should have been involved in the work leading to the publication of the paper and should have read the paper before it is submitted for publication.

Offprints and page charges: no page charges are levied on articles published in *Journal of Dentistry*. The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Authors will also have the opportunity to order additional paper copies.

The Editor and Publisher reserve the right to make such corrections to typescripts as may be necessary for clarity of expression, or to conform to the style required.

Notes for Typescript Preparation

- Three copies of the manuscript should be submitted: each accompanied by a set of illustrations.
- Scripts should be typed on one side of A4, double-line spaced with margins of 30 mm.
- A disk should be submitted initially with the manuscript. The file on disk should exactly match the printed version of the manuscript. Please refer to www.elsevier.com/locate/disksub for guidelines for the submission of manuscripts on disk.
- Authors are encouraged to submit electronic artwork files with the original printed illustrations. Please refer to www.elsevier.com/artworkinstructions for guidelines for the preparation of electronic artwork files.
- To facilitate anonymity the authors' names and any reference to their addresses should only appear on the title page.

The title page should contain the following information:

- Title of paper
- Short title
- Name(s) and address(es) of author(s)
- Name, address, telephone, fax and e-mail of the corresponding author
- Up to 10 keywords

Spelling: Either the *Oxford English Dictionary* or *Websters* should be followed for each manuscript. Spelling should be consistent within any one submission.

Legends to illustrations should be typed on a separate sheet.

References: These should appear in the text in numerical order and should follow the Vancouver Reference system (details may be found at <http://www.icmje.org/index.html#reference>). Please note that the house style of the *Journal of Dentistry* includes:

- to refer to the name of the Journal in full
- to put the name of the Journal in Italics
- to put the volume number in bold

Examples as follows

Burrow, MF, Tagami J, Negishi T. Early tensile bond strengths of several enamel and dentin bonding systems. *Journal of Dental Research* 1994; **74**:522-28. Phillips SJ, Whisnant JP. The role of dentine under restorations. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. *The science of restorative dentistry*. 2nd ed. Oxford: Elsevier; 2003. p.266-78.

If there are seven or more authors please list the first six and et al., otherwise list all authors. Journal titles should be given in full.

Disk Submission: Disks must be submitted initially with the manuscript. The Editor will request

revised disks from authors at the appropriate time. Further information on disk submission and electronic artwork preparation is available at www.elsevier.com/authors

Proofs: Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multi-authored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be possible, so please ensure that your first communication is complete

Should you choose to mail your corrections, please return them to: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon EX1 2AH, UK

ANEXO D

PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE BOVINO (4X4mm)



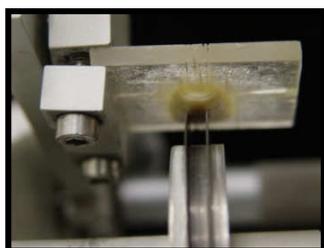
1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz por meio de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água deionizada).



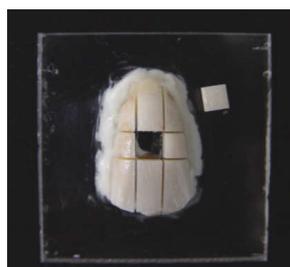
2. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



3. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



4. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond- n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Em seguida, foi realizado o corte no sentido transversal.



5. Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário.

ANEXO E

PREPARO E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Planificação da dentina e polimento do esmalte



1. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.

2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz BUEHLER modelo Phoenix Beta AROTEC e lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), durante 30 segundos sob refrigeração.



3. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual será polida.

