THIAGO SAADS CARVALHO

Avaliação do efeito preventivo do verniz contendo glicerofosfato de cálcio frente a desafios cariogênicos e erosivos

São Paulo

2011

THIAGO SAADS CARVALHO

Avaliação do efeito preventivo do verniz contendo glicerofosfato de cálcio frente a desafios cariogênicos e erosivos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Strazzeri Bönecker.

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Carvalho, Thiago Saads

Avaliação do efeito preventivo do verniz contendo glicerofosfato de cálcio frente a desafios cariogênicos e erosivos [versão corrigida] / Thiago Saads Carvalho; orientador Marcelo Bönecker. -- São Paulo, 2011.

93p. : fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Odontopediatria. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida de acordo com sugestões da Banca Examinadora em 18/04/2011

1. Verniz (Odontopediatria). 2. Cárie dentária – Prevenção. 3. Desmineralização dentinária – Prevenção. 4. Glicerofosfato de cálcio. I. Bönecker, Marcelo. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carvalho TS. Avaliação do efeito preventivo do verniz contendo glicerofosfato de cálcio frente a desafios cariogênicos e erosivos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / / 2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa...

Enquanto eu fingia não te querer,
Lá no fundo do saber nascia
Algo inexplicável, contestador,
Yin e Yang, um frio, um calor,
Nada parecido eu conhecia.
Enquanto eu fingia não te querer...

Consciência célere analisava
Riscos e coerências, e
Infinitas conseqüências, e
Sonhando em ti, meu dia acabava.
Tirei, então, resposta de onde eu sonhava...
Incorporado em mim, vi,
Nada parecido eu já senti,
A ti... Por ti... De ti que eu gostava.
(Thiago Saads, Eu e ELA, 2002)

...que conseguiu agüentar meus momentos de bom e mau humor, felicidade, tristeza, momentos com bolsa e sem bolsa... Foi você quem me deu ânimo, energia, apoio, carinhos, broncas, colos e discussões, enfim, tudo o que eu precisava, na dose que eu precisava:

…hoje eu procuro o horizonte
Reservado em teu beijo;
E busco a nossa ponte,
Abrigo do teu abraço,
Onde a saudade é morta...
(Thiago Saads, Poesia Sem Título III, 2002)

AGRADECIMENTOS

Devo confessar que, como na maioria das teses que encontramos na biblioteca, eu fiquei tentado a agradecer “A Deus acima de todas as coisas”. Porém, na minha opinião, Deus esteve presente nos sorrisos, carinhos, palavras e abraços que encontrei em cada pessoa que passou pela minha vida. Então, sem um agradecimento propriamente dito a Deus, meu agradecimento a Ele(a) está presente no conjunto de agradecimentos que escrevo abaixo:

> ...a nossa juventude há de persistir nos corações daqueles que fizeram parte de nossas vidas e nos sorrisos daqueles que compuseram nossa história.
> (Thiago Saads, 2004)

À MINHA FAMÍLIA:

À minha esposa, agradeço por tudo e mais um pouco. Não conheço olhares, nem cores, nem rimas que possam descrever a amplidão dos sentimentos que sinto por ti. És tudo que sinto. És parte de tudo que sou.

> Sala vazia.
> Meu coração a pensar.
> És meu limite.
> (Thiago Saads, Haikai Completo, 2002)

> “Close your eyes and I'll kiss you
> Tomorrow I'll miss you
> Remember I'll always be true
> And then while I'm away
> I'll write home every day
> And I'll send all my loving to you
> I'll pretend that I'm kissing
> The lips I am missing
> And hope that my dreams will come true…”
> (Lennon J, McCartney P. All my loving, 1963)

Aos meus pais, Zé Filho e Silvia. Se eu fosse citar todas as coisas pelas quais gostaria de agradecer vocês, acho que não teria tempo de escrever a tese. Então, sou quem sou, porque vocês me criaram assim. Agradeço por terem me mostrado os melhores caminhos.

> “Love, Love, Love, Love, Love, Love...
> There’s nothing you can do that can’t be done.
> Nothing you can sing that can’t be sung.
> Nothing you can say, but you can learn how to play the game.
> It’s easy.
> All you need is Love, all you need is Love,
> All you need is Love, Love, Love is all you need.
> There is nothing you can know that isn’t known.
> Nothing you can see that isn’t shown.
> Nowhere you can be that isn’t where you’re meant to be.
> It’s easy.

All you need is Love, all you need is Love,
All you need is Love, Love, Love is all you need."
(Lennon J, McCartney P. All you need is Love, 1967).

Ao meu irmão Filipe e minha cunhada Fernanda, eu agradeço (por demais mesmo) pelo lindo presente que vocês resolveram nos dar agora que estou defendendo a minha tese! Minha sobrinha Maria Eduarda é a coisa mais linda.

A minha família, que de longe acompanha toda a minha formação e torcem para que tudo sempre dê certo. As rezas e torcidas valeram, pois estou chegando onde sempre quis chegar.

A Carol-Ann, sempre disposta a ouvir e ajudar, sempre preocupada com o andamento do meu trabalho. Obrigado por participar na minha formação. Obrigado por acompanhar, de perto e de longe, o caminho que percorro.

À família da minha esposa, Seu Nino, Dona Geuza, Fábio, Alisson, Pinheiro, Glauciene, Júlia, Flávia, Pietra e Natália.

AO MEU ORIENTADOR

Ao meu orientador, Marcelo, MUITO OBRIGADO pela confiança e por me trazer para FOUSP. Obrigado pelas conversas, orientação, carinho, paciência, oportunidades e amizade. Obrigado por me deixar crescer e buscar novos conhecimentos. Devo agradecer por todos os incentivos que você me deu nessa busca para realizar um sonho. Obrigado por me ajudar a realizar esse sonho. Guardarei a lembrança dessa época da minha vida com muito carinho, e fico feliz que você participou de tudo.

AOS AMIGOS NO BRASIL,

"…Does it worry you to be alone?...
…Are you sad because you're on your own?...
No! I get by with a little help from my friends.
I get high with a little help from my friends.
I'm going to try with a little help from my friends".
(Lennon J, McCartney P. With a little help from my friends, 1967).

Jenny Abanto, *ustedes ganhales uno agradecimientoles todos los especiales. Uno agradecimiento en "*españoles*": Mis sincieros agradecimientoles. Mucho obrigadodoles por tudoles*. Muito obrigado pelo incentivo ao trabalho, pela amizade, carinho, confiança, determinação, e pelos trabalhos *per si*.

Paula, obrigado pelos momentos de conversas e de silêncios, quando você me ouvia, ou falava, sobre trabalho, vida, tudo e nada... Agradeço pelas novas idéias e perspectivas.

Fabiana, obrigado por me mostrar a força e determinação que são necessárias para conseguir ficar longe da família. Senti na pele o quanto isso é difícil. Admiro você e sua família por toda essa força.

Chris, obrigado por mostrar o entusiasmo, energia e garra ao estudar.

Lucila, muito obrigado pelas conversas, idéias e por me mostrar outros pontos de vista.

Aos amigos Tati, Jana, Babu, Isa, Tuca, Cássio, Karla, e todos os outros que participaram do desenvolvimento deste trabalho. Não tenho mais palavras para descrever o quanto gostei de participar da vida acadêmica com vocês. Então, espero que as conversas e sorrisos que compartilhamos durante todo esse tempo possam explicar o carinho que sinto por cada um de vocês.

Agradeço a todos vocês pelas palavras e ouvidos nas horas difíceis, e não posso deixar de agradecer pelos abraços amigos e risos que dividimos.

ÀQUELES QUE CONTRIBUÍRAM DIRETAMENTE COM ESTE TRABALHO

Aos professores que encontrei na FOB, Marília, Ana Carolina, Dani Rios, Heitor, muito obrigado por terem me recebido no laboratório, por terem reservado um tempo para me ensinar os procedimentos laboratoriais necessários para esta pesquisa. Sem vocês não teria conseguido fazer nem a metade deste trabalho.

Ao professor Fábio, obrigado por ter participado no desenvolvimento do projeto, das idéias de experimentos, por ter me mostrado o CaGP. Obrigado pelas conversas sobre dente, cárie, erosão, microbiologia, mas fico mais agradecido pelas conversas sobre artes, história, arquitetura, etc. Tenho grande consideração por você; como professor e como amigo.

Às colegas Bianca e Carol, que aceitaram meu convite para entrar no mundo da pesquisa. Obrigado pelas idéias e conversas que compartilhamos. Aproveito para agradecer aqui as outras monitoras da Clínica de Prevenção Taís e Mariana. Sem vocês não conseguiríamos atender as crianças. Obrigado por proporcionarem sorrisos saudáveis aos nossos pacientes.

I would like to thank Professor Lussi for accepting me on the Sandwich Program FROM CNPq, as well as for welcoming me to the laboratory. My gratitude for making me feel part of the *Forschungslabor für Karies und Erosionen* Team at the University of Bern. Thank you for all your advice and expertise.

Thank you Barbara. Your hard work, persistence and determined efforts were a very important part of this work.

Ao Douglas, obrigado pela grande ajuda no laboratório.

AOS PROFESSORES DA PÓS-GRADUAÇÃO

Ao Fausto, obrigado pelas broncas, sem elas não conseguiria ter foco! Mas agradeço ainda mais pelos seminários. Através dos seminários que conseguir ter uma nova visão de pesquisa, literatura científica e leitura crítica. Claro, também não

posso deixar de agradecer por todas as discussões sobre estatística. Aprendi muito com você. Principalmente, agradeço pela força, confiança e amizade que duraram.

À Dani, obrigado por toda sua ajuda e carinho. Sua energia positiva é contagiante, obrigado por iluminar a sala dos alunos com seu sorriso.

À Professora Salete, obrigado pelo carinho que você mostrou com a turma. Minha maior lição em Odontopediatria foi poder observá-la na clínica. Obrigado por ter deixado eu ser seu aluno.

Ao Professor Guedes, obrigado pelo voto de confiança e ter permitido minha vinda a São Paulo e participar da equipe da Odontopediatria-FOUSP.

Aos professores Imparato, Márcia, Mariana, Ana Lídia, Cláudia, agradeço por vocês terem sempre me recebido quando precisava de ajuda.

TO MY FRIENDS FROM BERN

"If there's anything that you want,
If there's anything I can do,
Just call on me and I'll send it along,
With love from me to you."
(Lennon J, McCartney P. From me to you, 1963).

Briguitte, thank you for being my family in Switzerland. You were always willing to help, welcomed me to the Lab, made me feel at home in the workplace. You really are a wonderful person.

A special gratitude to the Neuhaus family. Klaus, Gotlind, the smart Lenni, the beautiful Tom-Kilian and the smiley Greta, I thank you for accepting and welcoming my wife and I in your home. Thank you for letting us be part of your family.

Zeinab, Marta, Sabrina, Neha, Tamara, Simon, Phillip, Kate, Xiao Jie and Rick, thank you for all the conversations, ideas, words of wisdom and words of kindness.

To all those who work on the fourth floor, who were part of my Coffee Breaks. Thank you for all your kindheartedness.

AOS FUNCIONÁRIOS DA ODONTOPEDIATRIA

À Marize, muito obrigado por tudo o que você fez. Obrigado pelo tempo que você tirou para me atender. Obrigado por encontrar todas as respostas que eu precisava sobre as burocracias da FOUSP, CNPq, CAPES, enfim, você conseguiu facilitar minha estadia na faculdade e me ajudou a conseguir chegar até o final. Aproveito para agradecer Cátia e Alessandra, e toda a equipe da pós-graduação, pela ajuda nos diversos momentos que eu as procurei.

Ao Júlio e à Fátima, obrigado por serem sempre prestativos nos momentos que precisei.

RESUMO

Carvalho TS. Avaliação do efeito preventivo do verniz contendo glicerofosfato de cálcio frente a desafios cariogênicos e erosivos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Este estudo foi realizado utilizando quatro experimentos que objetivaram: (1) Avaliar a quantidade de flúor (F-) liberada por vernizes; (2) Avaliar a quantidade de F- fraca e fortemente aderido ao esmalte dentário após uso dos vernizes; avaliar a capacidade do verniz de prevenir a (3) desmineralização do esmalte por cárie e (4) a progressão da desmineralização por erosão. Vernizes fluoretados (5,63%), contendo ou não glicerofosfato de cálcio (CaGP) a 1%, 5% e 10% foram elaborados e comparados a vernizes controle sem F-, e outros contendo apenas F- (a [2,26%] ou a [5,63%]). Placas de acrílico foram utilizadas para a avaliação da quantidade de F- liberada pelos vernizes. Um total de 72 dentes humanos foram utilizados para obter 2 amostras (*a* e *b*) de cada dente e verificar a quantidade de F- fraca e fortemente aderida ao esmalte (*a*) após receber o verniz fluoretado e (*b*) sem receber verniz. Ainda, 60 dentes bovinos foram aplanados e alisados para verificar o efeito preventivo dos vernizes em desafio cariogênico *in vitro*. E 108 dentes humanos foram aplanados e alisados para verificar o efeito dos vernizes na progressão da erosão *in vitro*. O verniz contendo F- (5,63%) e 1% CaGP foi o que liberou mais flúor ao meio ($p<0,05$), e esse mesmo verniz e o verniz contendo F- 5,63% promoveram uma maior quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário ($p<0,01$). Entretanto esses aspectos não foram determinantes quando se verificou o efeito preventivo, pois o verniz contendo F- (2,26%) foi o que apresentou melhor efeito preventivo ao diminuir significantemente a desmineralização por cárie ($p<0,05$) e erosão ($p<0,01$) *in vitro*, sendo que os vernizes contendo CaGP não apresentaram esse mesmo efeito. O uso dos vernizes não foi capaz de remineralizar o esmalte que sofreu amolecimento (*softening*) após um desafio erosivo. Frente ao exposto, pode-se concluir que apesar do verniz de glicerofosfato de cálcio associado ao flúor promover maior liberação de flúor ao meio e maior quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário, o mesmo não apresentou efeito preventivo favorável frente aos desafios ácidos. Portanto, o uso do glicerofosfato de cálcio de

maneira combinada ao flúor na forma de verniz não apresentou efeito preventivo significativo em esmalte submetido a desafios cariogênicos e erosivos in vitro.

Palavras-chave: Cárie dentária, Erosão dentária, Fluoretos, Vernizes de fluoretos.

ABSTRACT

Carvalho TS. Preventive effect of a varnish containing calcium glycerophosphate after cariogenic and erosive challenges [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

This study was carried out in four experiments, which aimed at: (1) assess the amount of fluoride (F-) released by the varnishes; (2) assess the amount of loosely and firmly bound F- to dental enamel after the use of varnishes; assess the ability of the varnishes to prevent (3) enamel demineralization from caries and (4) the progression of demineralization from erosion. Fluoride (5,63%) varnishes containing or not calcium glycerophosphate (CaGP) (1%, 5% or 10%) were made and compared to control varnish with no F-, and varnishes containing only F- (either 2.26% or 5.63%). Acrylic plates were used to assess the amount of F- released from the varnishes. A total of 72 human teeth were used to obtain 2 enamel samples per tooth (*a* and *b*) to assess the amount of loosely and firmly bound F- to enamel, before (*b*) and after (*a*) varnish application. Still, 60 bovine teeth were flattened and treated to assess the preventive effect of the varnishes after *in vitro* cariogenic challenge. Also, 108 human teeth were treated to assess the effect of the varnishes on the progression of dental erosion *in vitro*. The varnish containing F (5.63%) and 1% CaGP released more fluoride to the medium ($p<0.05$), and this same varnish together with the varnish containing F-5.63% promoted a greater quantity of loosely and firmly bound fluoride to dental enamel ($p<0.01$). However, these aspects were not determinants in the prevention, due to the fact that the varnish containing F (2.26%) showed better preventive effect when it decreased *in vitro* enamel demineralization from caries ($p<0.05$) and erosion ($p<0.01$), but the varnishes containing CaGP did not show the same effect. The use of the varnishes was not able to remineralize enamel which had already suffered softening from an erosive challenge. In view of these results, it may be concluded that, although the varnish containing CaGP with fluoride promoted greater amounts of fluoride released to the medium and greater amounts of loosely and firmly bound fluoride to dental enamel, the CaGP-F varnish did not show a preventive effect after acidic challenges.

Therefore, the use of calcium glycerophosphate together with fluoride in varnishes did not show a significant preventive effect for enamel submitted to cariogenic and erosive challenges *in vitro*.

