

Microdureza del esmalte remineralizado mediante el uso de barnices fluorados en premolares desmineralizados con ácido láctico, estudio *in vitro*

Microhardness of remineralized enamel using fluoride varnishes in demineralized premolars with lactic acid, *in vitro* study

María Cristina Paredes Quintana¹, Patricia De Lourdes Álvarez Velasco^{2*}



Odontología 23(1) (2021): e3277

Recibido: 17/10/2020 Revisado: 02/12/2020 Aceptado: 04/01/2021

¹ Graduado de la Carrera de Odontología de la Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

✉ krissp87@hotmail.com

 <https://orcid.org/0000-0003-0539-5120>

² PhD, Especialista en Odontopediatría. Profesor tutor en clínica de Odontopediatría pregrado. Facultad de Odontología. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

✉ palvarezvelasco@yahoo.com.mx

 <https://orcid.org/0000-0003-2820-0402>

*Autor de correspondencia: palvarezvelasco@yahoo.com.mx

Resumen

La caries dental en sus estadios iniciales se conoce como lesión cariosa incipiente, esta lesión puede ser reversible mediante el uso de barnices fluorados. **Objetivo:** Evaluar la microdureza superficial de esmalte dental remineralizado mediante la aplicación de barnices fluorados sobre bloques de esmalte de premolares desmineralizados con ácido láctico. **Materiales y Métodos:** Se midió la microdureza superficial de 45 bloques de esmalte dental, se realizaron tres indentaciones para obtener la dureza inicial Knoop, luego se desmineralizó el esmalte con solución de ácido láctico (pH4) para formar artificialmente la mancha blanca; la muestra se dividió en 3 Grupos (n=15/grupo): A) aplicación de barniz fluorado al 2.26% (Duraphat- Colgate); B) aplicación de barniz fluorado al 0.1% (Flúor Protector- Ivoclar) y C) sin aplicación de flúor. Se empleó el régimen de pH cíclico durante 14 días aplicando barniz fluorado cada 3 días para remineralizar el esmalte dental en los grupos experimentales. Al final se obtuvo la dureza post tratamiento remineralizante; en total se realizaron 9 indentaciones por cada muestra. Los datos se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. **Resultados:** Existió una diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.0001$). Para las comparaciones entre grupos se utilizó el método de Dunn, estableciéndose que la Microdureza del esmalte fue mayor tras la aplicación de barniz de flúor en concentración de 2.26%. **Conclusión:** Los dos barnices fluorados incrementaron la microdureza del esmalte, sin embargo, presentó mayor microdureza la aplicación de barniz de flúor en concentración de 2.26%. La remineralización del esmalte fue proporcional a la concentración de flúor.

Palabras Clave: caries dental, remineralización dental, pruebas de dureza.

Abstract

In its early stages, dental caries, are known as incipient carious lesion, this one, can be reversible through the use of fluoride varnishes. **Objective:** To evaluate, microhardness surface's of remineralized dental enamel by applying fluorinated varnishes on enamel block's of premolars demineralized with lactic acid. **Materials and Methods:** 45 blocks of dental enamel was microhardness measured. Three indentations were made to obtain the initial Knoop hardness, then the enamel was artificially demineralized, with lactic acid solution (pH4) to form the white spot; the sample was divided into 3 groups (n = 15 / group): A) application of 2.26% fluoride varnish (Duraphat-Colgate); B) application of 0.1% fluoride varnish (Protective Fluorine- Ivoclar) and C) without fluoride's

ODONTOLOGÍA

<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/odontologia/index>

ISSN-e: 1390-9967

ISSN: 1390-7468

Periodicidad: semestral

vol. 23, núm. 1, 2021

fod.revista@uce.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.29166/odontologia.vol23.n1.2021-e3277>



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución-NoComercial

application. The cyclic pH regime was used for 14 days applying fluoride varnish every 3 days to remineralize the tooth enamel in the experimental groups. At the end, the remineralizing post-treatment hardness was obtained; total 9 indentations for each sample. The data were analyzed using the Kruskal-Wallis test. **Results:** Significant difference between the groups ($p = <0.0001$) was found. Dunn's method was used for comparisons between groups, establishing that enamel's microhardness was higher, after the application of fluorine varnish at a concentration of 2.26%. **Conclusion:** Both of them

fluorinated varnishes increased the microhardness enamel's, however, the application of fluoride varnish at 2.26% concentration presented higher microhardness. Enamel remineralization was proportional to fluoride concentration.