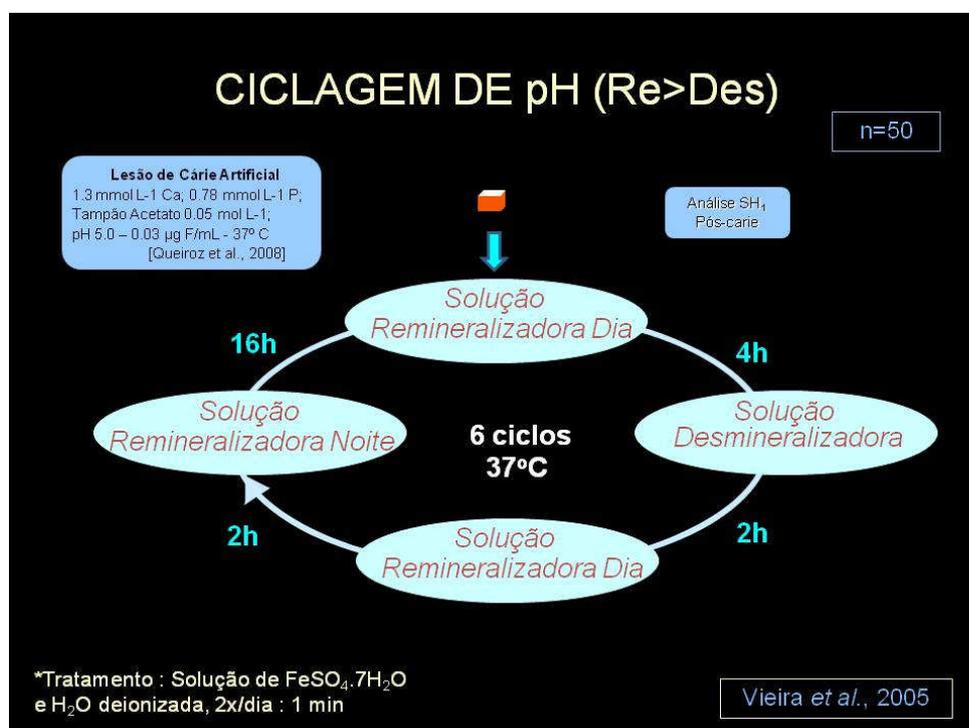
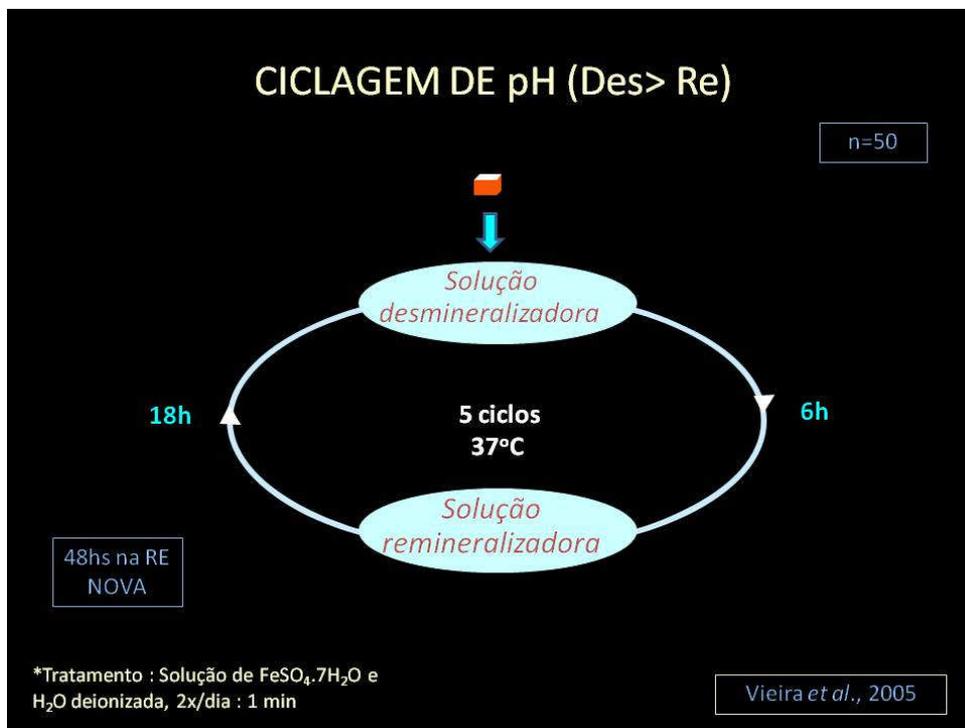
Seqüência do polimento de esmalte:

1. Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
2. Na Politriz Politriz BUEHLER modelo Phoenix Beta- lixa de granulação 600, 800 e 1200 (30 segundos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/ deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
3. Na Politriz Politriz BUEHLER modelo Phoenix Beta - acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) (1 minuto – 2 pesos) e suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
4. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) diluída 20:1 em água destilada/ deionizada (2 minutos);
5. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/ deionizada.