Keywords: Dental caries, Tooth erosion, Fluorides, Fluoride varnishes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC	Área sob a curva
Ca	Cálcio
$Ca_3(PO_4)_2$	Fosfato de cálcio
CaF_2	Fluoreto de cálcio
CaGP	Glicerofosfato de cálcio
CO_2	Dióxido de carbono
DMSO	Sulfóxido de dimetila
F ou F-	Flúor
HCl	Ácido clorídrico
$HClO_4$	Ácido perclórico
KOH	Hidróxido de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
P	Fósforo
ppm	partes por milhão
ppmF	partes por milhão de flúor
SMH	Microdureza da superfície
TISAB	Tampão de ajuste de força iônica total
Verniz A	Base de verniz – sem flúor e sem CaGP (placebo)
Verniz B	Base de verniz contendo flúor (5,63%) – semelhante ao Duofluorid XII®
Verniz C	Base de verniz contendo CaGP (1%) sem F
Verniz D	Base de verniz contendo CaGP (5%) sem F
Verniz E	Base de verniz contendo CaGP (10%) sem F
Verniz F	Base de verniz contendo CaGP (1%) e F (5,63%)
Verniz G	Base de verniz contendo CaGP (5%) e F (5,63%)
Verniz H	Base de verniz contendo CaGP (10%) e F (5,63%)
Verniz I	Verniz Duraphat® (Colgate) contendo F (2,26%)
Δ%SMH	Mudança percentual na microdureza da superfície

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DE LITERATURA 17
2.1 CÁRIE DENTÁRIA 17
2.2 EROSÃO DENTÁRIA 18
2.3 GLICEROFOSFATO DE CÁLCIO 19
2.4 VERNIZES FLUORETADOS 20
3 PROPOSIÇÃO 22
3.1 OBJETIVO GERAL 22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
4 MATERIAIS E MÉTODOS 23
4.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR RELACIONADA AO USO DOS VERNIZES FLUORETADOS CONTENDO, OU NÃO, CaGP. 24
4.1.1 Análise da liberação de flúor dos vernizes 24
4.1.2 Análise da quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário após o uso dos vernizes de CaGP associado ao flúor 27
4.2 ESTUDO DO EFEITO DOS VERNIZES NA DESMINERALIZAÇÃO – *IN VITRO* 32
4.2.1 O efeito dos vernizes na desmineralização por cárie in vitro 32
4.2.2 O efeito dos vernizes de CaGP associado ao flúor, na progressão da desmineralização por erosão – in vitro 36
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 41
5 RESULTADOS 42
5.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR RELACIONADA AO USO DOS VERNIZES 42
5.1.1 Estudo da liberação de flúor dos vernizes de CaGP associado ao flúor 42
5.1.2 Análise da quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário após uso dos vernizes de CaGP associado ao flúor 45
5.2 ESTUDO DO EFEITO DOS VERNIZES NA DESMINERALIZAÇÃO – *IN VITRO* 47
5.2.1 Efeito dos vernizes na desmineralização por cárie artificial 47
5.2.2 O efeito dos vernizes na progressão da desmineralização por erosão – in vitro 48
6 DISCUSSÃO 53

6.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR RELACIONADA AO USO DOS VERNIZES DE CaGP ASSOCIADO AO FLÚOR 53

6.1.1 Análise da liberação de flúor dos vernizes de CaGP associado, ou não, ao flúor. 53

6.1.2 Análise da quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário apos o uso dos vernizes de CaGP associado ao flúor 57

6.2 ESTUDO DO EFEITO DOS VERNIZES NA DESMINERALIZAÇÃO – *IN VITRO* 60

6.2.1 Efeito dos vernizes na desmineralização por cárie artificial 60

6.2.2 O efeito dos vernizes na progressão da desmineralização por erosão – in vitro 62

6.3 DISCUSSÃO GERAL 67

7 CONCLUSÕES 72

REFERÊNCIAS 73

APÊNDICE - Resultados de experimentos preliminares 82

1 INTRODUÇÃO

Os principais problemas de saúde bucal que acometem a cavidade bucal de crianças e adolescentes e que estão associados à desmineralização dentária são a cárie e a erosão. Enquanto dados epidemiológicos nacionais e internacionais indicam que a prevalência de cárie dentária vem diminuindo nesses grupos populacionais (1, 2), observa-se o aumento da prevalência da erosão dentária (3).

A desmineralização dentária pode ocorrer devido à cárie ou à erosão. A cárie dentária é uma doença que resulta de uma perda localizada de minerais, cuja causa se deve aos ácidos presentes nos depósitos microbianos aderidos aos dentes (4).

A erosão dentária é definida como perda de estrutura da superfície do dente causada por um processo químico proveniente de agentes ácidos. A lesão de erosão é a conseqüência do processo de desmineralização por camadas da superfície do esmalte dentário, podendo ocorrer uma perda de estrutura e detalhes anatômicos, até haver exposição da dentina e a proximidade pulpar (5).

A prevenção da cárie ocorre com a remoção mecânica do biofilme e a presença de flúor na interface biofilme/dente. A presença do flúor promove a remineralização da lesão, portanto diversos materiais contendo flúor são utilizados na odontologia, dentre estes dentifrícios, géis e vernizes (6-8).

O principal fator na prevenção da erosão dentária é a redução da freqüência do contato do elemento dentário com os agentes erosivos, porém há a dificuldade do paciente comprometer-se a um novo regime de controle de ingestão de substâncias erosivas (9).

A utilização de vernizes fluoretados também foi proposta como medida preventiva para a erosão dentária (10-12), uma vez que eles têm a vantagem de promover um contato prolongado com o elemento dentário e, assim, criar uma proteção mecânica ao dente. A aplicação desses materiais já tem um efeito comprovado na prevenção da cárie dentária, mas mais estudos ainda estão sendo realizados para testar sua capacidade de prevenção da erosão (13, 14).

Agentes contendo cálcio, como o glicerofosfato de cálcio (CaGP) têm sido estudados e também podem reduzir a dissolução ácida do elemento dentário. O CaGP tem comprovada capacidade tampão e pode reduzir a dissolução ácida do

elemento dentário (15-17). A literatura não relata a ação do CAGP na forma de verniz associado ou não ao flúor

Uma das formas mais atuais de verificar a ação do flúor na desmineralização é.a técnica da abrasão da superfície do esmalte e, então, analisar o flúor fraca e fortemente aderido ao esmalte dentário. Este é analisado dissolvendo o pó do esmalte abrasonado, e o flúor fracamente aderido é considerado aquele solúvel em hidróxido de potássio (KOH) (18-20). Pode ser que a presença glicerofosfato de cálcio potencialize a ação do flúor, e juntos sejam um composto efetivo frente a desafios ácidos.

Desta forma, torna-se importante estudar o efeito de vernizes com diferentes concentrações de CaGP, associado ou não ao flúor, frente a desafios cariogênicos e erosivos para prevenir a desmineralização dentária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÁRIE DENTÁRIA

A doença cárie já foi descrita na literatura como uma doença infecciosa e transmissível. Atualmente, considera-se que a doença cárie dentária resulta de uma mudança ecológica no biofilme dental, levando a um desequilíbrio mineral entre o fluido da placa e o dente, causando a perda mineral (21).

Esta enfermidade tem como etiologia diversas causas. No ambiente oral, microorganismos podem aderir-se aos tecidos duros formando um biofilme dental. Este biofilme, *a priori*, é não cariogênico e é formado pela flora residente. Caso o biofilme não seja removido, ou desorganizado, ocorre uma mudança no tipo de microorganismos que colonizam este biofilme, tornando-o um biofilme maduro e cariogênico (22).

Em um biofilme não cariogênico e com a presença de flúor na interface dente/biofilme, há um equilíbrio entre as concentrações dos íons minerais que se difundem para fora do elemento dentário assim como os íons depositados. Deve-se buscar esse equilíbrio na desmineralização (DES) e remineralização (RE) na interface dente/biofilme, mantendo, assim, um ambiente saudável (8).

A ingestão de alimentos cariogênicos em um ambiente intra-oral onde há um biofilme maduro leva os microorganismos a fermentarem os açúcares presentes no alimento e a liberarem ácido ao meio. Isso causa uma queda no pH do filme e uma alteração no equilíbrio DES-RE na interface dente/biofilme. Nesse caso, uma maior quantidade de íons minerais difunde do dente para o meio. Essa maior quantidade de desmineralização em relação à remineralização causa a lesão de cárie(22).

A lesão de cárie ocorre nos tecidos duros orais, no esmalte, dentina e cemento. No esmalte, as lesões iniciam-se na subsuperfície, tendo uma aparência de mancha branca. As lesões de mancha branca ativas podem ser controladas com um hábito de higiene oral saudável e a aplicação de flúor (23).

A presença do flúor (F^-) no meio oral pode remineralizar lesões de cárie, assim como prevenir a formação de novas lesões (23). A prevalência da cárie

diminuiu no Brasil e no mundo (1, 2) e isso se deve ao aumento no uso de materiais odontológicos fluoretados (6, 24, 25), dentre esses os dentifrícios, géis e vernizes.

2.2 EROSÃO DENTÁRIA

A erosão dentária ocorre quando um agente ácido banha as superfícies dentárias livres da proteção do sistema tampão da placa e do fluido da placa. Ocorre, então, uma perda mineral crônica, localizada, e sem dor para o indivíduo. Esses agentes ácidos podem ser extrínsecos ou intrínsecos (10, 11, 26-28).

Dentre os agentes extrínsecos, podem-se citar medicamentos com baixo pH ou ácidos presentes na dieta e bebidas, principalmente refrigerantes e sucos industrializados(5, 29-31).

O principal agente intrínseco é o ácido gástrico, presente na cavidade oral devido ao vômito recorrente, que está associado a desordens psicológicas, ou ao refluxo gástrico (32, 33).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil encontraram prevalência de erosão em 10 a 45% em adolescentes entre 12 a 14 anos (34, 35). Ainda, a prevalência em crianças mais novas, entre 3 e 5 anos, foi de 51,6% (14) e em crianças entre 6 e 12 anos foi de 19,9% (36). Deve-se ressaltar a importância da prevenção dessa lesão nessa faixa etária, uma vez que o desenvolvimento dessas lesões pode progredir (3). Contudo, um estudo recente mostrou que a erosão dentária em baixa severidade em adolescentes entre 11 e 14 anos de idade não causou um impacto negativo significante na qualidade de vida relacionada à saúde oral (37).

Estudos *in vitro* e *in situ* indicam que fluoretos podem reduzir a perda mineral erosiva do esmalte e da dentina. Assim, géis (38), colutórios (39), dentifrícios (40) e vernizes fluoretados (41) podem ser utilizados no controle da erosão dentária.

Há na literatura um estudo relatando que um composto orgânico contendo cálcio, o lactato de cálcio, quando adicionado a um alimento cariogênico e erosivo, como, por exemplo, o bombom, pode reduzir o potencial erosivo do alimento (42). Outro composto orgânico, a fosfopeptídeo de caseína que estabiliza o fosfato de cálcio amorfo (CPP-ACP), também tem a capacidade de prevenção da erosão

dentária, uma vez que o mesmo age como uma reserva de fosfato de cálcio e auxilia na remineralização do tecido dentário (17, 43). Parece que compostos orgânicos contendo cálcio podem auxiliar na prevenção da erosão dentária.

2.3 GLICEROFOSFATO DE CÁLCIO

Desde a década de 1930, estudos demonstram o efeito do fosfato de cálcio [$Ca_3(PO_4)_2$] na desmineralização do esmalte dentário (44, 45). Assim, foi sugerido que agentes protetores naturais, principalmente com base em fosfato de cálcio presentes em alimentos, pudessem reduzir a descalcificação dos dentes e, assim, atuar sobre a cárie dentária.

O Glicerofosfato de Cálcio (CaGP) é uma molécula orgânica com parte de fosfato e de cálcio, tendo a fórmula $CH_2OH\text{-}CHOH\text{-}CH_2O\text{-}PO_3Ca$, $2H_2O$. O composto é encontrado em forma de pó branco de granulação fina.

O efeito anti-cárie do glicerofosfato de cálcio foi demonstrado em roedores, adicionando o fosfato orgânico na água de consumo ou na dieta dos animais. Em um primeiro experimento em ratos, o CaGP adicionado à dieta (em concentração de 2% a 4%) teve um efeito protetor (46). Em outro estudo com *hamsters*, o CaGP foi também adicionado à dieta (2% e 5%) ou à solução (2% ou 5%) utilizada para escovar os dentes dos animais. Os dados demonstraram que o efeito protetor do CaGP seguiu uma relação dose-resposta, tanto pela escovação quanto pela dieta (47), sendo que uma concentração de 2% ou maior na água apresentou redução significante da cárie. Porém, acredita-se que a ação do CaGP é mais local que sistêmica.

Com base nesses achados, dois estudos clínicos foram realizados utilizando dentifrícios com CaGP e Monofluorofosfato de Sódio (SMFP). Em um primeiro estudo, crianças que utilizavam dentifrícios com CaGP (0,13%) e Flúor, por um período de 3 anos, tiveram menores índices de cárie, porém não houve diferença significante (48). Em um estudo longitudinal subseqüente, que envolveu 923 crianças, dentifrícios contendo flúor e/ou CaGP foram comparados. O dentifrício com CaGP e F^- reduziu significantemente o índice de cárie (16), porém existe controvérsias em relação a concentração do CaGP para haver este efeito (49).

Lynch (2004) (50) descreve que o efeito anti-cariogênico do CaGP pode ser diretamente no esmalte ou no pH do biofilme. O CaGP pode reduzir a dissolução ácida do esmalte dentário, agindo independentemente do flúor, interagindo diretamente com as camadas mais externas de hidroxiapatita. Em um estudo de modelo *in vitro*, o CaGP em solução demonstrou uma redução na desmineralização do esmalte (51).

No mesmo estudo (51), em que os pesquisadores desenvolveram ciclagem de pH utilizando um modelo de biofilme em célula de fluxo, foi observado que o número de *Streptococcus mutans* cresceu no biofilme, independente da presença de soluções contendo CaGP em concentrações mínimas (0,1%, 0,25% e 0,5%).

Alguns estudos sugerem que o CaGP tem um efeito tampão no biofilme, pois quando adicionados a soluções de sacarose (10%) em concentrações de 0,25% a 1,0%, o CaGP foi capaz de reduzir a queda do pH do biofilme em macacos (15). Esse efeito tampão pode, ainda, ser devido a um aumento no conteúdo de fósforo na placa dentária, pois o uso de dentifrícios com CaGP aumentou as concentrações de íons de Ca e P no biofilme (52, 53).

Como visto, o CaGP foi incorporado à dentifrícios para a prevenção da cárie dentária. Devido às propriedades do CaGP de reduzir a dissolução ácida do elemento dentário, reduzindo a queda do pH no biofilme e aumentando o conteúdo de fosfato próximo à superfície do dente, parece que este composto pode auxiliar na prevenção da erosão dentária.

2.4 VERNIZES FLUORETADOS

Os vernizes fluoretados surgiram no final da década de 1960, início da década de 1970, e durante os anos 1980 já estavam sendo freqüentemente utilizados em países europeus. Desde então, existem diversas publicações do uso de vernizes utilizados no controle de lesões cariosas em crianças (54-58).

O amplo uso de vernizes fluoretados na Odontologia se deve principalmente à boa aceitação pelos pacientes, uma vez que o procedimento de aplicação é seguro, conveniente e indolor (55).

O mecanismo de ação dos vernizes fluoretados pode estar relacionado ao metabolismo dos microorganismos presentes no biofilme (59), onde alguns ingredientes do verniz poderiam afetar o metabolismo microbiano limitando o crescimento celular, ou pode atuar diminuindo significantemente o número de microorganismos *Streptococcus mutans* no biofilme (60). Outro provável mecanismo de ação é a criação de uma reserva de fluoretos na superfície do esmalte dentário, pelo depósito de fluoreto de cálcio (CaF_2), e a liberação lenta dos íons durante um desafio cariogênico. Esta camada de CaF_2 é estável quando o pH é neutro, mas é dissolvida durante desafios cariogênicos e erosivos (61, 62).

Seria ideal um verniz que, além de íons de flúor, também pudesse fornecer ao meio oral íons de cálcio e fosfato. O aumento na concentração desses íons no meio oral, ocorre uma diminuição na desmineralização, causada por desafios cariogênicos e erosivos, e pode promover a remineralização da subsuperfície do esmalte dentário (8).

Uma vez que vernizes fluoretados permanecem em contato com a superfície dentária por um período mais prolongado, ocorre uma maior formação de fluoreto de cálcio nestas superfícies (58), estes agentes também foram testados em desafios erosivos.

Estudos *in vitro* indicam que o verniz fluoretado pode promover uma proteção mecânica da superfície contra erosão, isso se deve ao contato prolongado. Adicionalmente, ainda há a proteção que advém do próprio flúor (63, 64).

Um verniz contendo TiF_4 foi, então, testado *in vitro* e demonstrou a capacidade de diminuir a desmineralização e aumentar a remineralização de esmalte bovino em ciclagem de pH para lesão de cárie (65).

Vieira e colaboradores (2007) (12) demonstraram que os vernizes fluoretados Fluor Protector® e outro à base de difluorosilano a 1% foram capazes de reduzir efetivamente a progressão do desgaste sobre a superfície dentária promovido por erosão/abrasão *in situ*, porém ainda não há registro na literatura de experimentos utilizando um verniz fluoretado, ou não, contendo glicerofosfato de cálcio.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito preventivo do verniz de glicerofosfato de cálcio utilizado associado ao flúor frente a desafios cariogênicos e erosivos em esmalte dentário.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a quantidade de flúor liberada pelos vernizes de glicerofosfato de cálcio associado ao flúor;
2. Avaliar a quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário após aplicação dos vernizes de glicerofosfato de cálcio associado ao flúor;
3. Avaliar a capacidade do verniz contendo CaGP associado ao F em prevenir desmineralização do esmalte dentário por cárie *in vitro*;
4. Avaliar o potencial do verniz contendo CaGP associado ao F em prevenir a progressão das lesões erosivas iniciais *in vitro.*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo, foram elaborados oito vernizes:

A) Base de verniz – sem flúor e sem CaGP (placebo);

B) Base de verniz contendo flúor (5,63% flúor: 2.71% F como NaF e 2.92% como CaF_2]; pH=8.0) sem CaGP – semelhante ao Duofluorid XII®;

C) Base de verniz contendo CaGP (1%) sem F;

D) Base de verniz contendo CaGP (5%) sem F;

E) Base de verniz contendo CaGP (10%) sem F;

F) Base de verniz contendo CaGP (1%) e F (NaF/CaF_2 5,63%; pH=8.0);

G) Base de verniz contendo CaGP (5%) e F (NaF/CaF_2 5,63%; pH=8.0);

H) Base de verniz contendo CaGP (10%) e F (NaF/CaF_2 5,63%; pH=8.0).