Keywords: dental caries, dental remineralization, hardness test.

Introducción

El esmalte dental o sustancia adamantina ha sido considerado el tejido más mineralizado y duro de los tejidos calcificados del cuerpo humano, sin embargo, carece de reparación ya que los ameloblastos, células secretoras de la sustancia adamantina, después de completar la formación del esmalte involucionan desapareciendo durante la erupción dentaria¹.

El esmalte dental sufre disolución química y localizada cediendo iones perdiendo iones, esto ocurre por ácidos bacterianos provenientes de la placa dental ácidos que descienden el pH de la placa a un nivel crítico para los cristales de hidroxiapatita 5.4, o por alimentos ácidos ingeridos en la dieta perdiendo iones este proceso se conoce como desmineralización, la desmineralización es revertida por la capacidad buffer de la saliva, la saliva al estar sobresaturada de iones de fosfato, calcio permite la reincorporación de dichos iones en la superficie desmineralizada, promoviendo la recaptación de los minerales perdidos en los cristales parcialmente disueltos, produciéndose el proceso de remineralización^{2,3}.

El desequilibrio de los procesos dinámicos de desmineralización y remineralización, predominando el proceso de desmineralización resultado de los ácidos orgánicos bacterianos por periodos prolongados de tiempo en la estructura adamantina semanas e incluso meses origina la lesión cariosa incipiente primera manifestación clínica de la caries dental⁴, es en esta etapa el momento adecuado para revertir o detener la lesión cariosa incipiente mediante la remineralización con terapia tópica de fluoruro, debido a que los iones fluoruro por su alta electronegatividad tienden a asociarse con otros elementos, difundiendo hacia el interior de la lesión incipiente en la subsuperficie desmineralizada reaccionando con los iones de calcio y fosfatos remanentes formando cristales de fluorhidroxiapatita cristales más estables y resistentes a los ataques ácidos debido a que el pH crítico para la disolución de dichos cristales es de 4.5, aumentando la dureza del esmalte dental^{5,6}.

La falta de remineralización en las lesiones cariosas incipientes conduce a la cavitación del esmalte dental. Por las razones expuestas, la presente investigación tiene como objetivo comparar *in vitro* la microdureza del esmalte remineralizado mediante el uso de barnices fluorados en premolares desmineralizados con ácido láctico.

Materiales y métodos

Estudio experimental *In vitro*, aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador. La investigación se realizó en bloques de esmalte obtenidos de 28 premolares sanos, que fueron extraídos por indicación de ortodoncia previo consentimiento informado y se almacenaron en agua destilada a temperatura ambiente.

Para obtener los bloques, la porción coronaria fue seccionada por la cara vestibular y lingual con un disco de diamante, conformando dos muestras de esmalte por cada premolar con 4 mm de ancho, 4 mm de alto y 2 mm de espesor^{7,8}; a continuación, se alisó la superficie externa de las muestras de esmalte con carburo de silicio de 500 y 1500 gr (Fandeli-México)⁷, para facilitar la indentación se colocó las muestras en moldes acrílicos (Fig. 1).

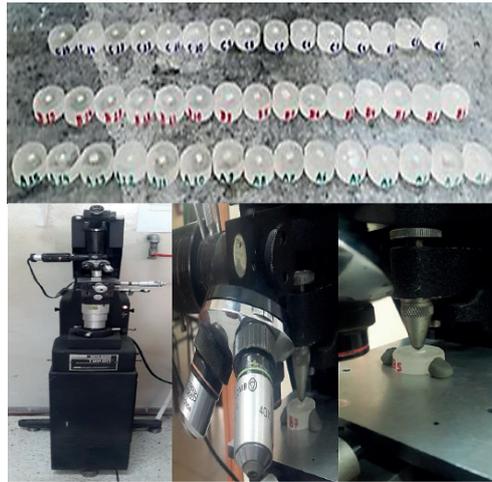


Figura 1. A. Muestras de estudio por grupos. B. Microdurómetro (Tukon MO Microhardness Tester, USA). C. Indentador. D. Indentación.

Figure 1. A. Study samples by groups. B. Microdurometer (Tukon MO Microhardness Tester, USA). C. Indenter. D. Indentation.

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

Con un microdurómetro (Tukon MO, USA) con 500 g de carga⁹ (Fig. 1), como medida base para el estudio se realizaron 3 indentaciones en la porción central de todas las muestras, el promedio se transformó a microdureza de Knoop.

