

Efeito da nano-hidroxiapatita nas lesões de mancha branca artificiais após tratamento clareador com peróxido de carbamida a 10%

Amanda Cristina Brezolini da Freiria*, Mariangela Ivette Guanipa Ortiz, Danielle Ferreira Sobral de Souza, Simone Gomes de Oliveira, Flávio Henrique Baggio de Aguiar, Débora Alves Nunes Leite Lima

Departamento de Odontologia Restauradora, Área de dentística, Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil

Palavras-Chave: Hidroxiapatitas; Cárie Dentária; Clareamento Dental

INTRODUÇÃO

Lesões de mancha branca (LMB) são frequentemente diagnosticadas após a remoção de aparelhos ortodônticos devido à dificuldade de higienização que ocorre durante este tratamento. As LMB representam os sinais iniciais de formação de cárie de esmalte incipiente e caracterizam-se por ter uma camada superficial aparentemente intacta e uma camada inferior desmineralizada (Horuztepe, 2017; Freitas, 2018). Essa característica resulta em uma alteração no índice de reflexão da luz quando comparado às superfícies hígidas circundantes, explicando a aparência esbranquiçada e mais opaca dessas lesões (Zezell, 2007; Khoroushi, 2017; Heymann, 2013; Andrade Neto, 2016; Al-Obaidi, 2018).

Em alguns casos, as LMB desenvolvidas durante a terapia ortodôntica desaparecem após a remoção do aparelho fixo graças à remineralização natural da saliva e/ou ação abrasiva da escovação (Hochli, 2017, Philip, 2019). No entanto, a maioria delas perdura como lesões permanentes, causando alterações estéticas e funcionais (Choi, 2018; Lee, 2020). Dessa forma, diversos métodos vêm sendo propostos para o manejo das LMB com o objetivo de melhorar sua aparência física e reforçar sua sub-estrutura fragilizada de maneira não invasiva (Kim, 2016).

Com a finalidade estética de mascarar-las, o uso de agentes clareadores com peróxidos de baixa (Berger, 2012; Kim, 2016; Choi, 2018) e alta concentração (Horuztepe, 2017; Choi, 2018) tem sido estudado e tem se mostrado um tratamento efetivo para reduzir o contraste entre as LMB e a superfície do esmalte sadia, sem uma deterioração significativa das propriedades químicas e mecânicas da sub-superfície da lesão (Berger, 2012; Kim, 2016).

Por outro lado, abordagens com materiais biomiméticos, como a nano-hidroxiapatita (nano-HA), têm sido empregadas na remineralização de LMB (Manchery, 2019). A nano-HA é altamente biocompatível pela sua similaridade estrutural ao cristal de apatita (Vyavhare, 2015; Memarpour, 2019; Philip, 2019) e vem sendo incorporada em dentifrícios, enxaguantes e produtos de aplicação clínica com o propósito de restaurar a integridade do esmalte alterado pela LMB (Carrouel, 2020; Kamath, 2020).

Apesar dos resultados promissores da nano-Ha como agente remineralizante (Carrouel, 2020), pouco tem sido estudado com respeito a seus efeitos nas propriedades óticas das LMB e, até onde se sabe, a sua associação com o clareamento dental para o tratamento dessas lesões simuladas *in vitro* ainda não foi avaliada. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação do clareamento dental caseiro e a nano-hidroxiapatita na aparência estética e microdureza de lesões de mancha branca artificiais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Blocos de esmalte/dentina de 5 x 5 x 2,2mm (1,2mm de esmalte e 1mm de dentina) foram obtidos do terço médio de incisivos bovinos. Foi realizada a retificação e polimento utilizando lixas de carbetto de silício (600,

1200, 2500 e 4000 grit), seguida do polimento final com feltro e pasta diamantada (1µm). Entre cada utilização da lixa e após o polimento final, os espécimes foram limpos em banho ultrassônico com água destilada por 15 minutos.