Karina Mirela Ribeiro Pinto Alves

ANEXO F

ESQUEMA DAS CICLAGENS DE pH NA DESMINERALIZAÇÃO (DES>RE) E REMINERALIZAÇÃO (RE>DES) DO ESMALTE BOVINO



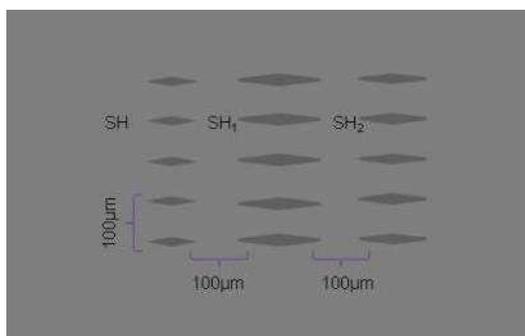
ANEXO G

ANÁLISE DA DUREZA DO ESMALTE E DISPOSITIVO PALATINO



1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMSWIN (NewAge Industries, USA).

2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da dureza de superfície.



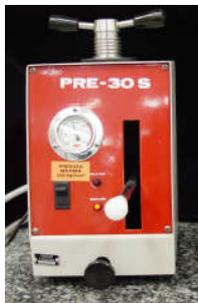
3. Esquema das impressões para análise de microdureza de superfície inicial (SH-inicial), pós-desmineralização (SH₁-lesão) e final (SH₂-final) (Aumento: 100x).



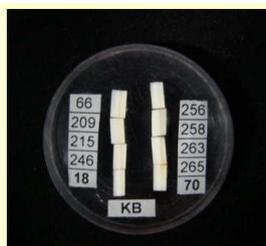
4. Dispositivo palatino, contendo quatro blocos de esmalte bovino desmineralizados artificialmente.

ANEXO H

DUREZA EM SEÇÃO LONGITUDINAL



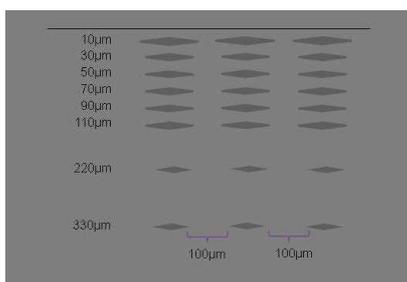
1. Embutidora metalográfica (AROTEC PRE 30S) – utilizada para inclusão dos blocos de esmalte em 5 gramas de resina acrílica (Buehler Transoptic Powder, Lake Bluff, Illinois, USA), pressão de 150 Kgf/cm², tempo de aquecimento de 7 minutos e mais 7 minutos de resfriamento. Os blocos foram fixados em posição com cola adesiva (Super Bonder – Loctite).



2. Corpo de prova – plano longitudinal voltado para a superfície da resina acrílica.



3. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA).



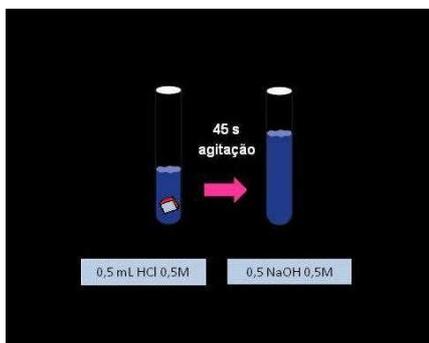
4. Fotomicrografia das impressões para análise da dureza de secção longitudinal nas diferentes distâncias. (Aumento: 100x).

Seqüência do polimento de esmalte:

1. Na Politriz APL-4 AROTEC - lixa de granulação 320 (1 minuto – 2 pesos), 600, 800 e 1200 (2 minutos – 2 pesos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/ deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
2. Na Politriz APL-4 AROTEC - acabamento final com disco de papel feltro MICROCLOTH SUPREME PSA (Buehler Polishing Cloth) (2 minutos – 2 pesos) e suspensão de diamante 1/4 micron base-água (Buehler);
3. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) diluída 20:1 em água deionizada (3 minutos);
4. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

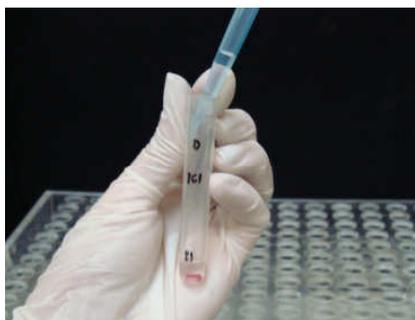
ANEXO I

ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR, CÁLCIO, FÓSFORO E FERRO NO ESMALTE



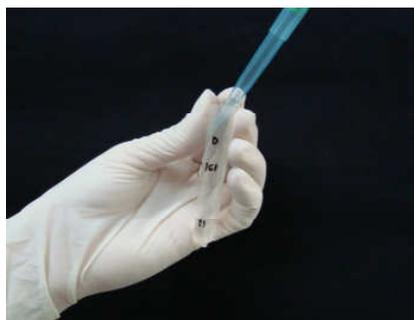
1. Esquema representativo da biópsia ácida para determinar a concentração de flúor (F), cálcio (Ca), fósforo (P) e ferro (Fe) no esmalte.