Como criterio de inclusión y estandarización, cada muestra cumplía con el rango de referencia establecido de microdureza de Knoop para el esmalte dental de $343 (\pm 23) \text{ kg/mm}^2$ ¹⁰⁻¹⁴. Las muestras que no se encontraban dentro de estos parámetros fueron descartadas.

Previo al experimento, se realizó una prueba piloto para formar artificialmente la mancha blanca, se aplicaron 3 soluciones, para ello se utilizó 150 ml de saliva artificial, Salivsol (Lamosan-Ecuador) y diferentes cantidades de ácido láctico para variar el pH (tabla 1).

Tabla 1. Prueba piloto, soluciones desmineralizantes para formar mancha blanca.

Table 1. Pilot test, demineralizing solutions to form white spot.

SALIVA ARTIFICIAL	ACIDO LÁCTICO	pH	TIEMPO
150 ml	3.75 ml	2	50 min
150 ml 2	.25 ml	3	90 min
150 ml 1	.5 ml	4	150 min

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

Se observó que la solución con pH 4 formó la mancha blanca sin desnaturalizar el esmalte como se confirmó en el microscopio de luz y la indentación del microdurómetro (Tukon MO Microhardness Tester, USA), además se consideró como valor de referencia que el *S. mutans* fermenta azúcares en un pH 4,4 y desarrolla un pH de 4,8¹⁵.

Se pudo examinar que la solución desmineralizante con pH 2 formaba la mancha blanca en un periodo de 50 min^{16,17}, pero, se observó desmoronamiento total de la superficie adamantina; la solución con pH 3 formó la mancha blanca en un periodo de 90 min, sin embargo, con desmoronamiento moderado de la superficie adamantina; en cambio, la solución con pH 4 formó la mancha blanca en un periodo de 2.30 H y se observó que la superficie adamantina no sufrió desmoronamiento, por lo que se escogió esta solución para el experimento (Fig. 2).

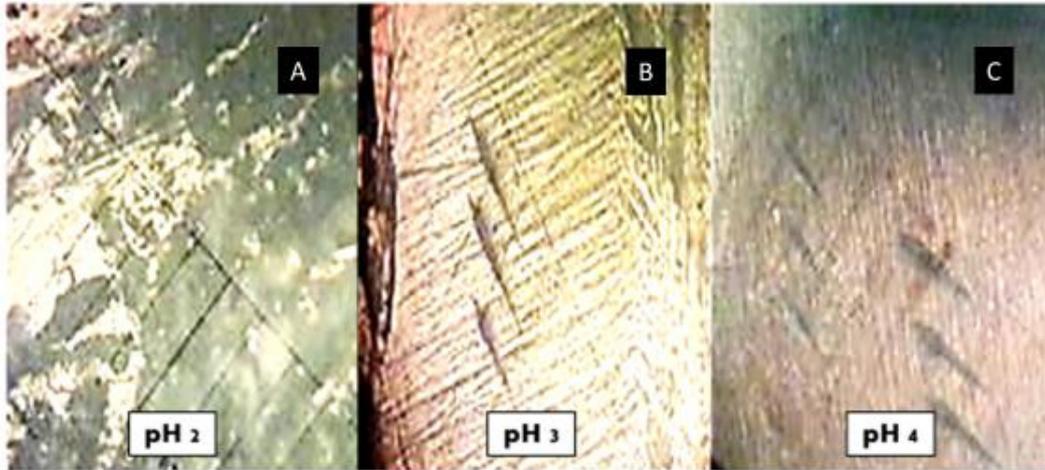


Figura 2. Prueba piloto. Observación de muestras desmineralizadas con diferente pH (aumento: 10x). **A.** pH 2, Desmoronamiento total de la superficie adamantina. **B.** pH 3, Desmoronamiento moderado de la superficie adamantina. **C.** pH 4, integridad de la superficie adamantina.

Figure 2. Pilot test. Observation of demineralized samples with different pH (magnification: 10x). A. pH 2, Total decay of the adamantine surface. B. pH 3, Moderate decay of the adamantine surface. C. pH 4, integrity of the adamantine surface.

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

Para la desmineralización del esmalte, las muestras se sumergieron individualmente en 32ml de solución de ácido láctico con pH 4 por 2.30 H. A continuación, se valoró la microdureza Knoop del esmalte desmineralizado, con una separación de 100 μm hacia la parte izquierda de las indentaciones iniciales, observándose el aumento de longitud en relación a las iniciales, ocasionado por la menor dureza del esmalte dental relacionado con la pérdida de minerales^{18,19}; se obtuvo el promedio de las tres indentaciones y se transformó a Kg/mm^2 , (ver fig. 3).