Como controle positivo, utilizou-se o verniz (I) Duraphat® (2,26% NaF; pH=4,5) e, como controle negativo, utilizou-se um grupo sem verniz, totalizando 10 grupos inicialmente.

Este capítulo, assim como os seguintes, está dividido em duas partes. Primeiramente serão dadas informações sobre a concentração de flúor relacionada ao uso dos vernizes (item 4.1), que está subdividida em dois itens.

Posteriormente serão fornecidas,informações sobre o efeito dos vernizes na desmineralizaçao *in vitro* (item 4.2) que também está subdividida em dois itens.

Quatro estudos foram realizados com o objetivo de:

4.1.1 Conhecer a quantidade de flúor que é liberada pelos vernizes ao meio;

4.1.2 Pesquisar a quantidade de flúor que se adere ao esmalte dentário, o qual pode estar fraca ou fortemente aderido;

4.2.1 Avaliar o potencial do verniz contendo CaGP associado ao F em prevenir a desmineralizaçao de cárie *in vitro*;

4.2.2 Analisar o potencial do verniz contendo CaGP associado ao F em prevenir a progressão das lesões erosivas iniciais *in vitro..*

4.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR RELACIONADA AO USO DOS VERNIZES FLUORETADOS CONTENDO, OU NÃO, CaGP.

4.1.1 Análise da liberação de flúor dos vernizes

Placas de acrílico (n=100) de tamanhos padronizados de 10mmx10mmX1mm foram obtidas e distribuídas em dez grupos (n=10):

(i) Grupo controle negativo – blocos sem verniz;
(ii) Verniz A, sem flúor e sem CaGP (placebo);
(iii) Grupo controle positivo –Verniz I, Duraphat®;
(iv) Verniz B, contendo apenas flúor sem CaGP – semelhante ao Duoflorid XII®;
(v) Verniz C, contendo CaGP (1%) sem F;
(vi) Verniz D, contendo CaGP (5%) sem F;
(vii) Verniz E, contendo CaGP (10%) sem F;
(viii) Verniz F, contendo CaGP (1%) e F;
(ix) Verniz G, contendo CaGP (5%) e F;
(x) Verniz H, contendo CaGP (10%) e F.

4.1.1.1 Preparaçao das amostras

Para esta etapa, foram utilizados 600 frascos de poliestireno com tampas flexíveis, de volume de 15mL (66). Utilizando uma pipeta, 10mL de água deionizada foram transferidos para cada frasco.

Antes do início do experimento, os blocos de acrílico foram fixados às tampas de 100 frascos. Um pedaço de fio de nylon foi fixado à face inferior dos blocos com cera utilidade, e, por sua vez, este pedaço de fio de nylon foi fixado à tampa do frasco também com cera utilidade. Dessa forma os blocos permaneceram suspensos, sem tocar nas bordas dos frascos, durante todo o experimento.

Com o auxílio de *microbrush* e uma balança analítica, 300µg de cada verniz foi pincelado sobre uma das faces dos 10 blocos de acrílico de seu respectivo grupo [(ii) – (x)]. Os blocos de acrílico do grupo controle negativo (i) não receberam nenhum tratamento. Após aplicação do verniz, cada bloco foi individualmente imerso em um frasco contendo 10mL de água deionizada.

Durante o decorrer do experimento, as tampas dos frascos com os blocos de acrílico foram transferidas para um novo frasco com igual quantidade de água deionizada. Essa troca foi realizada após 1h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h do início do experimento (66). Um total de 100 blocos foram mantidos em água durante 6 intervalos de tempo, variando de 1h a 72 horas, totalizando em 600 amostras de água para análise. Após o experimento, esses frascos foram mantidos à 5°C para futura análise do conteúdo de flúor.

4.1.1.2 Análise da concentração de flúor liberada pelos vernizes

A liberação de flúor foi avaliada por meio de eletrodo sensível aos íons F^-. O eletrodo foi lavado com água deionizada corrente e calibrado utilizando até 6 padrões de flúor de concentrações seqüentes. Os padrões foram preparados com diluição seriada a partir de um padrão de 100ppmF. Os padrões utilizados neste estudo variaram entre 0,02 e e 51,2 ppmF. Todos os padrões e as amostras foram tamponados com tampão de ajuste de força iônica total (TISAB III).

Após calibração do eletrodo e verificação de *slope* igual ou superior a 0,99, deu-se início às análises do estudo. Uma nova calibração foi realizada antes de iniciar as leituras de cada grupo. As leituras de flúor foram feitas em porções de 1mL de cada amostra de água. Então, alíquotas de 1mL de cada amostra de água foram tamponados com solução de TISAB III e levados ao eletrodo para a medida de flúor. O eletrodo de flúor determina a concentração de flúor dando uma leitura em milivoltagem. A partir deste valor em milivoltz, a concentração de flúor é calculada para microgramas por litro (µg/L).

Cada uma das 600 amostras de água foi avaliada em duplicata e a concentração de flúor para cada amostra foi determinada através da média entre as duas leituras. Posteriormente, a média entre as dez amostras foi calculada para

obter a concentração de fluoreto liberado pelo verniz de um determinado grupo, para um determinado intervalo de tempo.

4.1.1.3 Análise Estatística

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar se os dados de cada grupo tinham distribuição normal. A média de cada grupo foi plotada em um gráfico, porém, devido à condição de intervalos de tempo diferentes entre cada troca de água, foi necessário calcular a área sob a curva, entre cada intervalo de tempo, para análises entre os diferentes tempos do experimento.

A área sob a curva foi calculada da seguinte forma:

- Os tempos (t_n) foram contados em número de horas, sendo que os valores de 1, 8, 12, 24, 48 e 72 (horas) foram considerados como: t_1, t_2, t_3, t_4, t_5 e t_6, respectivamente;
- A concentração de flúor (em ppm) medida em cada um desses tempos (F_n) foi considerada como: F_1, F_2, F_3, F_4, F_5 e F_6, respectivamente.

Dessa forma, o cálculo para a área sob a curva (AUC) para o intervalo de tempo t_n a t_{n+1} foi realizado utilizando a fórmula:

$$AUC\ (t_n\text{-}t_{n+1}) = [(F_{n+1}+F_n) / 2]x(t_{n+1} – t_n)$$

Assim, foram obtidos 5 valores de AUC para cada amostra de verniz, para os intervalos 1h-8h (t_1-t_2), 8h-12h (t_2-t_3), 12h-24h (t_3-t_4), 24h-48h (t_4-t_5) e 48h-72h (t_5-t_6). Também, para verificação de possíveis diferenças na quantidade de flúor liberada pelos vernizes durante todo o experimento, foi calculada a AUC total (AUC_{total}), somando-se os cinco intervalos obtidos de cada amostra. A média de cada intervalo de AUC e AUC_{total} de cada grupo foi tabulada e, posteriormente, as medidas foram analisadas para comparações entre os grupos e intervalos de tempo.

Para as comparações entre os grupos e intervalos de tempo, foi realizado o teste de modelo linear geral para medidas repetidas utilizando os cinco valores de AUC calculados. Dessa forma, pode-se comparar a liberação de flúor entre os grupos, levando em consideração o efeito do tempo como co-variável.

4.1.2 Análise da quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário após o uso dos vernizes de CaGP associado ao flúor

Este estudo foi realizado como parte do programa Doutorado Sanduíche na Universidade de Berna, na Suíça, sob co-orientação do professor Adrian Lussi.

Para este estudo, foram utilizados apenas os vernizes:

(i) Grupo controle positivo – Verniz I, Duraphat®;

(ii) Verniz B, contendo apenas flúor (NaF 6%) sem CaGP – semelhante ao Duoflorid XII®;

(iii) Verniz F, contendo CaGP (1%) com F;

(iv) Verniz G, contendo CaGP (5%) com F;

Os vernizes dos grupo (iii) e (iv) foram escolhidos para compor esses estudos pois apresentaram melhor liberação de flúor que o verniz contendo 10% CaGP, portanto, estes poderiam apresentar um melhor potencial para remineralizar o esmalte dentário. Esses vernizes serão comparados aos demais grupos. Os demais grupos contém apenas flúor e servirão como controle positivo para comparar o efeito do CaGP presente nos vernizes-teste.

4.1.2.1 Preparação das amostras

Foram selecionados 108 molares permanentes para este estudo. Os dentes foram avaliados para a ausência de trincas e defeitos e para a ausência de desmineralização. Os dentes foram seccionados na cervical para a remoção de suas raízes e, posteriormente, tiveram suas coroas cortadas ao meio no sentido mesio-distal para a obtenção de uma hemi-coroa contendo a superfície vestibular integral. As superfícies vestibulares dos dentes foram lixadas em lixas de granulaçao 500 para a planificação da superfície. Posteriormente, as hemi-coroas foram seccionadas ao meio, numa linha imaginária que cortava a superfície recentemente planificada na metade. Cada dente foi numerado em seqüência, de 1 a 108, e cada uma das duas partes de cada dente foram aleatoriamente marcadas como *a* e *b*. As

amostras *a* tiveram o tratamento com o verniz fluoretado e as amostras *b* passaram pelo mesmo procedimento que as anteriores, mas não tiveram o tratamento com flúor. Dessa forma, as amostras *b* são consideradas como controle do próprio dente.

As amostras de esmalte foram embutidas em resina acrílica autopolimerizável e depois tiveram 100µm da superfície vestibular desgastadas em lixa de granulação 1000 (granulação de 18µm) durante 30 segundos. Após esse procedimento, um total de 500µm havia sido removido da superfície vestibular dos dentes. Então, as superfícies de esmalte foram polidas utilizando lixas de granulação 2400 e 4000 (granulação de 8µm e 5µm, respectivamente), e, depois, utilizando feltro e pasta de diamante de granulação 3µm, com duração de 1 minuto para cada etapa. Entre cada etapa de alisamento e polimento, os blocos foram submetidos a 3 minutos de sonificação.

As amostras foram então fotografadas em microscópio Leica acoplado com uma câmera digital e lentes Leica 1:6. As fotografias foram realizadas em um aumento de 16X. Utilizando um programa de computador IM500, a área das superfícies de esmalte de cada amostra foram medidas em μm^2 e posteriormente calculadas para cm^2. Durante essa etapa, os dentes também foram analisados para verificar se havia área de esmalte suficiente para a realização do experimento ou se havia dentina exposta nessa superfície. Um terço das amostras (33,3%) foram excluídas, restando, assim 72 pares de amostras (*a* e *b*).

As amostras foram aleatoriamente distribuídas nos 4 grupos (n=18), de acordo com os vernizes utilizados.

4.1.2.2 Tratamento das amostras com o verniz de CaGP associado ao flúor

As amostras denominadas *a* receberam uma camada de 0,025g do respectivo verniz fluoretado e foram mantidas em 100% de umidade a 30°C durante 4horas. As amostras *b* também foram mantidas nas mesmas condições, porém não receberam tratamento com vernizes fluoretados.

Após as 4 horas, a camada de verniz fluoretado foi removida dos blocos utilizado uma lâmina de bisturi, depois, utilizou-se uma bolinha de algodão

umedecida com acetona sobre a superfície do esmalte durante 10 segundos para a remoção de restos do verniz (Apêndice A [A.1.2]).

Posteriormente, foi utilizada a técnica de Caslavska et al. (1975) (19) para medir a concentração de flúor fracamente aderida ao esmalte dentário. Depois desse procedimento, analisou-se também a concentração de flúor fortemente aderida ao esmalte.

4.1.2.3 Análise da concentração de flúor fracamente aderida ao esmalte dentário

Antes dessa etapa, as amostras foram avaliadas para verificar se havia alguma outra área de esmalte ou dentina exposta, além da superfície vestibular previamente polida e medida. Áreas do dente, senão as áreas do experimento, que estavam expostas foram revestidas com uma camada de resina Technovit (Technovit®, Germany). As amostras de esmalte, tanto as amostras *a* como as amostras *b*, foram, então, imersas individualmente em 10mL de hidróxido de potássio (KOH) a uma concentração de 1M, a 25°C durante 24h em agito constante (19). Os frascos foram mantidos em uma câmara hermeticamente fechada e a vácuo para impedir a interferência da presença de CO_2 na solução de KOH (Apêndice A [A.1.3.1]).

Após 24 horas, as amostras foram removidas da solução de KOH. Os frascos contendo esta solução foram mantidos fechados a 5°C até a hora da análise para a concentração de flúor utilizando um eletrodo específico. Já as amostras de esmalte foram utilizadas para avaliar a concentração de flúor fortemente aderida ao esmalte dentário.

4.1.2.4 Análise da concentração de flúor fortemente aderida ao esmalte dentário

Utilizando um adesivo dentário, as amostras de esmalte foram fixadas em suportes metálicos de forma que a superfície de esmalte ficasse paralela à superfície da lixa. Um aparelho (Technischer Betrieb, Universitätsklinikum Freiburg,

Freiburg, Germany) foi especialmente construído para medir e lixar o esmalte dentário das amostras.

As amostras do esmalte foram lixadas utilizando lixa de granulação 1000. Antes de iniciar a remoção das camadas do esmalte, a lixa foi pré-tratada com ácido perclórico ($HClO_4$) (0,72mL/cm^2) a uma concentração de 3% durante 8 horas a 25°C. A lixa foi, então, seca e cortada em tiras de 9,0 X 1,0 cm que foram, por sua vez, utilizadas para lixar as camadas de esmalte.

Cada tira de lixa foi designada a um frasco de acrílico. O conjunto de lixa mais frasco foi pesado em balança de precisão antes de iniciar o experimento. Depois, uma tira de lixa e uma amostra de esmalte foram fixadas ao aparato. O aparato contém um medidor micrométrico que mede a quantidade de esmalte que está sendo lixada. Dessa forma, foi possível lixar 50µm da camada mais superficial do esmalte. Após lixar o esmalte, a lixa foi retirada do aparato e recolocada em seu respectivo frasco acrílico, juntamente com o pó do esmalte que foi lixado. Essa lixa foi cortada em pequenos pedaços para posterior dissolução do esmalte. Os frascos contendo a mesma lixa e, agora, com o pó do esmalte foram pesados mais uma vez, e dessa forma, pôde-se calcular o peso da quantidade de esmalte removida da amostra.

O mesmo procedimento foi repetido nas amostras. Assim, duas camadas de esmalte foram lixadas, uma camada mais superficial de 50µm, e outra mais profunda de mesma espessura. Apenas uma tira de lixa foi utilizada para a remoção de uma camada de 50µm de esmalte. Todas as amostras de esmalte em pó foram pesadas para poder obter a concentração de flúor em g de flúor por kg de esmalte (g F/kg esmalte).

Adicionou-se 1mL de ácido clorídrico (HCL) a 0,5M a cada frasco contendo a lixa e o esmalte em pó (Apêndice A [A.1.3.2]). Os frascos foram mantidos a 25°C durante 24 horas sob agito constante para dissolução do esmalte. Esse ácido foi, posteriormente, neutralizado e analisado para a quantidade de flúor na camada do esmalte que foi lixada.

4.1.2.5 Análise da concentração de flúor nas soluções

Os dois passos anteriores desse experimento explicaram como foram obtidas soluções para a análise da concentração de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte. Essas duas etapas produziram soluções alcalina (de KOH) e ácida (HCL), respectivamente.

Para as análises das soluções contendo KOH, utilizou-se o protocolo de análise de concentração de flúor em soluções alcalinas/básicas, conforme estabelecido pelo fabricante do eletrodo (PerfectION™, Mettler Toledo, Switzerland) (Apêndice A [A.1.3].).

De cada amostra de KOH, foram pipetadas duas alíquotas de 100µL cada. À esta alíquota, adicionou-se 900µL de acetato de potássio para tamponar a solução. Padrões de flúor de concentração de 0,2 a 5,0 ppm foram preparados respeitando as soluções utilizadas nas amostras. O eletrodo foi previamente calibrado e as amostras foram lidas em duplicata. A cada nova série, uma nova calibração foi realizada.

Para as análises das amostras de ácido, as análises foram feitas utilizando todo o volume de ácido em cada amostra (1 mL). Para tanto, adicionou-se 1mL de solução TISAB II contendo 20g de NaOH por litro (67). O eletrodo específico para flúor foi previamente calibrado com padrões de flúor de concentrações (0,04 a 1,25 ppmF) preparadas de acordo com os reagentes utilizados no experimento. Depois a concentração de flúor foi calculada para grama de flúor por kilo de esmalte.

4.1.2.6 Análise estatística

Para verificar a diferença entre o grupo teste e o grupo controle, para cada verniz utilizado, foi realizado o teste de Wilcoxon Signed Ranks. Posteriormente, o teste de Kruskal-Wallis foi realizado para verificar as diferenças entre os grupos, tanto no grupo teste, como no grupo controle; e o teste *post-hoc* de Wilcoxon Rank Sum foi aplicado para verificar entre quais grupos ocorria a diferença. O nível de significância utilizado foi de 0.05 com ajuste de Bonferroni-Holm para múltiplas comparações.

Análises de correlação foram realizadas entre os resultados da quantidade de flúor fracamente aderida ao esmalte e a quantidade de flúor fortemente aderida à

camada mais externa de esmalte, assim como entre a quantidade de flúor presente nesta camada e na camada mais interna de esmalte.