Após o preparo os espécimes tiveram sua microdureza inicial (SMH) avaliada usando um microdurômetro (FM 100, Future-Tech Corp; Kawasaki, Japão). Na região central de cada bloco foram realizadas três indentações (100 µm de espaçamento) com um indentador Knoop (25gf/5s). Sessenta espécimes com valores médios de microdureza inicial semelhantes foram selecionados e armazenados em umidade relativa até o início da fase experimental do projeto.

Em seguida, quarenta e oito espécimes foram submetidos à formação de LMB por meio de ciclos de pH (05 ciclos -), enquanto as demais permaneceram em ambiente úmido. Posteriormente, os espécimes foram aleatorizados em cinco grupos (n=12) conforme as condições experimentais: G1 – nano-HA (NanoP, FGM; Joinville, SC, Brasil); G2 – nano-HA + Peróxido de carbamida a 10% (Whiteness Perfect; FGM. Joinville, SC, Brasil); G3 – Peróxido de carbamida a 10%; G4 – controle negativo (LMB); G5 – controle positivo (hígido).

Para o protocolo clareador realizado em G2 e G3, 0,2g do gel de peróxido de carbamida (PC) a 10% foi aplicado sobre a superfície do esmalte da LMB com o auxílio de um microbrush. O agente clareador permaneceu na superfície por 04 horas diárias, após esse tempo o gel era removido e os espécimes voltavam para armazenamento em saliva artificial à 37°C. O protocolo clareador foi realizado durante um período total de 14 dias consecutivos.

O procedimento remineralizante foi realizado nos grupos G1 e G2 (nº G2 após o tratamento clareador) em dias intercalados (01, 03, 05, 07, 09, 11, 13), aplicando 0,2g da pasta NanoP na superfície do esmalte com o auxílio de um microbrush. A pasta era friccionada durante 10 segundos com taça de borracha acoplada a uma peça de mão de baixa velocidade e após isto permaneceu sobre a superfície do espécime por um período de 5 minutos. Em seguida, a pasta era removida e os espécimes voltavam para armazenamento em saliva artificial à 37°C.

Para as amostras dos grupos G4 e G5 houve apenas trocas diárias de saliva artificial.

Análise de Cor

As avaliações de cor foram executadas em três momentos: Inicial/antes da formação da LMB (inicial / t1); após a formação da LMB (LMB / t2); 24h após a conclusão do tratamento (final / t3). Para isto se utilizou um espectrofotômetro (Easy Shade; VITA, Bad Säckingen, Alemanha) para realizar três leituras de cor em posições distintas por espécime, determinando a média de cada um deles no tempo correspondente. A distribuição espectral da cor foi quantificada no sistema de espaço de cores CIE L*a*b*, para calcular a variação de L*, a* e b*. A mudança total da cor ($\Delta E / \Delta E_{00}$) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad [1]$$

$$\Delta E_{00} = [(\Delta L'/K_L S_L)^2 + (\Delta C'/K_C S_C)^2 + (\Delta H'/K_H S_H)^2 + R_T (\Delta C'/K_C S_C)(\Delta H'/K_H S_H)]^{1/2} \quad [2]$$

Análise de Microdureza Transversal (CSMH)

Depois da última avaliação da cor, os espécimes foram seccionados longitudinalmente e uma das metades de cada amostra foi introduzida em anéis de tubo de PVC de ¼ polegada confeccionados (04 metades por tubo), que, posteriormente foram embutidas em resina epóxi (EpoxiCure; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Para expor a superfície do esmalte das amostras, foi realizado o lixamento, polimento e banho ultrassônico como descrito previamente.

A avaliação da microdureza transversal foi feita com um microdurômetro com indentador Knoop (KHN) sob carga de 25g por 5 segundos em três colunas (100 µm de distância entre elas) foram realizadas dez indentações cada uma na área central do espécime, à 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µm da superfície do esmalte. As médias das três colunas a cada distância foram calculadas.

Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após as análises, duas amostras representativas de cada grupo foram selecionadas, preparadas e posteriormente fixadas com fita de carbono dupla face e submetidas à vácuo para revestimento com ouro, e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (JSM 5600LV; JEOL, Tokyo, Japão), usando um aumento de x4000. As áreas representativas de cada grupo foram fotografadas para comparação. Na **figura 01** encontra-se uma descrição gráfica das metodologias descritas nesta seção.

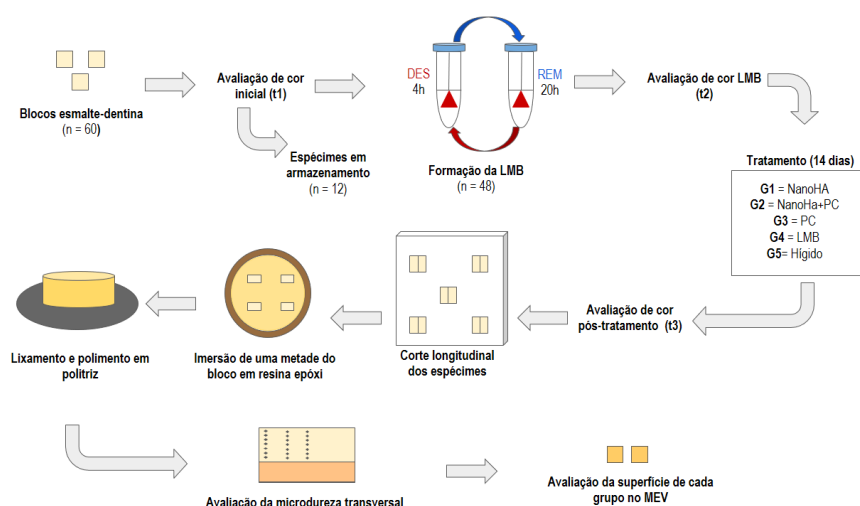


Figura 01. Descrição gráfica resumida do preparo, tratamento e análise das amostras do trabalho.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa R, considerando um nível de significância de 5%. Inicialmente foram realizadas análises descritivas e exploratórias dos dados. Os dados de valor L, valor a e valor b foram analisados por modelos lineares generalizados para medidas repetidas no tempo. ΔE e ΔE_{00} foram analisados por modelos lineares generalizados considerando o efeito de grupo. A microdureza transversal foi analisada por modelos lineares generalizados com os efeitos de grupo, distância e a interação entre eles.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de cor

Os resultados gerais demonstram que a formação da LMB artificial foi adequada em todos os grupos, com uma alteração superior ao nível de aceitabilidade clínica ($\Delta E > 2,7$; $\Delta E_{00} > 1,8$) (Paravina, 2019). A mudança na cor da LMB após o tratamento (**Tabela 01**) refletiu valores de ΔE e ΔE_{00} mais elevados em G2 e G3 do que nos demais grupos ($p < 0,05$). Este fato poderia ser justificado pela efetividade do tratamento clareador nesses grupos, com a consequente redução no seu valor de b^* ($p < 0,05$) (Choi, 2018). Ao contrastar os valores iniciais (esmalte hígido) e pós-tratamento, o ΔE e ΔE_{00} foram significativamente menores em G1 do que nos demais grupos de tratamento, o que estaria associado ao efeito remineralizante da nano-HA (Huang, 2011; Hammad, 2020), mas ainda considerados clinicamente perceptíveis ($\Delta E > 1,2$; $\Delta E_{00} > 0,8$) (Paravina, 2019). Após o tratamento, somente o G4 apresentou valores reduzidos de L^* ($p < 0,05$), demonstrando que a saliva artificial não conseguiu restaurar a luminosidade das amostras, e que todos os tratamentos foram efetivos em recuperar, ao menos parcialmente, esse fator tão importante na melhora da aparência clínica das LMB (Kannan, 2019).