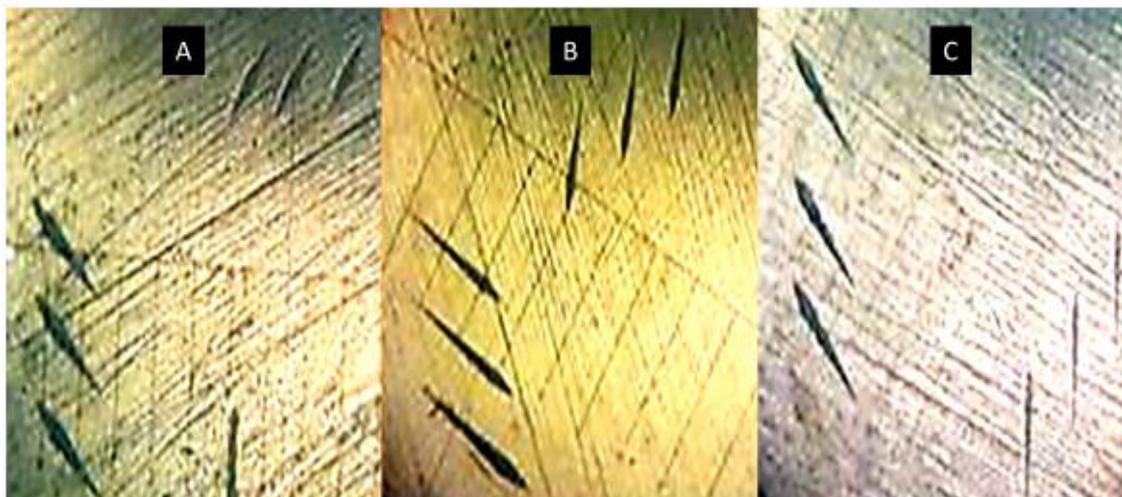


Figura 3. Medición de Microdureza posterior de la Desmineralización (aumento 10x). **A.** Indentaciones en el espécimen para aplicación de barniz fluorado al 2.26% de fluoruro. **B.** Indentaciones en el espécimen para aplicación de barniz fluorado al 0.1% de fluoruro. **C.** Indentaciones en el espécimen para el grupo control sin tratamiento.

Figure 3. Measurement of subsequent Microhardness of Demineralization (10x magnification). A. Indentations in the specimen for application of 2.26% fluoride fluoride varnish. B. Indentations in the specimen for the application of 0.1% fluoride fluoride varnish. C. Indentations in the specimen for the untreated control group.

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

Como criterio de inclusión y estandarización, previo al tratamiento de remineralización, todas las muestras de los 3 grupos de estudio se encontrarán en valores promedio y sin diferencia estadística entre los grupos ($p > 0,05$).

Para el experimento, los 45 bloques de esmalte dental se dividieron en 3 grupos con los siguientes tratamientos: A) 15 bloques con aplicación de barniz fluorado al 2.26% de fluoruro, B) 15 bloques con aplicación de barniz fluorado al 0.1% de fluoruro y C) 15 bloques sin aplicación de flúor.

Se limpió las superficies de cada muestra de esmalte con pasta profiláctica (piedra pómez) y cepillo adaptado en una pieza de mano de baja velocidad durante 5 segundos, se lavaron las superficies de cada muestra de esmalte con agua proveniente de la jeringa triple y se secaron con aire en spray, en el grupo A, se colocó una capa de barniz fluorado al 2.26% (Duraphat- Colgate); en el grupo B, se colocó una capa de barniz fluorado al 0.1% (Flúor Protector- Ivoclar); y, en el grupo C, control no se aplicó tratamiento remineralizante.

Las muestras de esmalte desmineralizado fueron sometidas al régimen de pH cíclico de Featherstone por 14 días^{20,21}, se colocaron en frascos con 50 ml de solución desmineralizante (2.0 mmol/L de Calcio, 2.0 mmol/L de Fosfato, 0.075 mmol/L de ácido acético con un pH de 4.4) durante 6 horas diarias, y se mantuvieron conservadas en una incubadora (THELCO 6, Precision Napco, Canadá) a 37o C (± 1 oC); transcurrido este periodo, las muestras fueron lavadas con agua destilada; posteriormente, las muestras de esmalte fueron sumergidas en 40 ml de solución remineralizante (1.5 mmol/L de Calcio, 0.9 mmol/L de Fosfato, 130 mmol/L de Cloruro de Potasio, 20 mmol/L de Cacodilato de Sodio con un pH de 7.0) durante 16 horas diarias (20), las mismas que se conservaron en una incubadora a 37o C (± 1 oC).