4.2 ESTUDO DO EFEITO DOS VERNIZES NA DESMINERALIZAÇÃO – *IN VITRO*

Para verificar o efeito do verniz na desmineralização do esmalte, foram realizados dois estudos *in vitro*, utilizando esmalte de dente bovino ou humano. Para estes estudos, foram escolhidos 5 vernizes, os quais compuseram 5 dos 6 grupos de estudo, pois um grupo foi denominado grupo controle, onde as amostras não receberam o verniz:

(i) Grupo controle negativo, sem verniz;
(ii) Verniz A, base de verniz sem fluoreto e sem CaGP;
(iii) Verniz I, fluoretado sem CaGP– Duraphat®;
(iv) Verniz B, fluoretado sem CaGP – semelhante ao Duofluorid XII®;
(v) Verniz F, contendo CaGP (1%) e F;
(vi) Verniz G, contendo CaGP (5%) e F;

Assim como explicado anteriormente, os vernizes dos grupos (v) e (vi) foram escolhidos porque apresentaram melhor liberação de flúor que o verniz contendo 10% CaGP. Também, o primeiro grupo (i), sem verniz, serve como controle negativo, para verificar o comportamento das amostras quando não recebem nenhum tipo de tratamento. E o verniz do grupo (ii) não contém nem flúor, nem CaGP, é apenas a base do verniz. Alguns estudos sugerem que um possível efeito dos vernizes em testes *in vitro* é mecânico, por apresentar remanescentes sobre o elemento dentário (64, 68). Para verificar se existe este efeito nos estudos deste trabalho, os pesquisadores envolvidos optaram por inserir o grupo (ii).

4.2.1 O efeito dos vernizes na desmineralização por cárie in vitro

4.2.1.1 Obtenção dos blocos de esmalte e avaliação da microdureza superficial inicial (SMH_1).

Foram utilizados 60 dentes bovinos hígidos. Os dentes foram cortados, sob refrigeração, em uma cortadeira ISOMET *Low Speed Saw* utilizando disco diamantado, para a obtenção de blocos de esmalte, em formato quadrado, no tamanho 4mm x 4mm. Posteriormente os blocos foram montados e fixados sobre discos de resina acrílica autopolimerizável. Os discos de resina contendo os blocos de esmalte foram levados à politriz para aplanar e polir o esmalte. Esse procedimento foi realizado utilizando seqüencialmente lixas de granulações 320, 600 e 1200, e, posteriormente, foi utilizado disco de feltro úmido com solução de diamante (1µm) (39). Dessa forma, foram obtidos 60 blocos de esmalte, polidos e planos.

Os 60 blocos de esmalte foram submetidos ao teste de microdureza superficial inicial (SMH_1) do tipo Knoop. Os blocos foram montados no aparelho de microdureza superficial (SHIMATZU), e 5 endentações foram realizadas em série, lado a lado, com o longo eixo em linha reta. As endentações foram realizadas com uma carga de 50g durante 5 segundos, cada endentação a uma distância de 100µm da anterior. A microdureza superficial inicial de cada bloco foi obtida calculando-se a média dos cinco valores mensurados no bloco.

Os blocos de esmalte foram individualmente numerados para futuras comparações. Posteriormente, os blocos foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos, conforme descrito acima. Antes de iniciar o estudo, uma análise de variância foi realizada com os valores de Microdureza Superficial Inicial de cada grupo, a fim de verificar se os 6 grupos tinham médias de dureza superficial iguais no início do experimento ($p>0,05$). Dessa forma, observando-se que os grupos estavam iguais no início do experimento, possíveis diferenças encontradas no final do experimento podem ser atribuídas aos diferentes tratamentos realizados.

4.2.1.2 Ciclagem de cárie in vitro

Inicialmente, os blocos de esmalte receberam duas camadas de esmalte de unha incolor que cobria metade do bloco. Posteriormente, os blocos receberam uma camada do verniz teste, de acordo com o grupo (ii a vi). Os blocos do grupo (i) não receberam nenhum verniz, e a superfície do esmalte dentário permaneceu exposta às soluções experimentais durante todo o procedimento.

Assim que os blocos receberam a camada de verniz, eles foram imersos individualmente em solução desmineralizante (30mL de solução por bloco) e mantidos à 37°C durante 6 horas . Esta solução era composta por: 2.0mM CaCl2, 2,0mM NaH_2PO_4; 0,075mM tampão de acetato, 0,02ppm flúor, pH=4,6 (69).

Após as 6h de exposição na solução desmineralizante, os blocos foram lavados em água deionizada corrente durante 20 segundos. Posteriormente, o verniz teste foi cuidadosamente removido dos blocos, utilizando uma lâmina de bisturi e bolinha de algodão imersa em acetona. Tomou-se muito cuidado para que a lâmina de bisturi não tocasse na superfície do esmalte. Como a acetona também removeu a camada de esmalte de unha, essa camada foi novamente aplicada sobre os blocos de esmalte no mesmo local onde se encontravam anteriormente. Os blocos de esmalte foram, então, individualmente imersos em solução remineralizante (15mL de solução por bloco) e mantidos à 37°C durante 18 horas. A solução remineralizante era composta por: [1.5 mmol L^{-1} $CaCl_2$, 0.9 mmol L^{-1} NaH_2PO_4, 150 mmol L^{-1} KCl, 0.1 mol L^{-1} tampão Tris, 0.03 ppm F, pH 7.0, 37 °C] (69).

A cada troca de solução, os blocos de esmalte eram lavados em água deionizada corrente durante 20 segundos. A camada de verniz fluoretado foi aplicada apenas no primeiro dia do ciclo. O ciclo foi repetido durante 8 dias, sendo que após o 5° dia, os blocos de esmalte foram imersos em solução remineralizante onde permaneceram durante 66 horas (equivalendo ao período do final de semana). No 8° dia (após as 66 horas em solução remineralizante) as amostras foram lavadas e mantidas em câmara úmida, à 4°C (geladeira) até o momento de medição da microdureza superficial final (SMH_2) (Figura 1).

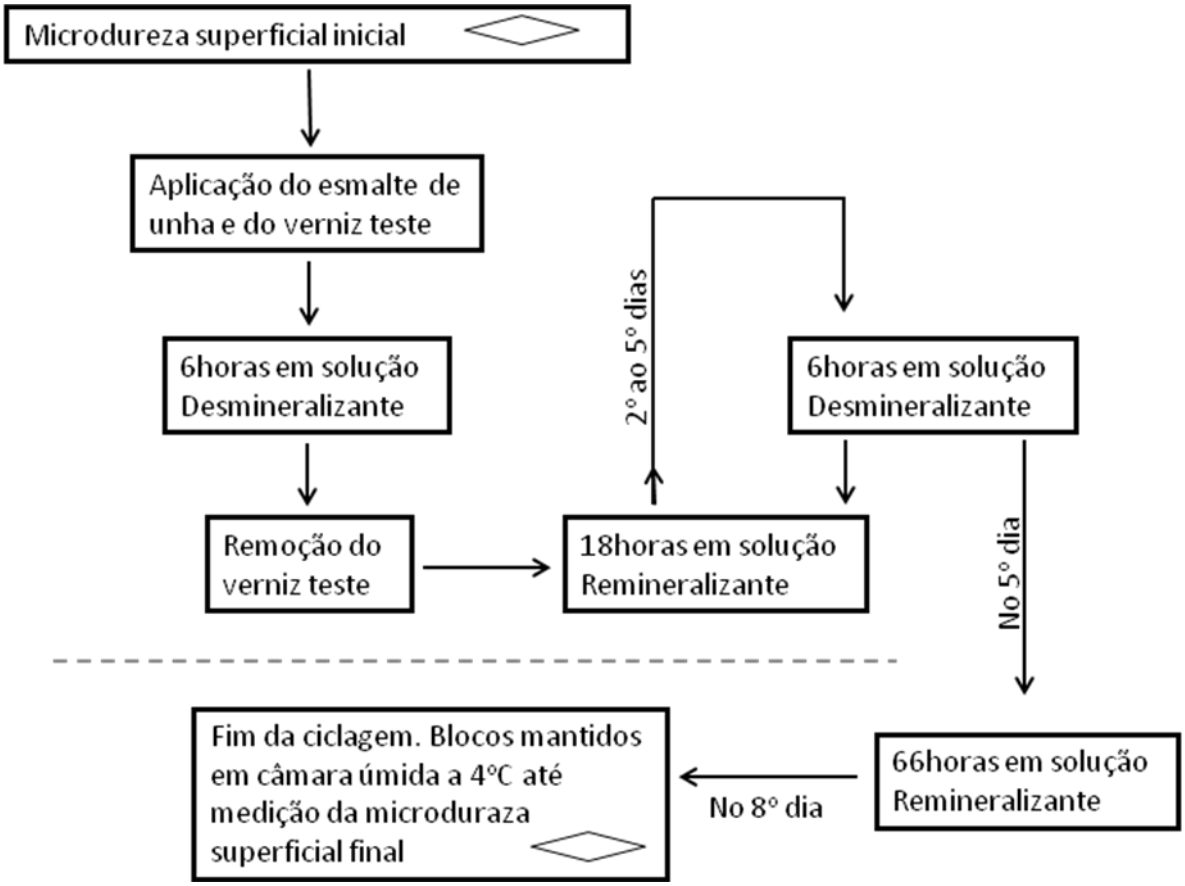

Figura 1. Fluxograma da ciclagem de cárie indicando os tempos e momentos de desmineralização e remineralização aos quais as amostras foram submetidas

4.2.1.3 Medição da microdureza final (SMH_2)

Para a medição da microdureza superficial final, os blocos foram limpos utilizando uma bolinha de algodão umedecida em acetona. As medições finais foram realizadas da mesma forma para a medição da microdureza superficial inicial, sendo que foram realizadas em série, lado a lado, com o longo eixo em linha reta, utilizando uma carga de 50g durante 5 segundos e uma distância de 100µm entre cada endentação. Porém, todas as 5 endentações utilizadas para calcular o valor da microdureza superficial final foram realizadas na metade do bloco anteriormente expostas às soluções (na metade do bloco onde não foi aplicado o esmalte de unha).

4.2.1.4 Análise Estatística

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar se os dados de cada grupo, iniciais e finais, tinham distribuição normal. Conforme explicado acima, foi realizado o teste *One-way* ANOVA nos valores iniciais a fim de verificar se os grupos eram considerados iguais no início do experimento. Posteriormente, calculou-se a mudança percentual da microdureza superficial de cada bloco (Δ%SMH). Esse cálculo foi realizado com a fórmula: $\Delta\%SMH = 100x[(SMH_1 – SMH_2)/SMH_1]$. No final do experimento, foi realizado o teste *One-way* ANOVA para verificar diferenças nas mudanças percentuais dos valores de microdureza superficial.

4.2.2 O efeito dos vernizes de CaGP associado ao flúor, na progressão da desmineralização por erosão – in vitro

Este estudo foi realizado como parte do programa Doutorado Sanduíche na Universidade de Berna, na Suíça, sob co-orientação do professor Adrian Lussi.

Para este estudo, foram utilizados os mesmos 6 grupos do estudo 4.2.1:

(i) Grupo controle negativo, sem verniz;

(ii) Verniz A, base de verniz sem fluoreto e sem CaGP;

(iii) Verniz I, fluoretado e sem CaGP– Duraphat®;

(iv) Verniz B, fluoretado sem CaGP – semelhante ao Duofluorid XII®;

(v) Verniz F, contendo CaGP (1%) e F;

(vi) Verniz G, contendo CaGP (5%) e F;

4.2.2.1 Obtenção dos blocos de esmalte e avaliação da microdureza superficial inicial.

Foram selecionados 108 molares humanos hígidos para este estudo. Os dentes tiveram suas raízes seccionadas paralelamente ao plano oclusal, utilizando

uma cortadeira de precisão (Isomet, Low Speed Saw, Buehler ltd, Evanston, Illinois, USA). Posteriormente, as coroas foram seccionadas ao meio, no sentido mesio-distal e, dessa forma, obtiveram-se 108 “metades” de coroas com a superfície vestibular livre e hígida para o experimento.

Os dentes foram, depois, embutidos em resina acrílica autopolimerizável e tiveram 200µm da superfície vestibular desgastadas em lixa de granulação 1000 (granulação de 18µm) durante 30 segundos. Após obter superfícies paralelas, as superfícies de esmalte foram polidas utilizando lixas de granulação 2400 e 4000 (granulação de 8µm e 5µm, respectivamente), e, depois, utilizando feltro e pasta de diamante de granulação 3µm, com duração de 1 minuto para cada etapa. Entre cada etapa de alisamento e polimento, os blocos foram submetidos a 3 minutos de sonificação.

Após obter superfícies planas e lisas, os blocos de esmalte foram levados ao microdurômetro (MHT-10 Microhardness Tester, Anton Paar Physica, Graz, Áustria; acoplado a um Microscópio Leica, Germany) para avaliação da microdureza superficial antes de distribuição nos grupos. Foram realizadas três endentações superpostas, a uma distância de 25µm entre si, utilizando uma carga de 50g durante 15s. A microdureza superficial de cada bloco foi calculada obtendo-se a média entre as três endentações. Esse valor inicial de microdureza foi utilizado apenas para dividir os blocos aleatoriamente nos respectivos grupos. Os valores de microdureza dos blocos de esmalte variaram entre 318 e 394. A partir desse resultado, foram gerados números aleatórios entre 1 e 6, em programa Excel, e blocos foram aleatoriamente direcionados a 6 grupos, de acordo com o tratamento a ser utilizado.

4.2.2.2 Avaliação da microdureza superficial inicial e desmineralização inicial por erosão.

Até o momento do início do experimento, os blocos foram mantidos em solução de armazenamento, contendo: 1,5mmol/L Cálcio ($CaCl_2.2H_2O$); 1,0mmol/L fosfato (KH_2PO_4); 50mmol/L NaCl, ajustado com KOH para pH=7,0 (70).

Como os blocos foram armazenados em solução de armazenamento, havia a possibilidade de alteração da microdureza inicial. Portanto, inicialmente, os blocos

foram alisados em feltro e pasta de diamante de granulação de 1µm durante 1 minuto.

A microdureza inicial (SMH_1) foi avaliada a partir de 6 endentações de carga de 50g aplicada durante 15 segundos. Essas endentações foram realizadas paralelamente entre si com uma distância de 25µm. O valor da microdureza para o bloco de esmalte foi calculado obtendo-se a média entre esses valores.

Após a avaliação da SMH_1, os blocos foram imediatamente submetidos à erosão. Para tanto, os blocos foram imersos em 50mL de ácido cítrico (0,03M; 0,065%; tamponado com KOH a pH=3,6; a temperatura ambiente) durante 90 segundos em movimento constante. Após a desmineralização inicial, os blocos foram reavaliados para microdureza superficial (SMH_2), da mesma forma como para a microdureza inicial. As novas endentações foram realizadas adjacentes às endentações inicias, a uma distância de 50µm.

4.2.2.3 Aplicação dos vernizes e armazenamento em solução remineralizante.

Após medição da SMH_2 os blocos receberam uma camada do verniz teste. Apenas os blocos do grupo (i) não receberam essa camada de verniz. Sobre a superfície de esmalte foi colocado um pedaço de 1cmx1cm de plástico poliacrílico com uma janela circular de 2,5mm de diâmetro. Esse plástico foi fixado sobre o bloco de esmalte e resina acrílica com cera utilidade. Utilizando um *microbrush*, o verniz (0,025g) foi colocado na janela circular sobre a superfície do esmalte.

As amostras foram, então, imersas em uma solução remineralizante (2,2mL/bloco), e mantidas sob movimento constante, à 30°C, durante 4 horas (Apêndice A [A.2.2.2, A.2.2.3]).

A solução remineralizante consistiu em uma mistura de 1:1 de saliva artificial e saliva humana (71). A saliva humana estimulada (0,02ppmF) foi coletada de 30 indivíduos saudáveis, não fumantes, entre 8 e 10 horas da manhã, 2 horas após a última refeição e a última higienização oral. Os voluntários mascaram uma goma de parafina e a saliva produzida era coletada em tubo de 30mL e imediatamente armazenada em gelo. A saliva foi centrifugada durante 15 segundos, a 3000G, e posteriormente foi armazenada à -80°C até o momento do experimento.

A saliva humana foi descongelada em banho Maria, à 30°C. Após atingir a temperatura de 30°C, a saliva humana foi adicionada à saliva artificial a uma proporção de 1:1 (71).

A saliva artificial utilizada estava de acordo com a *Standard Laboratory Operating Procedures*: 0,213g/L $CaCl_2.2H_2O$; 0,738g/L KH_2PO_4; 0,381g/L NaCl; 1.114g/L KCl; porém não continha mucina gástrica do porco. O pH da saliva artificial foi ajustado para pH=7,0 com NaOH antes de adicionar a saliva humana.

4.2.2.4 Ciclagem de erosão.

A figura 2 mostra um fluxograma da ciclagem de erosão realizada neste estudo.

Inicialmente, as amostras foram imersas na solução remineralizante durante 4 horas. Após as 4 horas na solução remineralizante, os blocos de esmalte foram removidos e lavados em água deionizada durante 20 segundos. Os blocos foram, então, imersos em 7mL/bloco de DMSO (Sulfóxido de Dimetila) durante 5 minutos. Utilizando uma pipeta, criou-se um fluxo sobre os blocos de esmalte para facilitar a dissolução dos vernizes (Apêndice A [A.2.2.1]).

Posteriormente, os blocos foram levados ao microdurômetro e avaliados para microdureza superficial (SMH_3). Os blocos de esmalte foram mantidos *overnight* em câmara fechada, em 100% umidade e temperatura ambiente.