Tabela 01. Variações na cor em função do grupo, nos diferentes intervalos de tempo

Variável	Grupo	Intervalos de tempo		
		LMB x Inicial	Pós-tratamento x LMB	Pós-tratamento x inicial
Média (desvio padrão)				
ΔE	G1	10,74 (3,26) a	7,82 (4,00) b	4,23 (2,98) b
	G2	11,65 (2,51) a	14,74 (3,72) a	8,94 (3,52) a
	G3	10,93 (2,97) a	12,06 (2,06) a	8,56 (2,08) a
	G4	12,28 (3,58) a	3,84 (1,58) c	10,09 (4,03) a
	p-valor	0,6377	<0,0001	0,0003
ΔE_{00}	G1	6,73 (2,17) a	4,56 (2,80) b	2,67 (1,87) c
	G2	7,31 (1,88) a	7,44 (2,39) a	4,39 (1,45) b
	G3	7,03 (2,05) a	6,22 (1,73) a	4,41 (1,11) b
	G4	7,74 (2,35) a	1,98 (1,08) c	6,49 (2,70) a
	p-valor	0,7069	<0,0001	0,0004

¹G1 – Nano-Ha (NanoP, FGM; Joinville, SC, Brasil); G2 – Nano-Ha + Peróxido de carbamida a 10% (Whiteness Perfect; FGM, Joinville, SC, Brasil); G3 – Peróxido de carbamida a 10%; G4 – Grupo controle de LMB (mantido em saliva artificial durante 14 dias). Letras distintas na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Análise de Microdureza Transversal (CSMH)

Os resultados de microdureza transversal podem ser observados na **figura 02**. Após o tratamento, somente o G2 (associação Nano-HA com clareamento) apresentou valores médios de microdureza similares ao G5 (grupo hígido) ($p > 0,05$). Observou-se também que, até os 100 μ m de profundidade, houve um aumento da microdureza ($p < 0,05$). A nano-HA tem demonstrado ser efetiva na remineralização superficial das LMB (Hammad, 2020), todavia num meio relativamente ácido este efeito é ainda mais acentuado, o que explicaria o motivo pelo qual a associação com o PC (pH \approx 6,08) (Ribeiro, 2006) permitiu que o efeito fosse maior na profundidade da lesão (Huang, 2011). O grupo tratado somente com nano-HA (G1) e com PC 10% (G3) foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Isto poderia ser justificado porque apenas a nano-HA, sem associação, não teria sido capaz de atingir as regiões mais profundas da lesão (Zhang, 2019; Hammad, 2020). Enquanto que o PC foi empregado em baixa concentração (10%) e contém fluoreto de sódio na sua formulação, o que poderia ter auxiliado na remineralização parcial da LMB (Cavalli, 2018), ainda, sem afetar o efeito clareador (Vieira, 2020), como observado nos resultados da avaliação de cor.

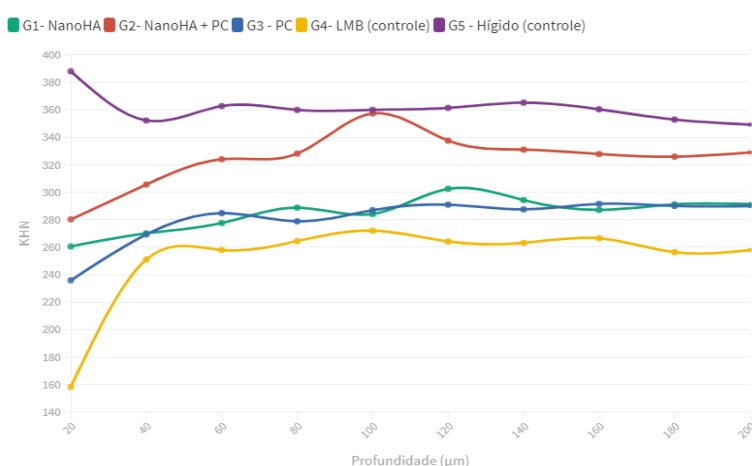


Figura 02. Distribuição dos valores médios de microdureza (CSMH) das amostras nas diferentes profundidades após o tratamento/armazenamento.

Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Condizendo com os resultados de espectrometria e microdureza, a análise qualitativa das imagens do MEV mostrou que o tratamento com nano-HA (**Fig. 03.a**) restaurou a superfície da LMB adequadamente e de forma próxima ao esmalte hígido (**Fig.03.e**). Quando associado com o clareamento (**Fig. 03.b**), se observaram também áreas de depósito mineral. Enquanto que, apenas o clareamento não gerou grandes alterações na superfície da LMB (provavelmente devido à baixa concentração deste agente) e até uma superfície mais restaurada pôde ser observada (**Fig. 03.c**), quando comparada à da LMB que não recebeu nenhum tipo de tratamento (**Fig. 03.d**).

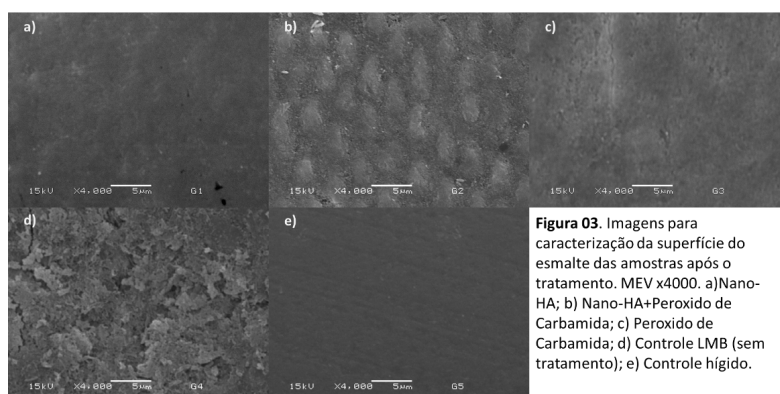


Figura 03. Imagens para caracterização da superfície do esmalte das amostras após o tratamento. MEV x4000. a) Nano-HA; b) Nano-HA+Peróxido de Carbamida; c) Peróxido de Carbamida; d) Controle LMB (sem tratamento); e) Controle hígido.

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados deste estudo *in vitro*, é possível concluir que a nano-HA é efetiva como remineralizante e consegue recuperar de forma satisfatória a cor das LMB. Porém, quando associada ao clareamento com peróxido de carbamida a 10%, seu efeito remineralizante na profundidade deste tipo de lesão aumenta expressivamente. Mais estudos sobre esta associação no tratamento de LMB devem ser realizados para determinar a qualidade do tratamento sob condições ainda mais próximas aos desafios próprios do meio oral.