La aplicación del barniz fluorado en las muestras de esmalte se realizó cada tres días debido a que este periodo de tiempo representa una semana in vivo, ya que el régimen de pH cíclico simula un mes in vivo^{20,21}, realizando cuatro aplicaciones en total representando una aplicación por semana durante un mes^{5,22-24}.

Finalmente, se realizó la medición de microdureza de las muestras de esmalte posterior al tratamiento remineralizante, con una separación de 100 μ m hacia la parte derecha de las indentaciones iniciales, aplicando la metodología descrita (figura 4).

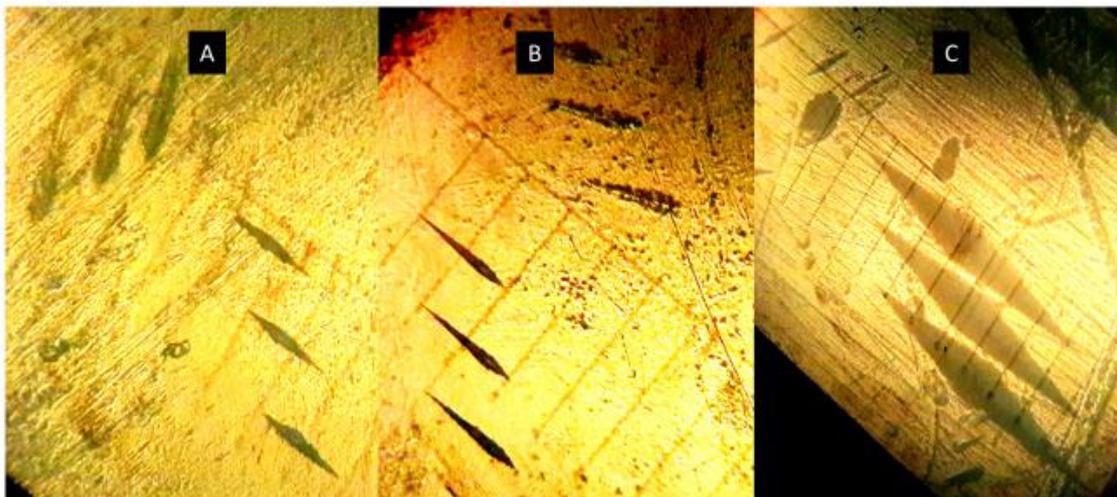


Figura 4. Medición de Microdureza posterior a la aplicación de agentes remineralizantes (aumento 10x). **A.** Indentaciones en el espécimen con aplicación de barniz fluorado al 2.26%. **B.** barniz fluorado al 0.1%. **C.** Indentaciones en el espécimen grupo control sin tratamiento.

Figure 4. Microhardness measurement after the application of remineralizing agents (10x magnification). **A.** Indentations in the specimen with application of 2.26% fluoride varnish. **B.** 0.1% fluoride varnish. **C.** Indentations in the untreated control group specimen.

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

Los datos se almacenaron en hojas de Excel y se realizó el análisis estadístico en el programa BioEstat 5.0; para valoración de la normalidad se usó el test de Lilliefors y se aplicó el Test de Kruskal Wallis con comparación de Dunn entre los grupos con un intervalo de confianza del 95% siendo significativos valores $p = < 0.05$.

Resultados

La medición cuantitativa del esmalte demostró una disminución de la microdureza después de la desmineralización y un aumento de la misma cuando se aplicó el tratamiento remineralizante, aunque los valores dependieron de la concentración de flúor.

Como se ha descrito, los bloques desmineralizados debían presentar valores uniformes como criterio de inclusión, el test de Lilliefors demostró una distribución normal y el Análisis de varianza (ANOVA), con un intervalo de confianza del 95% entre los grupos, presentó un resultado de $p = 0.7723$, que demostró que no existieron diferencias significativas.

En base a los datos experimentales de microdureza del esmalte después de la remineralización se observó una distribución no paramétrica según el test de Lilliefors, se elaboró el análisis descriptivo donde se observa diferencias en las medias y medianas de los grupos (tabla 2).