2. Metade do bloco de esmalte foi imersa em 0,5 mL HCl 0,5 mol L⁻¹.



3. A camada de esmalte (50 µm) foi removida pela imersão da metade do bloco de esmalte em 0,5 mL HCl 0,5 mol L⁻¹ durante 45 segundos, sob agitação em mesa agitadora Tecnal (modelo TE - 141 Orbital).

4. A solução resultante foi neutralizada pela adição de 0,5 mL NaOH 0,5 mol L⁻¹. Após a biópsia ácida determinou-se a concentração de F, Ca, Fe e P.



ANEXO J**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****unesp**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

ACBD/bri

PROCESSO Nº: 2008-02380

INTERESSADO(A).....: ALBERTO CARLOS BOTAZZO DELBEM

DESPACHO.....: 015/2008

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba –UNESP–, reunido em 13/11/2008, APROVOU o parecer da Profª.ALESSANDRA MARCONDES ARANEGA, favorável ao desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado: “EFEITO DA APLICAÇÃO DE SOLUÇÃO DE SULFATO FERROSO NA REMINERALIZAÇÃO DE LESÃO DE CÁRIE: ESTUDO “IN SITU””.

Na oportunidade, informamos que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatório parcial em 13/11/2009 e o relatório final em 13/11/2010.



Prof. Dr. Alessandra Marcondes Aranega
Vice-Coordenadora do CEP

Ciente.De acordo.

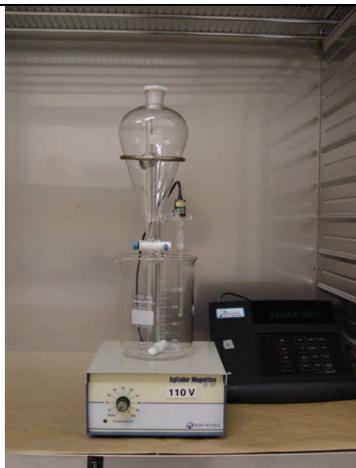


Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária –
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 620-3203 E-mail: diretor@foa.unesp.br

ANEXO K

SÍNTESE e CICLAGEM DE Ph DA HIDROXIAPATITA



1. A solução de fosfato de amônio dibásico foi adicionada à solução de nitrato de cálcio lentamente (2 a 5 mL/minuto), por meio de um funil de separação sob agitação constante, a 37° C.

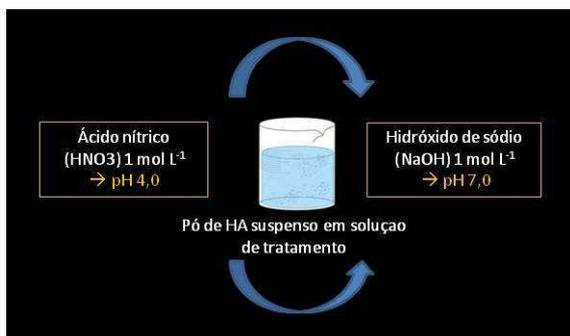
2. Os precipitados foram separados por filtração, utilizando funil de Buchner acoplado a um sistema de vácuo (-600 mm Hg).



3. Gral e pistilo de ágata utilizado para triturar os grãos de hidroxiapatita

4. Peneiras granulométricas para obtenção de grãos de 53 µm





5. Esquema da ciclagem de pH realizada com 0,5 g de pó de HA sintetizada e 100 mL das soluções de tratamento (água deionizada, 1100 NaF e 0,840 µg Fe/mL, 18,0 µg Fe/mL e 70,0 µg Fe/mL).

5. Béquer contendo pó de hidroxiapatita e solução de tratamento sob agitação constante, a 37° C, utilizado na ciclagem de pH.