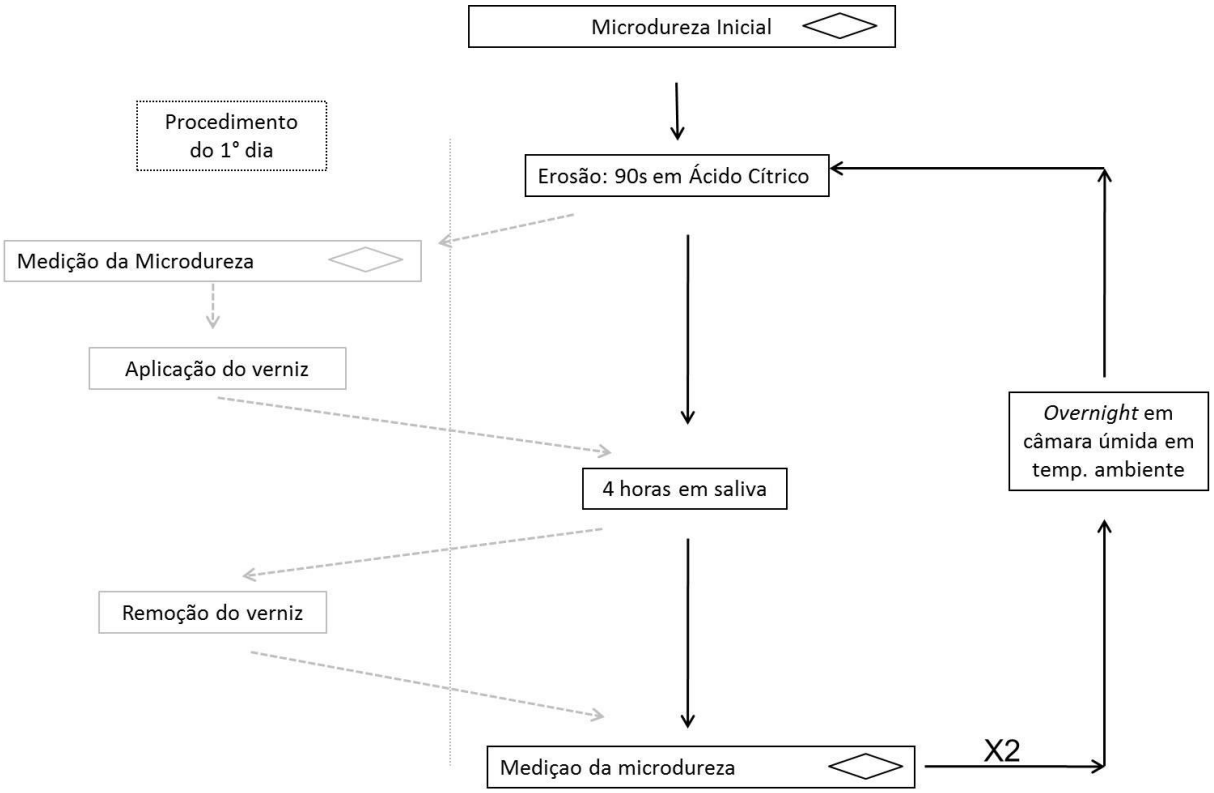

Figura 2. Fluxograma da ciclagem de erosão indicando os tempos e momentos de desmineralização e remineralização aos quais as amostras foram submetidas. As setas em cinza, no lado direito da figura, indicam o procedimento realizado apenas no primeiro dia da ciclagem.

No dia seguinte, os blocos foram imersos em ácido cítrico durante 90 segundos, depois foram lavados em água deionizada durante 20 segundos e imersos em solução remineralizante durante 4 horas, conforme detalhado acima. Após o período de remineralização, os blocos foram levados ao Microdurômetro e tiveram sua dureza superficial avaliada (SMH_4). Após um período *overnight*, conforme explicado acima, os blocos foram submetidos a mais um ciclo de erosão e remineralização, e, depois, a última medição da dureza superficial (SMH_5).

No total, os ciclos duraram 3 dias (Figura 2), sendo que os vernizes foram aplicados apenas no primeiro dia (Apêndice A [A.2.3]). Ainda, os blocos sofreram erosão de 90 segundos antes da aplicação dos vernizes, e um total de 180 segundos de erosão após a aplicação dos vernizes. Foram obtidas 5 medidas de microdureza superficial de cada bloco: SMH_1 – microdureza inicial; SMH_2 – microdureza após erosão; SMH_3 – microdureza após aplicação dos vernizes; SMH_4 e SMH_5 – microdureza após 2ª e 3ª ciclagem.

4.2.2.5 Análise estatística.

Primeiramente, calculou-se a média dos valores de microdureza superficial no decorrer do experimento. Posteriormente, calculou-se a diferença percentual da microdureza superficial para demonstrar graficamente a alteração dos valores no decorrer do experimento.

Como houve uma diferença estatisticamente significante entre os valores de microdureza iniciais entre os grupos, optou-se por calcular, para cada bloco de esmalte, a diferença entre o valor da microdureza inicial e os valores de microdureza seguintes no decorrer do experimento. Assim, as análises estatísticas foram realizadas utilizando esses valores.

Como os dados não apresentaram distribuição normal, foram utilizados testes não paramétricos. Dessa forma, para testar a influência dos grupos e do tempo na diferença da microdureza superficial dos blocos, foi utilizado um modelo de Anova não paramétrico, onde o nível de significância utilizado foi 0,05 (72).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando uma significância de 5%. Em casos de múltiplas comparações o ajuste de Bonferroni-Holm também foi utilizado.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR RELACIONADA AO USO DOS VERNIZES

5.1.1 Estudo da liberação de flúor dos vernizes de CaGP associado ao flúor

Após análise da concentração de flúor liberada pelos vernizes, observou-se que os grupos (v), (vi) e (vii), contendo 1%, 5% e 10% CaGP, respectivamente, mas sem conter flúor, tiveram comportamento semelhante ao controle negativo, grupo sem verniz, e ao verniz base (sem CaGP e sem flúor). Dessa forma, decidiu-se excluir esses grupos da apresentação gráfica (Figura 3) a fim de facilitar a visualização dos demais grupos. Entretanto, esses grupos não foram excluídos das análises.

As áreas sob as curvas traçadas na figura 3 foram calculadas e apresentadas na Tabela 5.1.

Os vernizes contendo 5,63%F (com ou sem CaGP) tiveram uma alta liberação de flúor nas primeiras oito horas do experimento. Porém, após 12 horas, esses valores decresceram significantemente, e permaneceram baixos até o final do experimento. Entretanto, o verniz contendo 5,63%F e 1% CaGP teve um aumento significante na quantidade de flúor liberada nas primeiras 8 horas do experimento.

O verniz base, sem flúor ou CaGP, liberou níveis traços de flúor, igualmente ao grupo controle sem verniz. Como os tempos são diferentes, torna-se difícil a avaliação dos vernizes analisando apenas a Figura 3. Dessa forma, optou-se por calcular a área sob a curva.

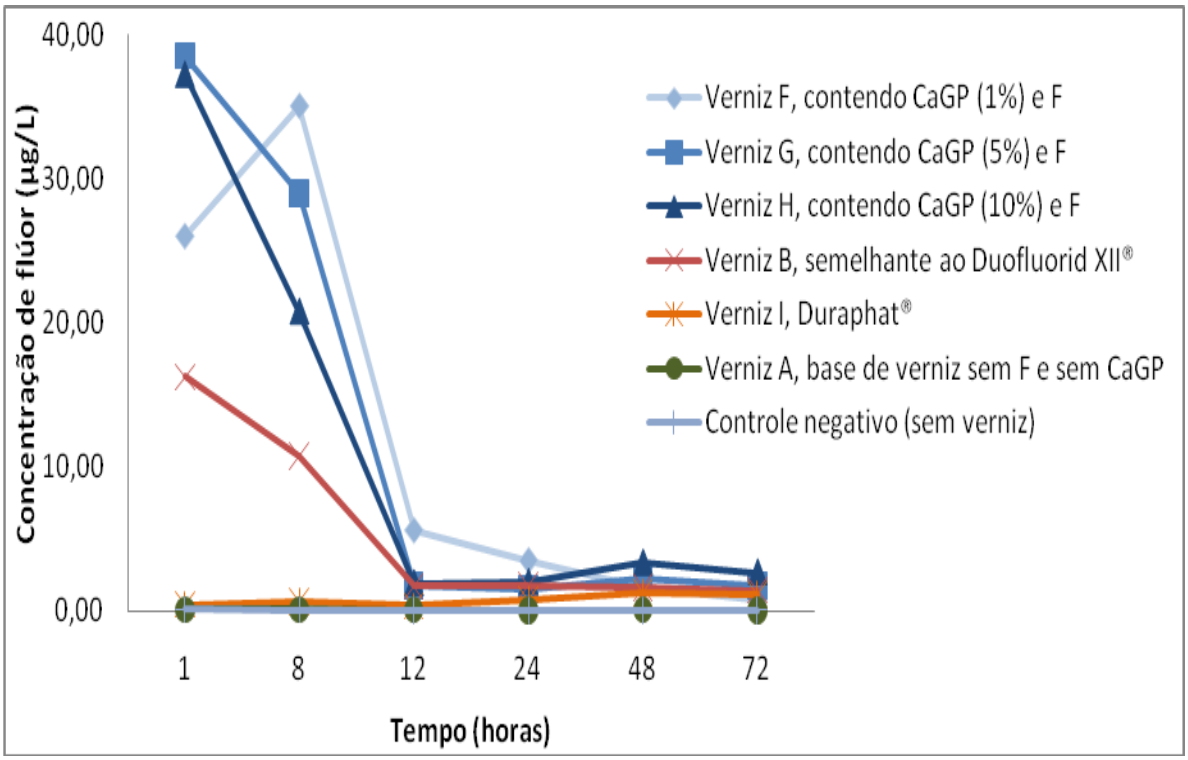

Figura 3. Gráfico da concentração de flúor liberada pelos vernizes durante as 72 horas do experimento.

Analisando a AUC dos vernizes, na tabela 5.1, observou-se que os vernizes sem flúor se comportaram de forma bem semelhante, não havendo diferença estatística entre eles. Os vernizes contendo 5,63%F, liberaram significantemente mais flúor que o verniz Duraphat® (2,26%F), porém os vernizes contendo 5,63%F juntamente com CaGP (1%, 5% ou 10%) liberaram quase duas vezes mais flúor que o verniz contendo apenas flúor 5,63%.

Tabela 5.1. Valores de AUC para cada intervalo de tempo e AUC_{total} por grupo.

Grupo	AUC(1h-8h)	AUC(8h-12h)	AUC(12h-24h)	AUC(24h-48h)	AUC(48h-72h)	AUC_{total}
Controle negativo (sem verniz)	0,39(±0,01)	0,19(±0,02)	0,05(±0,04)	0,07(±0,01)	0,07(±0,02)	0,76(±0,04)[A]
Verniz A, base (sem F e sem CaGP)	0,55(±0,05)	0,46(±0,02)	0,35(±0,04)	0,28(±0,06)	0,24(±0,04)	1,88(±0,11)[A]
Verniz I, fluoretado Duraphat®	3,68(±0,62)	1,77(±0,27)	6,06(±0,86)	23,63(±3,15)	27,99(±4,82)	63,12(±7,87)[B]
Verniz B, fluoretado Duofluorid®	90,56(±15,89)	21,37(±4,08)	18,24(±2,75)	38,98(±2,26)	39,21(±2,60)	208,36(±21,04)[C]
Verniz C, sem flúor e com CaGP (1%)	0,36(±0,05)	0,14(±0,01)	0,46(±0,03)	1,37(±0,17)	1,44(±0,16)	3,78(±0,39)[A]
Verniz D, sem flúor e com CaGP (5%)	0,43(±0,05)	0,18(±0,01)	0,66(±0,06)	1,53(±0,07)	1,22(±0,11)	4,01(±0,22)[A]
Verniz E, sem flúor e com CaGP (10%)	0,47(±0,03)	0,22(±0,01)	0,60(±0,02)	1,12(±0,08)	0,93(±0,09)	3,33(±0,18)[A]
Verniz F, com flúor e com CaGP (1%)	215,74(±26,02)	84,09(±10,72)	58,18(±10,16)	64,69(±16,06)	28,59(±3,67)	451,29(±55,63)[D]
Verniz G, com flúor e com CaGP (5%)	233,76(±11,75)	61,46(±4,36)	19,35(±0,65)	44,14(±2,73)	46,82(±3,38)	405,53(±18,17)[E]
Verniz H, com flúor e com CaGP (10%)	206,81(±5,51)	46,54(±8,07)	23,32(±1,35)	63,59(±5,56)	71,74(±5,65)	412,01(±12,82)[E]

Letras[A] diferentes na última coluna (AUC_{total}) significam grupos estatisticamente diferentes ($p<0,05$)

Ainda, dentre os vernizes contendo CaGP, não foi observada uma relação direta entre concentração de CaGP na composição do verniz e a concentração de flúor liberado pelo verniz. Isso porque o verniz contendo 1% de CaGP liberou significantemente mais flúor que os vernizes contendo 5% e 10% CaGP, que, entre si, liberaram quantidades semelhantes de flúor.

5.1.2 Análise da quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário após uso dos vernizes de CaGP associado ao flúor

A análise de flúor da solução de KOH demonstrou que a mediana das amostras do grupo controle teve níveis de fluoreto não detectáveis na análise de flúor fracamente aderida ao esmalte. Já as amostras que receberam os vernizes fluoretados tiveram maiores concentrações de flúor que as amostras do grupo controle (Tabela 5.2).

Pôde-se observar que as amostras que receberam uma camada do verniz Duraphat obtiveram a menor quantidade de flúor fracamente aderida, semelhante ao grupo contendo 5% CaGP. Os vernizes contendo apenas 5,63%F ou 5,63%F com 1% CaGP foram capazes de criar maiores quantidades de flúor fracamente aderida ao esmalte.

No experimento da análise de flúor fortemente aderido ao esmalte dentário (Tabela 5.2), percebe-se a presença de flúor em ambas camadas do esmalte dentário do grupo controle. Juntando os elementos dentários dos quatro grupos (n=60), verificou-se que a quantidade média (±desvio padrão) de flúor presente na camada externa de esmalte foi 134,1 (±87,0) mgF Kg^{-1} esmalte, enquanto na camada interna foi de 105,0 (±66,3) mgF Kg^{-1} esmalte. Estes podem ser considerados os níveis basais de flúor no esmalte dentário, uma vez que as amostras dos grupos controle não receberam verniz fluoretado.

Tabela 5.2. Quantidade mediana de flúor fraca (□*gF/mm²*) e fortemente aderido (*mgF/Kg enamel*) ao esmalte, de acordo com a camada de esmalte analisada, nas amostras expostas, ou não, aos vernizes fluoretados.

Camada de esmalte		Verniz	Grupo da amostra	
			Verniz	Controle
(LBF)	Superfície	Verniz I, Duraphat®	$0.311^{A,a}$	0^{b}
		Verniz B, Duofluorid®	$0.540^{B,a}$	0^{b}
		Verniz F, com CaGP (1%) e F	$0.703^{B,a}$	0^{a}
		Verniz G, com CaGP (5%) e F	$0.363^{A,a}$	0^{b}
(FBF)	Camada Externa	Verniz I, Duraphat®	$256.3^{A,B,a}$	93.4^{b}
		Verniz B, Duofluorid®	$560.6^{C,a}$	125.4^{b}
		Verniz F, com CaGP (1%) e F	$553.8^{B,C,a}$	122.8^{b}
		Verniz G, com CaGP (5%) e F	$208.0^{A,a}$	90.2^{b}
(FBF)	Camada Interna	Verniz I, Duraphat®	$104.8^{A,a}$	67.9^{b}
		Verniz B, Duofluorid®	$277.4^{B,a}$	88.5^{a}
		Verniz F, com CaGP (1%) e F	$276.1^{B,a}$	108.3^{b}
		Verniz G, com CaGP (5%) e F	$100.9^{A,a}$	79.1^{b}

LBL – Flúor fracamente aderido;
FBF – Flúor fortemente aderido;
Letras iguais significam nenhuma diferença estatística entre os vernizes (nas coluna [letras maiúsculas ^{A}]; nas linhas [letras minúsculas ^{a}] dentre uma mesma camada de esmalte.

As amostras do grupo teste, que tinham recebido uma camada de verniz, demonstraram níveis de flúor bem maiores que no grupo controle ($p<0,05$), exceto para o Duraphat na camada mais interna, que apresentou quantidade semelhante ao grupo controle ($p=0.118$). Os blocos de esmalte do grupo que recebeu uma camada dos vernizes semelhantes ao Duofluorid, contendo apenas 5,63%F ou 5,63%F com 1% CaGP, demonstraram maiores quantidade de flúor fortemente aderido ao esmalte dentário, tanto na camada mais externa como na camada mais interna de esmalte (Tabela 5.2).

O verniz Duraphat, por sua vez, demonstrou menores níveis de flúor fortemente aderido à camada de esmalte mais externa. Quando a camada mais

interna de esmalte foi analisada, observou-se que os níveis de flúor caíram para o nível basal.

Todos os grupos parecem ter mantido o mesmo padrão de quantidade de flúor fraca e fortemente aderido ao esmalte, apresentado em ambos experimentos. Assim, uma análise de correlação foi realizada entre as quantidades de flúor fracamente aderida ao esmalte e as quantidades de flúor fortemente aderida à camada mais externa de esmalte, assim como entre as quantidades de flúor presentes nas duas camadas de esmalte. Observou-se, na correlação de Spearman, uma correlação média entre a quantidade de flúor fracamente aderida ao esmalte e a quantidade de flúor fortemente aderida à camada mais externa de esmalte (r^2=0,35). De modo semelhante, uma correlação média (r^2=0,56) também foi observada entre as quantidades de flúor fortemente aderia às duas camadas de esmalte.