Tabla 2. Valores promedio después de remineralización.

Table 2. Average values after remineralization.

VARIABLE	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MEDIANA	DESVÍO INTERCUARTIL
CONTROL	22.49	± 2.21	22.71	2.41
FLÚOR 0.1 %	234.77	± 8.13	232.65	9.2
FLÚOR 2.26%	326.29	± 4.92	324.66	6.86

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

El análisis inferencial mediante el test de Kruskal-Wallis demostró que existe una diferencia significativa entre los grupos ($p = < 0.0001$). Para las comparaciones entre grupos se utilizó el método de Dunn, estableciéndose que la Microdureza del esmalte fue mayor tras la aplicación de barniz de flúor en concentración de 2.26% (tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio después de remineralización.

Table 3. Average values after remineralization.

Kruskal-Wallis	Resultados
p =	< 0.0001
Comparaciones (método de Dunn)	p
Control vs Flúor 0.1%	< 0.05
Control vs Flúor 2.26%	< 0.05
Flúor 0.1% vs Flúor 2.26%	< 0.05

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

En base a los resultados anteriores, se pudo determinar que el tratamiento con aplicación de barniz fluorado al 2.26% es más efectivo que con aplicación de barniz fluorado a 0.1% y ambos tratamientos son más efectivos que no aplicar ninguno, como en el caso del grupo control (figura 5).

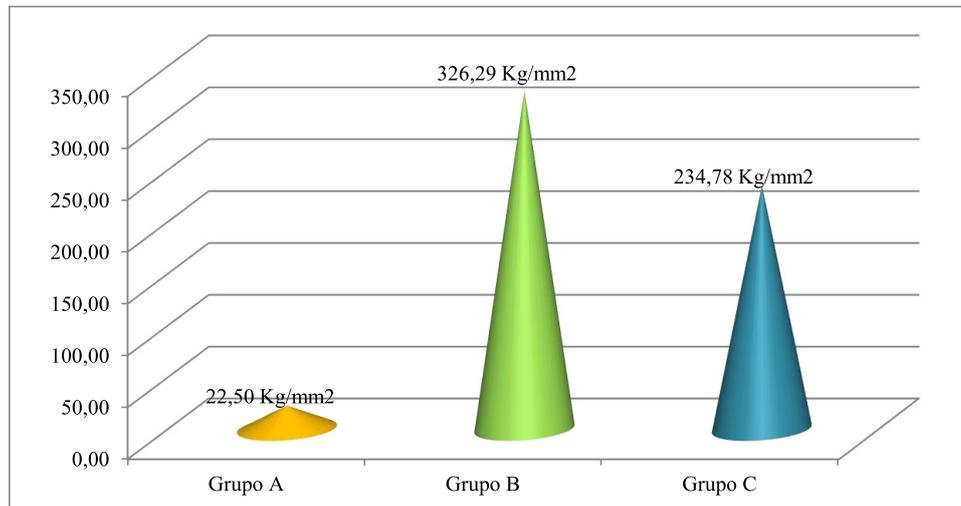


Figura 5. Dureza media del esmalte por grupo de análisis.

Figure 5. Average enamel hardness by analysis group.

Fuente: Base de datos investigación. **Elaborado por:** Autoras

Discusión

En Odontología la Mínima Intervención consiste en la detección temprana de lesiones cariosas incipientes o subclínicas realizando tratamientos de remineralización o ganancia de minerales, evitando así tratamientos operatorios e invasivos^{2,3}.

Harris et al.⁵, mencionaron que microscópicamente la zona superficial aprismática de la lesión cariosa incipiente o mancha blanca se presenta relativamente intacta frente al proceso de desmineralización producido por el ataque ácido bacteriano con una pérdida de minerales del 5 al 10%, indicando que en la presente investigación la pérdida de minerales sin desnaturalización del esmalte dental se logró utilizando la solución de ácido láctico con pH4 en un periodo de 150 minutos.

Negroni, M.¹⁵, señaló que el *Streptococcus mutans* es considerado el principal microorganismo iniciador de la caries dental produce ácidos orgánicos principalmente ácido láctico, además fermenta azúcares en un pH 4,4 y desarrolla un pH de 4,8, sin embargo, Reascos, Y.¹⁶ y Chicaiza et al.¹⁷ utilizaron solución desmineralizante de ácido láctico con pH2 que formaba artificialmente la mancha blanca en un periodo de 50 minutos, lo cual concuerda con la presente investigación, no obstante, mediante el microdurómetro se observó el desmoronamiento total de la superficie adamantina. Por esta razón no se utilizó dicha solución desmineralizante.