REFERÊNCIAS

1. Al-Obaidi R1, Salehi H, Desoutter A, Tassery H, Cuisinier F. Formation and assessment of enamel subsurface lesions in vitro. J Oral Sci. 2019
2. Andrade Neto DM, Carvalho EV, Rodrigues EA, Feitosa VP, Sauro S, Mele G, et al. Novel hydroxyapatite nanorods improve anti-caries efficacy of enamel infiltrants. Dent Mater. 2016
3. Berger SB, Pavan S, Santos PH, Giannini M, Bedran-Russo AK. Effect of bleaching on sound enamel and with early artificial caries lesions using confocal laser microscopy. Braz. Dent. J. 2012
4. Carrouel F, Viennot S, Ottolenghi L, Gaillard C, Bourgeois D. Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care Cosmetics: A Review of the Current Situation. Nanomaterials (Basel). 2020
5. Cavalli V, Rosa DAD, Silva DPD, Kury M, Liporoni PCS, Soares LES, Martins AA. Effects of experimental bleaching agents on the mineral content of sound and demineralized enamels. J Appl Oral Sci. 26, 2018
6. Choi YY, Lee DY, Kim YJ. Colorimetric evaluation of white spot lesions following external bleaching with fluoridation: An in-vitro study. Korean J Orthod, 48:377-83, 2018
7. Freitas MCCA, Nunes LV, Comar LP, Rios D, Magalhães AC, Honório HM, Wang L. In vitro effect of a resin infiltrant on different artificial caries-like enamel lesions. Arch Oral Biol. 2018
8. Hammad SM, El-Wassefy NA, Alsayed MA. Evaluation of color changes of white spot lesions treated with three different treatment approaches: an in-vitro study. Dental Press J Orthod, 25:26-2, 2020
9. Heymann GC, Grauer D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. J Esthet Restor Dent. 2013
10. Horuztepe SA, Baseren M. Effect of resin infiltration on the color and microhardness of bleached white-spot lesions in bovine enamel (an in vitro study). J Esthet Restor Dent. 2017
11. Höchli D, Hersberger-Zurfluh M, Papageorgiou SN, Eliades T. Interventions for orthodontically induced white spot lesions: a systematic review and meta-analysis. Eur J Orthod. 2017
12. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. Caries Res, 45:460-8, 2011
13. Kamath P, Nayak R, Kamath SU, Pai D. A comparative evaluation of the remineralization potential of three commercially available remineralizing agents on white spot lesions in primary teeth: An in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2017
14. Kannan A, Padmanabhan S. Comparative evaluation of Icon® resin infiltration and Clinpro™ XT varnish on colour and fluorescence changes of white spot lesions: a randomized controlled trial. Prog Orthod, 20:31, 2019
15. Khoroushi M, Kachuie M. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. Contemp Clin Dent. 2017
16. Kim Y, Son HH, Yi K, Ahn JS, Chang J. Bleaching Effects on Color, Chemical, and Mechanical Properties of White Spot Lesions. Oper Dent. 2016
17. Lee J, Okoye LO, Lima PP, Gakunga PT, Amaechi BT. Investigation of the esthetic outcomes of white spot lesion treatments. Niger J Clin Pract. 2020
18. Manchery N, John J, Nagappan N, Subbiah GK, Premnath P. Remineralization potential of dentifrice containing nanohydroxyapatite on artificial carious lesions of enamel: A comparative *in vitro* study. Dent Res J (Isfahan). 2019
19. Memarpour M, Shafiei F, Rafiee A, Soltani M, Dashti MH. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on enamel remineralization and estimation of fissure sealant bond strength to remineralized tooth surfaces: an in vitro study. BMC Oral Health. 2019
20. Ribeiro JC, Moysés MR, Dias SC, Gomes PN, Reis AC, Ribeiro JGR. Avaliação do pH de agentes clareadores. Arquivos em Odontologia, 42, 2006
21. Paravina R, Pérez M, Ghinea R. Acceptability and perceptibility thresholds in dentistry: A comprehensive review of clinical and research applications. J Esthet Restor Dent, 31:103-12, 2019
22. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. Caries Res. 2019
23. Vyavhare S, Sharma DS, Kulkarni VK. Effect of three different pastes on remineralization of initial enamel lesion: an in vitro study. J Clin Pediatr Dent. 2015
24. Vieira I, Vieira WF, Pauli MC, Theobaldo JD, Aguiar FH, Lima DA, Leonardi GR. Effect of in-office bleaching gels with calcium or fluoride on color, roughness, and enamel microhardness. J Clin Exp Dent, 12:116-22, 2020
25. Zezell DM, Ribeiro AC, Bachmann L, Gomes AS, Rousseau C, Girkin J. Characterization of natural carious lesions by fluorescence spectroscopy at 405-nm excitation wavelength. J Biomed Opt. 2007
26. Zhang J, Lynch RJM, Watson TF, Banerjee A. Chitosan-bioglass complexes promote subsurface remineralisation of incipient human carious enamel lesions. J Dent, 84:67-75, 2019