5.2 ESTUDO DO EFEITO DOS VERNIZES NA DESMINERALIZAÇÃO – *IN VITRO*

5.2.1 Efeito dos vernizes na desmineralização por cárie artificial

O efeito dos vernizes na desmineralização por cárie artificial foi observada após calcular a diferença percentual entre os valores de microdureza inicial e final de cada bloco. Esses valores podem ser observados na Tabela 5.3.

Pôde-se observar que no grupo controle, sem verniz, houve mais desmineralização que nos outros grupos, exceto o grupo contendo o verniz teste com 5,63%F e 1% CaGP, o qual não teve uma diferença de microdureza estatisticamente diferente que o grupo controle. Esse grupo, por sua vez, teve desmineralização igual aos demais grupos contendo 5,63%F. Já o grupo contendo os blocos que receberam o verniz com 5,63%F e 5% CaGP ou o verniz contendo apenas flúor (6%) teve Δ%SMH semelhante ao grupo que recebeu Duraphat® (2,26% flúor). O verniz Duraphat® (2,26%NaF), o verniz contendo 5,63%F sem

CaGP, e o verniz contendo 5,63%F e 5% CaGP protegeram significantemente o esmalte dentário contra cárie artificial.

Tabela 5.3 - Média (±desvio padrão) da diferença percentual da microdureza inicial e final dos blocos de esmalte.

Verniz	Δ%SMH
Grupo Controle – Sem verniz	-36.1(±10.1)[a]
Verniz A, Base (sem F^- ou CaGP)	-49.2(±5.1)[b]
Verniz I, Duraphat ®	-14.1(±7.5)[d]
Verniz B, semelhante ao Duofluorid®	-21.9(±8,2)[c,d]
Verniz F, com CaGP (1%) e F	-29.6(±7.1)[a,c]
Verniz G, com CaGP (5%) e F	-23.1(±4.1)[c,d]

5.2.2. O efeito dos vernizes na progressão da desmineralização por erosão – in vitro

O efeito dos vernizes na progressão da desmineralização pode ser observado na Figura 4 e Tabela 5.4.

Após a aplicação dos vernizes, observa-se que a microdureza superficial das amostras dos grupos controle (sem verniz e com o verniz base), assim como a do grupo que recebeu Duraphat, permaneceu semelhante à etapa anterior. Nos demais grupos, a microdureza superficial diminuiu (Figura 4).

Após a segunda e terceira ciclagem de erosão, observa-se que a microdureza dos grupos controle (sem verniz e com o verniz base) diminuíram mais que nos outros grupos, sendo uma diminuição de 28,8% e 29,1%, respectivamente. No entanto, as amostras dos grupos que receberam o verniz Duraphat® e o verniz contendo 5,63%F e 1% CaGP tiveram menores diminuições na microdureza superficial (Figura 4).

Para a análise estatística, calculou-se a diferença entre os valores de microdureza inicial e os valores obtidos no decorrer do experimento. Numa análise

inicial, verificou-se que houve diferença significante nos valores de microdureza entre os grupos (ETA=4,01; gl=4,4; p<0,0001) e no decorrer do experimento (ETA=280,9; gl=2,7; p<0,0001). Verificando o efeito da interação entre tempo e grupo, verificou-se que, em cada grupo, as ciclagens de erosão não tiveram o mesmo efeito na microdureza superficial do esmalte (ETA=6,69; gl=11,4; p<0,0001).

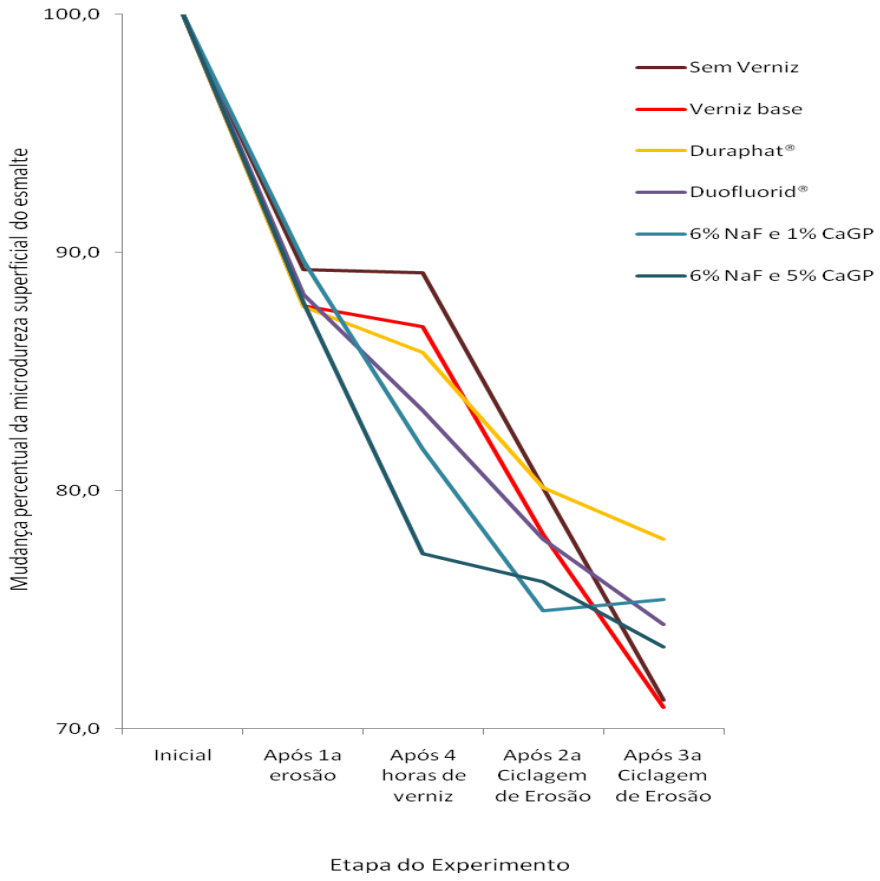

Figura 4. Mudança percentual da microdureza superficial Knoop do esmalte em cada etapa do experimento.

Também se verificou que houve diferença significante na microdureza superficial dos blocos no decorrer do experimento, onde a microdureza diminuiu em todos os grupos (p<0,001).

Ao observar que as ciclagens de erosão tiveram um efeito significante na diferença de microdureza superficial, onde causou uma diminuição nesta, e que os grupos também têm um papel importante nessa diferença, testou-se as diferenças entre os grupos nas seguintes etapas do experimento:

A) Diferença entre os valores de microdureza superficial inicial e após o primeiro desafio erosivo;
B) Diferença entre os valores de microdureza superficial inicial e após a aplicação do verniz;
C) Diferença entre os valores de microdureza superficial inicial e após o último desafio erosivo.

Tabela 5.4. Média (±Erro Padrão) da microdureza superficial Knoop do esmalte antes e após o uso dos vernizes e ciclagem de erosão.

Grupo	**Etapa do Experimento**				
	Inicial	Após 1ª erosão	Após 4 horas de verniz *	Após 2ª Ciclagem de Erosão	Após 3ª Ciclagem de Erosão
Controle – Sem verniz	347,6(±2,5)	310,4(±2,3)	309,9(±3,7)	278,5(±4,7)	247,5(±4,9)
Verniz A, Base	354,4(±2,0)	311,0(±3,4)	307,9(±3,8)	277,1(±2,8)	251,3(±3,6)
Verniz I, Duraphat ®	355,5(±3,9)	311,9(±2,9)	305,0(±5,2)	284,9(±4,5)	277,2(±3,7)
Verniz B, Duofluorid®	351,5(±2,9)	310,2(±3,2)	293,1(±4,4)	274,1(±3,4)	261,5(±4,2)
Verniz F, CaGP (1%) e F	352,3(±2,8)	315,8(±2,5)	288,0(±4,5)	264,1(±4,3)	265,8(±5,1)
Verniz G, CaGP (5%) e F	361,3(±2,4)	317,6(±2,0)	279,5(±7,2)	275,2(±6,4)	265,3(±3,7)

*Os blocos do grupo controle permaneceram 4h sem a camada de verniz.

Essas diferenças estão representadas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Mediana (em unidades de microdureza Knoop) das diferenças de microdureza superficial entre dois tempos, para cada grupo.

Grupo	Diferença entre tempos				
	Inicial e após 1ª erosão	Após 1ª erosão e Após 4h de verniz	Inicial e Após 4h de verniz *	Após 4h de verniz e Após 3ª ciclagem de erosão	Inicial e Após 3ª ciclagem de erosão
Controle – Sem verniz	-35,5[a]	+3,8[a]	-31,7[a]	-69,6[a]	-103,8[a]
Verniz A, Base	-43,3[a]	-0,5[a]	-46,3[a,b]	-55,0[a]	-101,4[a]
Verniz I, Duraphat ®	-41,1[a]	-8,3[a]	-50,7[a,b]	-21,1[b]	-75,2[b]
Verniz B, Duofluorid®	-40,4[a]	-14,0[a,b]	-53,0[a,c]	-25,2[b]	-95,6[a,b]
Verniz F, CaGP (1%) e F	-34,5[a]	-29,2[b]	-65,0[b,c]	-21,6[b]	-84,0[a,b]
Verniz G, CaGP (5%) e F	-41,9[a]	-28,2[b]	-82,1[c]	-15,7[b]	-93,6[a,b]

[a]Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$ e ajuste de Bonferroni) na mesma coluna.
*Os blocos do grupo controle permaneceram 4h sem a camada de verniz.

Ao verificar essas diferenças, observou-se que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos após o primeiro desafio erosivo [A] ($\chi^2=9,04$; gl=5; p=0,107). Contudo, houve diferença significante entre os grupos quando se comparou a análise inicial e a microdureza após a aplicação dos vernizes [B] ($\chi^2=33,37$; gl=5; $p<0,0001$). Isso também se repetiu após as ciclagens de erosão, onde também houve uma diferença significante entre os grupos comparando a microdureza inicial e após o último desafio erosivo [C] ($\chi^2=21,85$; gl=5; p=0,0006) (Tabela 5.5).

Testes post-hoc foram realizados para verificar quais grupos se diferenciavam entre si nos intervalos de tempo específicos.

6 DISCUSSÃO

Os vernizes fluoretados utilizados na Odontologia são veículos de aplicação tópica e são principalmente utilizados para a remineralização nos tecidos duros, podendo ser utilizados em ambiente clínico, assim como em ambiente epidemiológico, na tentativa de remineralizar e prevenir lesões cariosas. Isso provavelmente ocorre uma vez que esses materiais permanecem em contato com o elemento dentário e, assim, liberam íons de flúor para o meio oral e os tecidos dentários. Assim, ocorre uma reação entre o fluoreto proveniente dos vernizes e o esmalte dentário, formando, assim, depósitos de fluoreto de cálcio (CaF_2) sobre a superfície do dente (54, 73). O presente estudo foi o primeiro a adicionar o composto CaGP a uma formulação de verniz e verificar seu efeito contra cárie e erosão.

6.1 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR RELACIONADA AO USO DOS VERNIZES DE CaGP ASSOCIADO AO FLÚOR

6.1.1 Análise da liberação de flúor dos vernizes de CaGP associado, ou não, ao flúor.

A primeira parte desse estudo teve como objetivo analisar a quantidade de flúor liberada pelos vernizes contendo ou não glicerofosfato de cálcio.

O verniz Duraphat® contendo 2,26%F liberou significantemente mais flúor que os verniz sem flúor. Também, o verniz Duraphat® liberou significativamente menos flúor que o verniz contendo 5,63%F. Essa diferença já poderia ser esperada, pois o verniz Duraphat® contém quase a metade da concentração de flúor em relação aos vernizes semelhantes ao Duofluorid®. Entretanto, verificou-se que o verniz Duraphat® liberou quase 70% menos flúor que o verniz contendo 5,63%F, AUC de 63,12 e 208,36, respectivamente.

Pôde-se verificar que a liberação de flúor não é diretamente proporcional à concentração de CaGP. Ainda, constatou-se que os vernizes contendo 5% e 10% CaGP com flúor liberaram quantidades semelhantes flúor, e que o verniz contendo 1% CaGP e flúor liberou quantidades significantemente maiores de flúor. Portanto, para os demais estudos, foram escolhidos apenas os vernizes contendo 1% e 5% CaGP. Adicionalmente, como o flúor seja parte importante na remineralização do elemento dentário, foram escolhidos os vernizes contendo flúor para os próximos experimentos. Dessa forma, os vernizes escolhidos para os próximos experimentos foram o 1% e 5% CaGP com 5,63%F, que foram comparados aos vernizes contendo apenas flúor (5,63% ou 2,26%), e ao verniz base sem flúor e sem CaGP, e a um grupo sem verniz.

Demais estudos que avaliaram a liberação de flúor de vernizes utilizaram blocos de esmalte em sua metodologia (74, 75) como superfície para o verniz. Porém, o esmalte dentário pode sofrer uma reação com o flúor presente no verniz e há uma possibilidade de que isso exerça alguma influência na quantidade total de flúor liberada pelos vernizes. Dessa forma, para evitar tal cenário, optou-se por utilizar blocos de acrílico no experimento, pois esses são inertes à presença de flúor e, provavelmente, não influencia na quantidade total de flúor liberada pelos vernizes testados.

Como grupo controle, optou-se por utilizar um grupo sem verniz e um grupo contendo apenas a base do verniz, sem os ingredientes ativos analisados nesse estudo, fluoreto e CaGP. Observou-se que ambos grupos liberaram quantidades mínimas de flúor. Isso sugere que o método utilizado é válido e que o flúor liberado dos vernizes teste não são provenientes da base sintética dos vernizes ou de algum passo errôneo nos métodos.

O verniz Duraphat® teve uma liberação de flúor bem menor que os outros vernizes, porém essa liberação ocorreu de forma constante durante todo o tempo do experimento. Isso está de acordo com o estudo de Castillo et al. (2001) (74) que encontraram resultados com o mesmo padrão num período de 20 semanas. Porém, vernizes fluoretados permanecem apenas algumas horas em contato com o esmalte, e o flúor liberado pelo verniz seria apenas “útil” enquanto o verniz está em contato com o dente (76). Dessa forma, ao contrário de publicações anteriores, no presente

estudo optou-se por utilizar intervalos de tempo menores e clinicamente mais relevantes, como os primeiros intervalos de 1h, 8h e 12h. Intervalos mais prolongados, de 24h, 48h e 72h, também foram utilizados para obter uma idéia do padrão de liberação de flúor dos vernizes no decorrer do tempo.

Como foram utilizados intervalos de tempo diferentes para medição de flúor, a comparação da quantidade de flúor liberada pelos vernizes nos diferentes intervalos não pode ser realizada de forma direta, uma vez que o primeiro tempo é de apenas 1h de contato entre o verniz e o meio, já o segundo tempo ocorreu em um período de 7 horas de contato entre verniz e meio. Dessa forma, para comparar as concentrações de flúor nas amostras nos diferentes intervalos de tempo, resolveu-se utilizar o cálculo da área sob a curva (AUC). Esses valores de AUC levam em consideração a área abaixo da curva de liberação de flúor (Figura 3), e, como os valores são expressos em tamanho da área, os diferentes tempos podem ser comparados entre si.

Avaliando os resultados obtidos, pôde-se observar que durante as primeiras 12 horas do experimento houve uma maior liberação de flúor pelos vernizes contendo CaGP, seguidos pelo verniz contendo apenas flúor (5,63%F) e Duraphat® (2,26%F). Os resultados da liberação de flúor mostram que o verniz Duraphat® liberou menores quantidades que os outros vernizes fluoretados. Uma das razões para essa diferença pode estar nas diferentes concentrações de flúor nos vernizes, uma vez que as informações do fabricante do Duraphat® informam que este verniz contém 2,26% de fluoreto de sódio (NaF), enquanto os outros vernizes fluoretados apresentam 5,63%F. Adicionalmente, os vernizes Duraphat® e os demais vernizes utilizados nesse estudo, os quais têm a mesma composição que o verniz Duofluorid®, são formados por diferentes compostos resinosos e polímeros. O verniz Duraphat® contém colofônia, goma-laca, mástica e cera branca de abelha. Já o verniz contendo 5,63%F foi fabricado pela FGM, Dentscare LTDA, a qual diz na sua bula que o verniz, parecido em composição ao verniz Duofluorid XII®, contém resinas sintéticas. Dessa forma, o Duraphat® apresenta-se como uma resina de coloração laranja/amarelada e mais viscosa que o outro verniz, o qual, por sua vez, tem uma aparência mais clara/esbranquiçada e bem mais fluida. Assim, essa diferença na composição resinosa dos vernizes leva a uma diferença na viscosidade dos

mesmos. Isso pode, então, causar uma diferença na fluidez e, conseqüentemente, na espessura da camada dos vernizes. Então, apesar de o mesmo peso ter sido utilizado para todos os vernizes, a área de superfície do verniz exposta ao meio pode diferir e causar diferenças na quantidade de flúor liberado.

Tendo isso em mente, observou-se que o verniz Duraphat® liberou quantidades de fluoreto significantemente menores que os vernizes contendo 5,63%F (Duofluorid®). Ainda, os vernizes contendo diferentes concentrações de CaGP liberaram quase o dobro da quantidade de fluoretos que o Duofluorid®. Dessa forma, pode-se sugerir que a quantidade de fluoreto liberada pelos vernizes é influenciada pela presença de CaGP, pois os resultados também mostraram que o verniz contendo 1% de CaGP liberou significantemente mais fluoretos que os vernizes contendo 5% ou 10% de CaGP.