Torres, A.¹³, empleó solución desmineralizante de ácido láctico con pH3 que formaba artificialmente la lesión cariosa incipiente en un periodo de tres horas, sin embargo, en el presente trabajo de investigación se formó la mancha blanca en un periodo de noventa minutos, y mediante el microdurómetro se observó el desmoronamiento moderado de la superficie adamantina. Por esta razón no se utilizó dicha solución desmineralizante.

Castellanos et al.³ mencionaron que el tratamiento tópico con fluoruro como agente remineralizante tiene mayor efectividad en el proceso de remineralización, de esta manera se puede revertir o detener la lesión cariosa incipiente.

Granda et al.¹⁴, evaluaron la microdureza del esmalte afectado por caries incipiente y tratados por dos tipos de barnices fluorados Flúor Protector (Ivoclar- Vivadent) y barniz de flúor con fosfato tricálcico (Clinpro White Varnish – 3M ESPE) en 35 bloques de esmalte dental, siguiendo el régimen de pH cíclico recomendado por Argenta7 solución desmineralizante (2.0mMol/L de Fosfato, 2.0mMol/L de Calcio, 0.030ppm flúor, 75mMol/L de ácido acético con pH 4,3) durante 3 horas diarias y en una solución remineralizante (0.9mMol/L de Fosfato, 1.5mMol/L de Calcio, 0.050ppm de flúor, 150mMol/L de cloruro de potasio, 20.0mMol/L de caco-dilato de sodio con pH 7.4) durante 20 horas diarias en un periodo de 7 días, conservadas en una incubadora a 37°C (±1°C), determinando que ambos barnices incrementaron significativamente la microdureza del esmalte con lesiones de caries incipientes, sin existir diferencia entre ambos en relación con la eficacia.

Gatti et al.²⁵, realizaron un estudio in vitro en el que evaluaron el potencial anticaries de dentífricos que contienen 500 o 1100 ppm de fluoruro combinado con barniz fluorado al 5% (Duraphat- Colgate) siguiendo un régimen de pH cíclico, se concluyó que la combinación de barniz fluorado con los dentífricos mencionados no es más eficaz en la reducción de la desmineralización en dientes deciduos que solamente utilizando los dentífricos.

Ferreira et al.²², Almeida et al.²³ y Da Silva et al.²⁴ aseguran que las lesiones cariosas incipientes o manchas blancas pueden controlarse y reducirse mediante el tratamiento de remineralización con una aplicación de barniz fluorado al 5% semanal durante un mes, eludiendo de esta manera tratamientos invasivos de operatoria dental en la estructura adamantina.

Finalmente, con esta investigación se propone a la comunidad odontológica un enfoque terapéutico mínimamente invasivo de las lesiones cariosas incipientes que va acompañado de conceptos básicos de prevención como control de la dieta, educación al paciente e higiene bucal adecuada, para evitar la cavitación de la sustancia adamantina, eludiendo tratamientos invasivos de operatoria dental.

Conclusiones

Los dos barnices fluorados incrementaron la microdureza del esmalte dental desmineralizado con ácido láctico, obteniendo mayor microdureza tras la aplicación de barniz de flúor en concentración de 2.26% en comparación con el barniz de flúor en concentración de 0.1%, y ambos tratamientos son más efectivos que no aplicar ninguno, como en el caso del grupo control.

Conflicto de intereses

Los autores declararon no tener ningún conflicto de interés personal, financiero, intelectual, económico y de interés corporativo con Universidad Central del Ecuador y los miembros de la revista Odontología.

Contribución de los autores

María Cristina Paredes Quintana, Patricia De Lourdes Álvarez Velasco, son responsables de la: a Concepción y diseño del trabajo; b Recolección/obtención de resultados; c Análisis e interpretación de datos; d Redacción del manuscrito; e Revisión crítica del manuscrito; f Aprobación de su versión final.

Financiación

Este trabajo fue financiado por sus autores.

Referencias

1. Lanata E. Atlas de operatoria dental. 1ª edición. Buenos Aires: Alfaomega; 2008.
2. Cedillo J. Uso de los derivados de la caseína en los procedimientos de remineralización. ADM. 2012; 69(4): 191-199.
3. Castellanos J, Marín L, Úsuga M, Castiblanco G, Martignon S. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. Univ Odontol. 2013; 32(69): 49-59.
4. Carrillo C. Desmineralización y remineralización. ADM. 2010; 67(1): 30-32.
5. Harris N, García F. Odontología preventiva primaria. 2ª ed. México: Manual Moderno; 2005.