ANEXO L

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER

(FTIR)

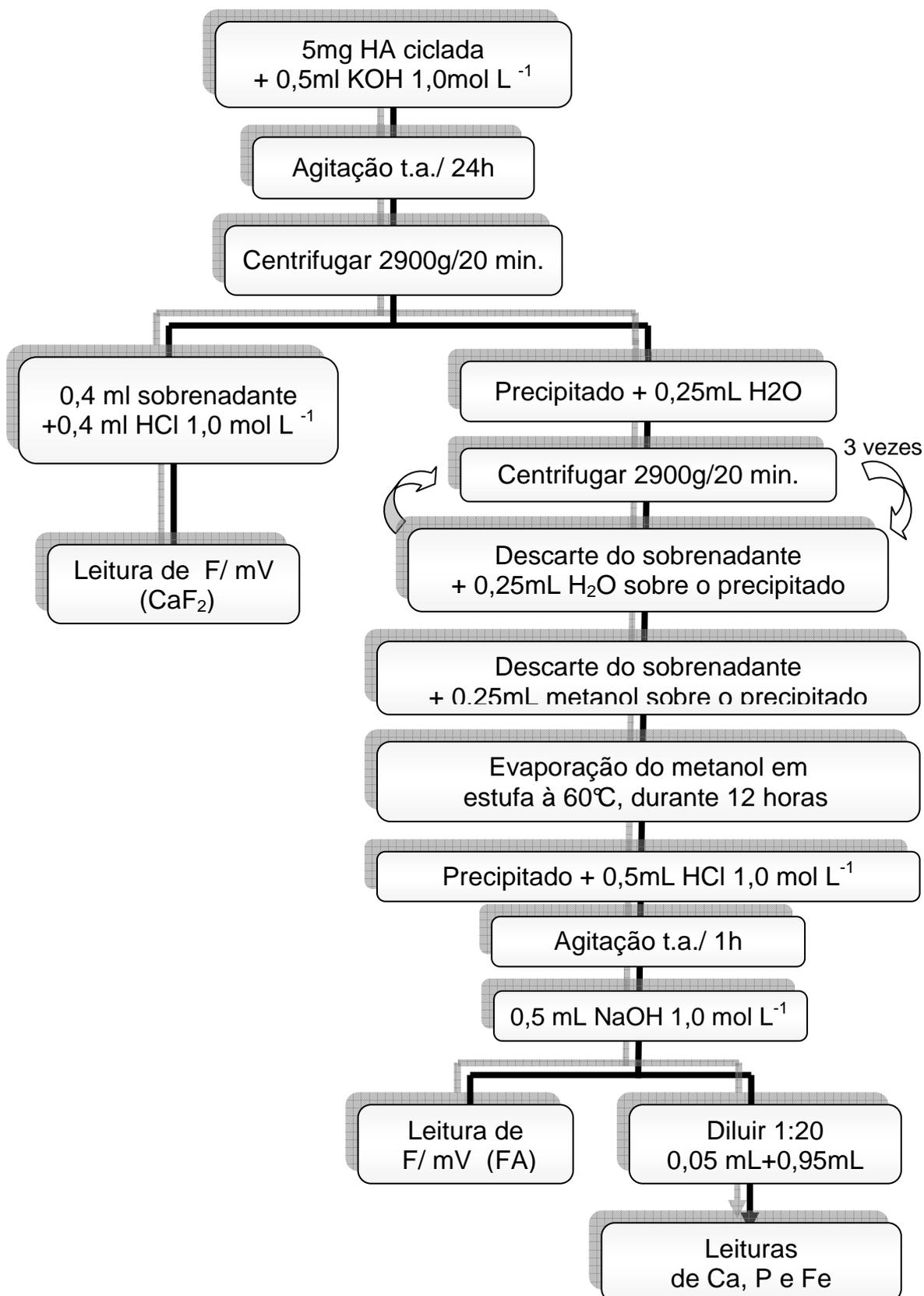


1. Espectrofotômetro modelo Magna 760 (Nicolet, Madison, USA)
-

2. Amostras da hidroxiapatita acondicionadas em porta-amostra para a análise de FTIR



3. Porta-amostra para a análise de FTIR acoplado ao espectrofotômetro
-

ANEXO M**ANÁLISE DE FLÚOR, CÁLCIO FERRO E FÓSFORO NA HIDROXIAPATITA**

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](#)