Observando apenas os vernizes contendo CaGP, verificou-se que na primeira hora do experimento, os vernizes contendo 5% e 10% liberaram mais flúor que o verniz contendo 1% CaGP. Durante o próximo intervalo de tempo, a quantidade de flúor liberada pelos vernizes contendo CaGP a 5% e 10% diminuiu, enquanto aquela liberada pelo verniz contendo 1%, aumentou. Contudo, avaliando a quantidade total de flúor liberado nesses intervalos, observando a AUC, nota-se que os vernizes liberaram quantidades semelhantes de flúor. Porém, ao final do experimento, observa-se que o verniz contendo 1% CaGP liberou mais flúor que todos os outros vernizes, e que os vernizes contendo 5% e 10% tiveram comportamentos semelhantes. Dessa forma, optou-se por utilizar os vernizes contendo 1% e 5% nos experimentos seguintes.

Ainda, devido ao fato que os vernizes contendo 5,63%F, com ou sem CaGP, liberaram maiores quantidades de fluoretos que o Duraphat®, por exemplo, seria pertinente sugerir que estes vernizes podem promover maiores quantidades de CaF_2 na superfície do esmalte. Ainda, o CaGP presente em alguns vernizes poderia dissociar e liberar íons de cálcio. Esses íons, por sua vez, também estariam envolvidos na reação com os íons de flúor e formação do composto CaF_2. Dessa forma, os vernizes contendo CaGP teriam uma proteção maior contra a desmineralização por cárie ou erosão.

6.1.2 Análise da quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário apos o uso dos vernizes de CaGP associado ao flúor

Este estudo teve o objetivo de avaliar a quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário. Para tanto, foi realizada a técnica de análise de flúor dissolvida em KOH (19) e posteriormente a análise do esmalte abrasonado por camadas (18, 77, 78).

Na literatura, vários estudos utilizando vernizes fluoretados mantiveram os corpos de prova em contato com os vernizes durante diferentes tempos (12, 14, 65). Durante este experimento, os vernizes foram mantidos em contato com o esmalte dos dentes durante 4 horas. Isso foi realizado para manter o mesmo tempo de contato que utilizado no estudo do efeito dos vernizes na progressão da desmineralização por erosão.

Experimentos preliminares foram realizados para verificar a possibilidade de utilizar o solvente sulfóxido de dimetila (DMSO) ao invés de acetona para a remoção do verniz. Contudo, o poder de penetração no DMSO é maior que da acetona, e, com isso, este solvente poderia dissolver o verniz e levar flúor para as camadas mais profundas de esmalte (Apêndice A [A.1.2]). Assim, optou-se por utilizar uma bolinha de algodão embebido em acetona. Como os corpos de prova de esmalte não sofreram erosão previamente à aplicação de verniz, pode-se sugerir que a remoção deste com bolinha de algodão não afetou a superfície do esmalte dentário.

A aplicação do verniz fluoretado sobre a superfície do esmalte promove a formação de glóbulos de fluoreto de cálcio sobre o esmalte. Entretanto, o cristal de fluoreto de cálcio puro tem uma estrutura cúbica, como esse cristal sobre o esmalte dentário tem estrutura globular, geralmente encontramos na literatura o termo “estrutura semelhante ao fluoreto de cálcio” (*calcium fluoride-like structure*) (79). Ainda, como este cristal é facilmente dissolvido em KOH, esta camada de CaF_2 também pode ser denominada de “flúor solúvel em KOH” (*KOH soluble fluoride*) ou “flúor fracamente aderido ao esmalte”. Este último em conjunto com a fórmula química CaF_2 são os termos adotados neste trabalho.

O método utilizado para a análise de flúor fracamente aderido ao esmalte foi estabelecido por Caslavska et al. (1975). Este método consiste em mergulhar a amostra de esmalte em 10mL de KOH (1M) durante 24h. Como o dióxido de carbono presente no ar é facilmente dissolvido no KOH, recomenda-se que experimentos utilizando esta base sejam realizados em vácuo. Isso foi realizado no presente experimento.

O flúor presente na estrutura do esmalte é geralmente encontrado na forma de fluoroapatita ou fluorhidroxiapatita. Como este flúor está ligado aos cristais do esmalte, e faz parte da estrutura do mesmo, ele não é prontamente dissolvido na solução de KOH. Assim, o mesmo é geralmente denominado de “flúor fortemente aderido ao esmalte”. Para a análise deste flúor, alguns trabalhos utilizam a técnica da biópsia, que é realizada através da dissolução do esmalte por ácido por um determinado tempo (80). Após dissolução do esmalte, o ácido é analisado para a quantidade de flúor, cálcio e fosfato. Posteriormente, a quantidade de esmalte supostamente dissolvida é calculada (em Kg) utilizando a quantidade de cálcio ou fósforo presente na solução ácida, supondo que o esmalte dentário é composto por 37,5% de cálcio e/ou 17,4% fósforo (80, 81).

Diferente da biópsia por dissolução ácida, a técnica utilizada no presente estudo permite que o esmalte dentário seja abrasonado e só então que o pó de esmalte obtido seja pesado e dissolvido em ácido (82). Dessa forma, a quantidade de flúor presente no ácido pode ser diretamente relacionada à quantidade de esmalte removida da amostra. Ainda, os autores optaram por utilizar a presente técnica uma vez que a mesma permite que o esmalte seja removido em camadas, as quais são medidas utilizando um micrometro.

Os resultados desse estudo mostraram que todos os vernizes testados foram capazes de promover a formação de CaF_2 na superfície do esmalte hígido. Esse efeito é limitado ao sítio de esmalte diretamente em contato com o verniz (82), portando, em situações clínicas, a proteção dos vernizes fluoretados ocorre apenas nos elementos dentários em contato com os vernizes.

Seria coerente esperar um maior efeito protetor promovido pelos vernizes contendo 5,63%F (Duofluorid®) ou contendo flúor e 1% CaGP. Isso se deveria à maior formação de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte. A camada de CaF_2 é

dissolvida quando ocorre um ataque ácido. No caso da cárie dentária, os íons de cálcio e flúor recentemente dissolvidos podem promover a remineralização do esmalte (79), enquanto na erosão dentária, a maior formação de CaF_2 cria uma camada “protetora” sobre o esmalte a qual necessita ser desmineralizada antes que os ácidos desmineralizarem o esmalte propriamente dito (83). Ainda, o flúor presente na estrutura do esmalte, que está fortemente aderido, provavelmente se encontra na forma de fluorapatita e tem um limiar de saturação de pH≈4,5, o que a torna menos susceptível ao ataque ácido, principalmente em relação à cárie dentária.

O verniz Duraphat® promoveu quantidades de flúor fraca e fortemente aderido ao esmalte semelhantes ao verniz contendo 5,63%F e 5% CaGP, que, por sua vez, foram significantemente menores que os vernizes citados acima. Isso está de acordo com estudos anteriores, que demonstraram que o verniz Duraphat® teve quantidades de flúor inferiores ao verniz Fluor Protector®, mas semelhante a um gel fluoretado (Medinos Gel®, acidulado; 1,23% NaF; pH=4,0) (84). A menor formação de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte poderia indicar uma menor proteção do esmalte dentário pelo verniz Duraphat.

Verificando os resultados do experimento anterior, é possível observar que o verniz contendo 5% CaGP e flúor teve uma liberação de flúor inferior ao verniz contendo 1% CaGP, porém foi superior ao verniz contendo apenas flúor (Duofluorid®). Portanto, esperava-se que o CaGP neste verniz fosse dissociado, liberando, assim, íons de cálcio que promoveriam uma formação de CaF_2 em maiores quantidades que no verniz Duofluorid®. Entretanto, o presente estudo mostrou o contrário. Isso pode ser devido ao fato de que uma maior concentração de CaGP (5%) presente no verniz pode liberar maiores quantidades de íons cálcio no próprio verniz. Assim, a reação descrita acima ocorre no próprio verniz, e não na superfície dentária onde seria ideal para que esse CaF_2 permanecesse aderido, mesmo que fracamente, ao esmalte.

Adicionalmente, apenas blocos de esmalte hígido foram utilizados neste experimento. Portanto, ainda não se conhece o efeito das novas formulações dos vernizes na formação de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte desmineralizado. Attin et al. (2005) (82) mostrou que o esmalte desmineralizado tem a capacidade de reter mais flúor que o esmalte hígido, quando o vernizes

fluoretados (Duraphat® e Mirafluorid®) foram aplicados. Isso provavelmente ocorre devido à maior porosidade do esmalte, que permite uma melhor penetração do agente fluoretado e maior número de sítios para retenção de CaF_2. Ainda, com o passar do tempo, essa camada de CaF_2 formada após aplicação dos vernizes é capaz de desmineralizar e permitir que o flúor penetre no esmalte subjacente, constatando o efeito remineralizador do flúor (82). Portanto, pode ser sugerido que os vernizes que promovem a formação de uma maior quantidade de flúor fraca e fortemente aderido ao esmalte dentário poderiam promover a remineralização e prevenir a desmineralização do esmalte.

Em geral, os resultados mostraram que a quantidade de flúor fortemente aderida à camada mais interna de esmalte está relacionada à quantidade de flúor presente na camada de esmalte mais externa, que, por sua vez, está relacionada á quantidade de flúor fracamente aderida ao mesmo. Ainda, a quantidade de flúor fracamente aderida ao esmalte parece depender na composição do verniz fluoretado, pois o verniz com 1%CaGP proporcionou maiores quantidades de flúor fraca e fortemente aderido ao esmalte.

6.2 ESTUDO DO EFEITO DOS VERNIZES NA DESMINERALIZAÇÃO – *IN VITRO*

6.2.1 Efeito dos vernizes na desmineralização por cárie artificial

A presença de CaGP na dieta de roedores teve um efeito anti-cariogênico. Adicionalmente, a presença de CaGP, em conjunto com fluoreto, em dentifrícios demonstrou haver uma melhor prevenção contra a cárie em crianças (16, 46-48). Portanto, optou-se por adicionar este composto aos vernizes fluoretados.

Para a análise dos vernizes na desmineralização dentária por cárie, optou-se por utilizar um tempo clinicamente relevante para a exposição dos vernizes sobre o esmalte. Então, tendo em mente que a atuação dos vernizes é limitada ao contato

entre o este e o elemento dentário (76), optou-se por utilizar um tempo de 6 horas neste experimento (64).

Após esse tempo, o verniz foi removido com acetona e algodão, antes de ser submetido à ciclagem de cárie. Os blocos que foram tratados com Duraphat® apresentaram-se com menor diminuição na microdureza superficial Knoop, com uma diminuição de apenas 14,1% entre os valores inicial e final. Apesar de esse grupo ter apresentado uma menor diminuição na microdureza superficial, ele se apresentou estatisticamente semelhante aos grupos dos vernizes Duofluorid® ou ao verniz contendo 5,63%F e 5% CaGP, os quais apresentaram uma diminuição de 21,9% e 23,1%, respectivamente, na microdureza superficial.

Traçando um paralelo entre esses resultados e os resultados do experimento anterior, pode-se observar que o verniz contendo 5,63%F e 5%CaGP liberou mais flúor que o Duofluorid® (5,63%F), que, por sua vez, liberou mais flúor que o Duraphat® (2,26%F). Como esses três grupos apresentaram resultados significativamente semelhantes na prevenção da cárie *in vitro*, pode-se sugerir que a quantidade de flúor liberada pelos vernizes não está relacionada à ação preventiva dos vernizes contra a desmineralização por cárie.

Isso pode ser corroborado pelo resultado que os blocos de esmalte que foram tratados com o verniz contendo 5,63%F e 1% CaGP teve um desempenho semelhante ao grupo controle sem verniz. Assim, pode-se sugerir que a presença de CaGP não aumenta o poder de prevenção dos vernizes fluoretados. Isso possivelmente ocorre porque os íons de cálcio no composto CaGP podem reagir com o flúor do verniz e a formação de CaF_2 pode ocorrer no corpo do verniz e não na superfície dentária. Dessa forma, análises futuras poderiam incluir a análise da concentração de cálcio liberada pelos vernizes para tentar correlacionar com a quantidade de flúor liberada.

Ainda, outro ponto importante pode ser a ausência de biofilme no presente estudo *in vitro* sobre cárie. Uma revisão sobre os efeitos do CaGP sugeriram que este composto poderia ter dois efeitos no mecanismo anti-cariogênico (50). O CaGP poderia atuar diretamente sobre a superfície do elemento dentário e na formação da camada de CaF_2, ou o CaGP poderia ter algum efeito sobre o biofilme, onde sua presença no biofilme poderia causar um melhor efeito tampão. O presente estudo

não utilizou o modelo de biofilme para a formação de lesões cariosas, e teve o objetivo de avaliar a primeira hipótese, sobre formação de CaF_2 e se esta camada poderia evitar a formação de lesões de cárie. Contudo, de acordo com os resultados, a presença de CaGP nos vernizes aparentemente não aumenta o efeito anti-cariogênico dos vernizes fluoretados. Assim, pode-se sugerir que o efeito anti-cariogênico proveniente do CaGP nos estudos anteriores pode estar mais relacionado à sua presença no biofilme bacteriano. Ainda, este efeito anti-cariogênico, quando o CaGP atua sobre o biofilme, não está relacionado a nenhuma ação antimicrobiana, pois para o CaGP atingir tais propriedades, este necessita estar em altas concentrações, de pelo menos 45µg/mL (Concentração Inibitória Mínima) para inibir o crescimento de *S. mutans* (85). Dessa forma, sugere-se que o efeito anti-cariogênico do CaGP pode estar relacionado à sua presença no biofilme bacteriano, sendo que não diretamente sobre os microorganismos do biofilme. Então, estudos futuros com vernizes fluoretados contendo CaGP poderiam ser realizados em modelos de cárie *in vitro* contendo biofilme.

6.2.2 O efeito dos vernizes na progressão da desmineralização por erosão – in vitro

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade dos vernizes contendo, ou não, glicerofosfato de cálcio e flúor em prevenir a progressão da desmineralização por erosão. Para isso utilizou-se um modelo de ciclagem com ácido cítrico e solução remineralizante.

Na literatura sobre erosão dentária, uma grande variedade de agentes erosivos já foram utilizados, dentre estes alguns refrigerantes, como Coca-Cola® (12, 65), Sprite® (86), suco de laranja, ácido cítrico (87) ou ácido clorídrico (88). Essa grande variedade de agentes erosivos dificulta as comparações entre os estudos, porém, o uso dos refrigerantes e sucos constitui a vantagem de se poder fazer experimentos com agentes mais próximos da realidade. Dessa forma, as ciclagens de erosão podem chegar mais próximas das condições naturais. Por outro lado, pode haver pequenas diferenças entre esses produtos nos diferentes locais, assim,

a utilização desses produtos pode comprometer a reprodução e, conseqüentemente, a comparabilidade dos estudos em diferentes locais. Tendo isso em vista, para este estudo, optou-se por utilizar o ácido cítrico, pois esse agente é desenvolvido no laboratório e pode ter sua concentração e pH estritamente controlados. Ainda, a concentração do ácido utilizado foi de 0,065% e pH 3,6. Esses valores foram escolhidos por mais se aproximarem dos valores de concentração e pH do suco de laranja natural (87).

Sobre a solução remineralizante, pode-se observar que em vários estudos *in vitro* a “saliva artificial” foi utilizada (12, 65, 86). Esta solução é composta por diferentes íons, e promove uma determinada remineralização durante a ciclagem. O uso de saliva humana natural em estudos *in vitro* ainda é restrito, devido à dificuldade de conseguir a mesma em quantidades suficientes. Contudo, o uso de saliva natural nos estudos leva em consideração a presença a de diversas proteínas que são encontradas na saliva, as quais interagem entre si e exercem influência na remineralização do esmalte dentário (89, 90). Dessa forma, no presente estudo optou-se por utilizar uma mistura de saliva natural e saliva artificial 1:1, conforme Newby et al. (2006) (71). Procurou-se, com essa mistura, obter uma solução em quantidades suficientes para o desenvolvimento do experimento, mas que ainda continha as proteínas da saliva para haver a interação proteína/esmalte dentário exercendo as influências semelhantes presentes na saliva natural humana.

A influência da saliva natural humana sobre a remineralização do esmalte dentário foi verificada em testes iniciais realizados antes deste estudo (resultados demonstrados no Apêndice A [A.2.2.3]). Observou-se que a saliva natural humana impediu, em grande parte, a remineralização do elemento dentário. Já a saliva artificial remineralizou o esmalte dentário. Verificou-se que com a mistura das duas soluções, a remineralização dentária permaneceu em meio termo, e pode-se sugerir que, possivelmente, as proteínas salivares causaram algum impedimento da remineralização. Dessa forma, essa mistura foi utilizada no presente estudo.

No estudo de Newby et al. (2006) (71), a saliva humana natural foi misturada à saliva artifical, onde contém os mesmos componentes da solução utilizada neste estudo, e ainda havia mucina gástrica de porco. A adição de mucina de estômago de porco poderia interagir com as proteínas salivares, causando um efeito

desconhecido na interação entre essas proteínas e o esmalte dentário. Conseqüentemente, optou-se por não utilizar esse ingrediente da saliva artificial na mistura utilizada neste estudo. Com isso, apesar da diluição, a solução poderia ainda apresentar interação proteínas/esmalte durante a fase de remineralização desse experimento.

Para a ciclagem, vários estudos diferem no número de dias de ciclagem, no tempo de imersão das amostras nas soluções ácidas e remineralizantes, assim como no tempo de exposição das amostras aos agentes que estão sendo testados (vernizes, géis, soluções, etc.) (14, 68, 91). No presente experimento, o período de exposição das amostras aos vernizes foi de 4 horas, devido à logística operacional.