6. Cuadrado D, Peña R, Gómez J. El concepto de caries hacia un tratamiento no invasivo. *ADM*. 2013; 70(2): 54-60.
7. Argenta R, Machado C, Cury J. Un modelo de pH ciclismo modificado para evaluar el efecto de fluoruro en la desmineralización del esmalte. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(3): 241-246.
8. Carvalho F, Moura V, Silva T, Lemes H, Santos R, Guedes B. Efecto protector de agentes nanophosphate calcio y CPP-ACP sobre la erosión del esmalte. *Braz Oral Res*. 2013; 27(6): 463-470.
9. Newby J, Davis J, Refsnes S, Dieterich D, Frissell H, Jenkins D, Cubberly W, Stedfeld R, Mills K. *Metals Handbook*. 9ª ed. United States of America: American Society for Metals; 1985.
10. Craig R, Peyton F. The microhardness of enamel and dentin. *J.D.Res*. 1958; 37(4): 661-668.
11. Craig R. *Materiales dentales restauradores*. 7ª ed. Buenos Aires: MUNDI S.A.I.C. y F; 1988.
12. Barrancos J, Barrancos P. *Operatoria Dental Integración clínica*. 4ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
13. Torres Gallardo AN. Evaluación in vitro, de la eficacia del barniz de fluoruro de sodio al 5% más fosfato tricálcico y resina infiltrante, en el tratamiento de superficies lisas de piezas dentales permanentes, afectadas con caries incipientes, valorada a través de pruebas de microdureza superficial adamantina. [Tesis grado]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2014.
14. Granda U, Quesada M. Evaluación de la microdureza del esmalte afectado por caries incipiente y tratados por dos tipos de barnices fluorados: Estudio in vitro. *Revista ODONTOLOGÍA*. 2017; 19(2): 40-52.
15. Negroni Marta. *Microbiología Estomatológica fundamentos y guía práctica*. 2ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 2009.
16. Reascos Chamorro YF. Remineralización de esmalte dental, conseguido con aumento de calcio proveniente del uso de caseína pura versus MI Paste plus aplicado a terceros molares en un estudio in vitro. [Tesis grado]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015.
17. Chicaiza G, Navarrete N. Efecto de dos agentes remineralizantes en lesiones de mancha blanca: Estudio in vitro. *Revista ODONTOLOGÍA*. 2016; 18(1): 6-12.
18. Souchois M, Botazzo A, Vieira R. Effect of time in hardness test on artificially demineralized human dental enamel. *Braz J Oral Sci*. 2008; 7(24): 1507- 1511.
19. Chávez B, Santos I, Urzedo R. Evaluación de la dureza del esmalte en dientes deciduos. *KIRU*. 2011; 8(1): 2-6.
20. Stookey G, Featherstone J, Rapozo M, Schemehorn B, Williams R, Baker R, Barker M, Kaminski M, McQueen C, Amburgey J, Casey K, Faller R. The featherstone laboratory pH cycling model a prospective multi-site validation exercise. *American Journal of Dentistry*. 2011; 24(5): 322-328.
21. Buzala M, Hannas A, Magalhaes A, Rios D, Honorio H, Delbem A. pH cycling model for in vitro evaluation of efficacy of fluoridated dentifrices for caries control strengths and limitations. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18(4): 316-334.
22. Ferreira J, Aragao A, Rosa A, Sampaio F, Menezes A. Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions a randomized clinical trial. *Braz Oral Res*. 2009; 23(4): 446-451.
23. Almeida M, Costa O, Ferreira J, Menezes V, Leal R, Sampaio F. Therapeutic potential of brazilian fluoride Varnishes an in vivo study. *Braz Dent J*. 2011; 22(3): 193-197.
24. Da Silva R, Ferreira J, Da Silva C, Fontes L, Garcia A, Menezes V. In vivo evaluation of therapeutic potential of fluoride varnishes. *Rev Odonto Cienc*. 2012; 27(3): 233-237.
25. Gatti A, Camargo L, Imperato J, Mendes F, Raggio D. Combination effect of fluoride dentifrices and varnish on deciduos enamel demineralization. *Braz. Oral res*; 25(5):433-438.