Nos estudos utilizando vernizes fluoretados, geralmente utiliza-se uma lâmina de bisturi para a remoção da camada de verniz do esmalte (14, 65). Remanescentes dessa camada são posteriormente removidos com o auxílio de uma bolinha de algodão e solução de acetona. No presente estudo, as amostras sofreram 90 segundos de erosão antes de receber uma camada do verniz. Então, a utilização de algodão e acetona em esmalte que já sofreu erosão poderia causar a perda de estrutura do esmalte, influenciando, assim, os resultados. Dessa forma, optou-se por utilizar o solvente Sulfóxido de Dimetila (DMSO).

As condições para a erosão foram criadas utilizando 50mL de ácido cítrico por bloco de esmalte a uma temperatura de 30°C (92). Essa temperatura foi escolhida por melhor representar a temperatura intraoral, que foi relatada ser menor que 35°C (93).

Após a erosão inicial, com exceção das amostras do grupo controle negativo, as amostras receberam uma camada de verniz. Alguns estudos demonstraram que na presença de flúor, provenientes de géis ou vernizes, ocorre a formação de uma camada de fluoreto de cálcio (CaF_2) que é fracamente aderia ao esmalte dentário e que essa camada protege o esmalte dentário, sendo a mesma dissolvida quando ocorre o desafio erosivo.

No caso de vernizes fluoretados, uma vez que os mesmos têm altas concentrações de flúor, espera-se que uma maior quantidade de CaF_2 seja formada, aumentando, assim, a proteção do esmalte dentário (4). No presente experimento, os vernizes foram aplicados após um desafio erosivo inicial e, após a remoção do

verniz, observou-se uma diminuição na microdureza superficial do esmalte nos grupos dos vernizes fluoretados, indicando uma falta de remineralização do esmalte. Essa diminuição de microdureza foi mais acentuada nos grupos dos vernizes contendo CaGP. Já no grupo do verniz base e do verniz contendo apenas flúor (5,63%F; Duofluorid), não houve tanta diminuição na microdureza superficial, o que é uma indicação de que a adição de apenas flúor ao verniz não influencia na interação verniz/esmalte e, posteriormente, esse verniz é suficientemente removido da superfície dentária. Então, possíveis diferenças nos resultados entre o verniz base e o verniz contendo apenas flúor (5,63%F; Duofluorid®) não se deve à ação mecânica de remanescentes do verniz sobre o esmalte, mas pode ser atribuído à ação química do flúor presente no verniz.

No caso dos vernizes contendo CaGP, a diminuição na microdureza do esmalte após aplicação dos vernizes pode ser causado por remanescentes do verniz na superfície do esmalte dentário. Isso porque, a presença do composto orgânico (glicero-) pode interagir com algumas das resinas sintéticas presentes no verniz, o que pode influenciar na adesão do verniz ao esmalte e na formação de CaF_2 sobre o esmalte.

Por outro lado, o verniz Duraphat® contém resinas diferentes do verniz base, o que pode dificultar comparações diretas entre esses dois vernizes. Dessa forma, também pode-se sugerir que remanescentes desse verniz podem permanecer no esmalte mesmo após o controle em microscópio. Entretanto, para tal conclusão seriam necessários novos testes incluindo um verniz de mesma base que o Duraphat® sem o composto ativo (NaF). Assim, seria possível diferenciar o efeito químico do flúor presente no verniz, do efeito mecânico das resinas do verniz. Porém, isso não foi possível ser realizado no âmbito deste estudo. De toda forma, pode-se concluir que os vernizes, em geral, não foram capazes de aumentar a microdureza superficial do esmalte, o que pode indicar que os mesmos não remineralizam o esmalte dentário após um desafio erosivo inicial.

Avaliando a diferença na microdureza superficial do esmalte do momento da remoção do verniz até o final do experimento, observa-se que todos os grupos que receberam verniz fluoretado tiveram menor queda na microdureza superficial em

relação ao grupo controle (sem verniz) e ao grupo de verniz base. Isso indica que o verniz fluoretado foi capaz de impedir a progressão da desmineralização por erosão.

Como visto acima, esse efeito “preventivo” poderia ser explicado pela ação mecânica de remanescentes de verniz presentes sobre a superfície dentária, os quais impediriam o contato entre o agente erosivo e o esmalte dentário. Isso poderia ocorrer mais provavelmente nos vernizes contendo CaGP e no verniz Duraphat®. Porém, a diminuição na microdureza desses grupos foi semelhante àquela do grupo do verniz contendo apenas 5,63%F (Duofluorid®), o qual, por sua vez, teve uma diminuição da microdureza significantemente menor que o verniz base. Como a diferença na composição desses últimos dois vernizes é apenas a presença de flúor, pode-se sugerir que a presença do flúor parece ser significante na prevenção da desmineralização por erosão (94), porém, a presença de CaGP nos vernizes não aumentou a proteção do esmalte contra a erosão.

Ao avaliar a diminuição da microdureza superficial durante todo o experimento, pôde-se observar que os vernizes baseados no Duofluorid® (contendo apenas 5,63%F; 5,63%F com CaGP, ou apenas o verniz base) tiveram desempenho intermediário, estatisticamente semelhante ao grupo controle (sem tratamento com verniz) e ao grupo do Duraphat®. Porém, o grupo que foi tratado com Duraphat® teve uma mudança de microdureza superficial significantemente menor que os grupos controle e verniz base, sugerindo que o Duraphat® promoveu, no geral, uma melhor proteção do esmalte dentário. Entretanto, essa proteção, apesar de estatisticamente significante, foi de apenas 25 pontos de microdureza Knoop (KNH), e em um desafio erosivo, o esmalte diminui por volta de 40 pontos. Portanto, apesar de haver uma diferença estatisticamente significante a favor do Duraphat, essa diferença pode não ser clinicamente significante. Ainda, estudos futuros necessitam ser realizados para verificar o efeito prolongado de vernizes fluoretados nessas condições erosivas.

Estudos que investigaram o efeito preventivo dos vernizes fluoretados em desafios erosivos mais prolongados geralmente utilizaram um desafio erosivo mais severo. Estes estudos sugerem que os vernizes são capazes de prevenir o esmalte contra a erosão dentária. Nesses estudos, o verniz é geralmente aplicado em um esmalte sadio e polido antes do início do desafio erosivo. No presente estudo, os vernizes foram aplicados em uma superfície de esmalte já erodida e amolecida, em

partes para verificar se os vernizes fluoretados tinham um efeito remineralizante no esmalte, e, por outro lado, para verificar se os vernizes tinham capacidade de prevenir futura desmineralização do esmalte. Considerando que o desafio erosivo utilizado neste estudo causou apenas um amolecimento do esmalte dentário (*enamel softening*) e não uma perda de estrutura, pode-se concluir que, no geral, os vernizes contendo CaGP ou aqueles contendo apenas flúor, não foram capazes de remineralizar o esmalte dentário amolecido. Ainda, com exceção do Duraphat®, a aplicação de verniz fluoretado não foi capaz de prevenir a progressão da erosão de esmalte dentário.

6.3 DISCUSSÃO GERAL

Os vernizes contendo CaGP em sua composição demonstraram uma maior liberação de flúor ao meio. Porém, o meio utilizado no estudo foi água deionizada, o que pode causar uma maior quantidade de flúor a ser liberada do verniz em relação a outros meios. No caso de saliva humana ser utilizada como meio, a presença de proteínas e outros íons freqüentemente encontrados na saliva poderia influenciar na quantidade de flúor liberada pelos vernizes. Dessa forma, esses resultados não podem ser diretamente extrapolados para situações *in vivo*.

Apesar das diferenças entre o meio utilizado no experimento e a saliva humana, seria razoável sugerir que uma maior liberação de flúor por esses vernizes seria também encontrada em situações clínicas, uma vez que uma grande quantidade de flúor foi liberada pelos vernizes contendo CaGP. Ainda, sabe-se que a presença de flúor em baixas concentrações na cavidade oral promove a formação de fluoridroxiapatita nas camadas mais externas do esmalte e a prevenção da desmineralização (4, 23). Assim, seria razoável imaginar que a liberação de flúor pelos vernizes seja uma ação colateral benéfica. No entanto, o efeito protetor dos vernizes é limitado apenas ao sítio do esmalte diretamente subjacente à camada de verniz, pois, no meio oral, o esmalte que está a mais de 1cm de distância do local onde o verniz é aplicado não adquire flúor proveniente desse verniz (76).

Conseqüentemente, a liberação de flúor pelos vernizes para o meio oral pode não contribuir para a prevenção da desmineralização dentária e pode ser vista como uma reação indesejada. Assim, seria ideal para a clínica odontológica um verniz que liberasse uma menor quantidade de flúor para a saliva e meio oral, mas que fosse capaz de promover uma maior quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte.

A maior quantidade de flúor liberada ao meio foi encontrada no verniz contendo 1% CaGP e flúor, já o Duraphat® teve a menor liberação de flúor entre todos os vernizes fluoretados testados. Isso se refletiu na quantidade de CaF_2 formada no esmalte. O verniz contendo 1% CaGP e flúor foi capaz de formar uma quantidade de CaF_2 significantemente maior no esmalte que o verniz Duraphat®. Isso nos levaria a imaginar que a quantidade de CaF_2 formada no esmalte está relacionada à quantidade de flúor liberada pelo verniz. Porém, o verniz contendo 5% CaGP e flúor liberou uma quantidade de flúor ao meio significantemente maior que o Duraphat, porém ambos formaram uma mesma quantidade de CaF_2 sobre o esmalte. Por outro lado, o verniz contendo 5% CaGP e flúor liberou quantidades de flúor significantemente maiores que o Duofluorid, que por sua vez liberou menos flúor que o verniz contendo 1% CaGP e flúor. Porém, o Duofluorid formou uma quantidade de CaF_2 semelhante ao verniz contendo 1% CaGP e flúor, quantidade esta significantemente maior que a encontrada no grupo do verniz contendo 5% CaGP e flúor. Então, pode-se sugerir que a quantidade de CaF_2 formada sobre o esmalte dentário não está totalmente relacionada à quantidade de flúor liberada pelos vernizes fluoretados.

Em relação à quantidade de flúor fraca e fortemente aderia ao esmalte e a conseqüente proteção deste contra a desmineralização, observou-se que o verniz Duraphat® teve a menor formação de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte, mas o mesmo foi capaz de melhor prevenir a desmineralização por cárie e por erosão. Já o verniz contendo 1% CaGP e flúor teve um desempenho semelhante ao Duraphat® nos experimentos de desmineralização do esmalte, mas também foi estatisticamente semelhante ao grupo controle, sem verniz. Já o verniz Duofluorid® foi semelhante ao Duraphat® e ao verniz contendo 1% CaGP e flúor, assim como ao grupo controle no estudo de erosão. Como o verniz Duofluorid® e o verniz contendo

1% CaGP e flúor tiveram quantidades de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte estatisticamente mais elevadas que as encontradas no grupo do verniz Duraphat®, e os blocos de esmalte que receberam esses vernizes desmineralizaram de forma semelhante aos blocos do grupo controle, pode-se sugerir que o efeito protetor dos vernizes não está diretamente relacionado à quantidade de flúor formada sobre o esmalte. Então, sugere-se que o efeito do Duraphat® está relacionado ao pH do veículo no qual o flúor está inserido ou às resinas naturais presente no mesmo.

O Duraphat® tem pH=4,5, já o Duofluorid® e os vernizes contendo CaGP têm pH=8,0 (41, 65). Os veículos de flúor mais ácidos (com valores de pH mais baixos) podem prevenir melhor a desmineralização, uma vez que eles têm uma melhor reação com o esmalte dentário e liberam uma maior concentração de íons de cálcio do esmalte. Esses íons reagem com o flúor presente no verniz fluoretado e forma os glóbulos de CaF_2 (95). Isso foi verificado por Wiegand et al. (2009) (88) onde veículos contendo fluoreto de estanho ou fluoreto de amina em pH mais ácidos foram mais efetivos na proteção do esmalte contra a erosão do que as soluções com pH neutro. Dessa forma, como o Duraphat® tem um pH de 4,5, este verniz poderia promover uma maior formação de CaF_2 sobre o esmalte, o que levaria a uma maior proteção do esmalte dentário contra a desmineralização. Entretanto, uma maior quantidade de flúor aderido ao esmalte foi encontrado nos vernizes semelhantes ao Duofluorid®, que tem pH mais neutro (pH=8,0). No mesmo estudo citado anteriormente (88), verificou-se que, nos veículos contendo flúor na forma de fluoreto de sódio (NaF), a proteção do esmalte contra erosão foi semelhante tanto nos veículos ácidos (pH=3,9) quanto nos neutros (pH=7,0). O que indica que os veículos neutros ou ácidos contendo NaF devem ter o mesmo desempenho na prevenção da desmineralização do esmalte dentário. Como os vernizes utilizados no presente estudo são à base de NaF, pode-se sugerir que a acidez do verniz Duraphat® (pH=4,5) não tenha exercido uma influência significante na formação de CaF_2 sobre o esmalte, o que, em partes, explica os resultados do presente estudo, que mostraram que o Duraphat® promoveu menores quantidades de CaF_2 no esmalte. Assim, a diferença de pH entre os vernizes pode não explicar o efeito preventivo do Duraphat® na desmineralização dentária. Portanto, uma outra

possibilidade pode ser que o veículo dos vernizes tenha um papel no seu desempenho na prevenção da desmineralização.

O verniz Duraphat® consiste em 2,26%F em um veículo de resinas naturais e cera, já os demais vernizes utilizados neste trabalho contêm uma base de resinas sintéticas (41). O efeito das resinas sintéticas dos grupos semelhantes ao Duofluorid® foi verificado usando um verniz placebo (grupo de verniz base). Este verniz continha os mesmos ingredientes do Duofluorid® e seus semelhantes, porém não continha os compostos ativos flúor e CaGP. Os blocos de esmalte que receberam uma camada deste verniz base tiveram uma perda de microdureza superficial igual ou maior que o grupo controle sem verniz. Com isso, verificou-se que, no caso dos vernizes semelhantes ao Duofluorid®, os possíveis efeitos preventivos contra a desmineralização dentária não estariam relacionados à presença de remanescentes do verniz sobre o esmalte. Por outro lado, o mesmo não pode ser extrapolado para o verniz Duraphat®. Como visto anteriormente, o verniz Duraphat® contém resinas naturais e cera como veículo, que é diferente em cor e consistência dos demais vernizes. Isso pode permitir que remanescentes deste verniz permaneçam no esmalte mesmo após a aplicação do solvente. Contudo, como não foi possível obter um verniz placebo do Duraphat®, o efeito real das resinas deste verniz sobre o esmalte dentário não pôde ser verificado no âmbito deste estudo.

As análises estatísticas verificaram que o verniz Duraphat® diminuiu significantemente a desmineralização do esmalte dentário por cárie e erosão *in vitro*. Porém, os resultados das SMH mostram que a desmineralização ocorreu mesmo nos blocos de esmalte que receberam este verniz. O que indica que o verniz Duraphat® não foi capaz de impedir a desmineralização do esmalte por completo. Os valores de microdureza indicaram, ainda, que apesar do verniz Duraphat® ter “prevenido” a erosão, a diferença de microdureza para o grupo controle foi de apenas 25 pontos Knoop e um ciclo de desmineralização diminui a dureza em 40 pontos Knoop. Isso indica que, apesar do Duraphat® ter obtido um resultado estatisticamente diferente do grupo controle no presente experimento, seu efeito protetor (de 25 pontos Knoop) não protegeu o esmalte de um ciclo erosivo completo (de ±40 pontos Knoop). Entretanto, estudos que utilizaram Duraphat® e Duofluorid®

em ciclos erosivos mais severos e mais prolongados que o presente estudo indica que, apesar de diminuir a perda mineral do esmalte, o uso dos vernizes, nessas situações, foi capaz de prevenir a desmineralização por erosão (12, 14, 65, 94). Então, pode-se sugerir que o efeito “protetor” do Duraphat® encontrado no presente estudo pode permanecer e/ou aumentar caso as ciclagens de erosão continuem ou sejam prolongadas. Da mesma forma, também seria razoável sugerir que o efeito “protetor” do verniz contendo 1% CaGP e flúor ou do verniz Duofluorid® também podem aumentar com o passar do tempo. Caso isto ocorra, o efeito protetor destes últimos vernizes estaria possivelmente relacionado ao flúor fraca e fortemente aderido ao esmalte. Contudo, o presente estudo mostra que vernizes contendo glicerofosfato de cálcio e flúor não foram de impedir a cárie *in vitro* ou o amolecimento do esmalte dentário devido à erosão *in vitro*.

7 CONCLUSÕES

Frente aos estudos realizados pode-se concluir que:

- O verniz de glicerofosfato de cálcio associado ao flúor promoveu maior liberação de flúor ao meio;
- O verniz de glicerofosfato de cálcio associado ao flúor também promoveu maior quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário;
- O verniz de glicerofosfato de cálcio associado o flúor não apresentou efeito preventivo favorável frente aos desafios cariogênicos e erosivos;
- Nenhum verniz contendo glicerofosfato de cálcio associado flúor, ou contendo somente flúor, foi capaz de remineralizar o esmalte que sofreu amolecimento após desafio erosivo no período de tempo determinado neste experimento.

8 REFERÊNCIAS

1. Bönecker M, Marcenes W, Sheiham A. Caries reductions between 1995, 1997 and 1999 in preschool children in Diadema, Brazil. Int J Paediatr Dent. 2002 May;12(3):183-8.

2. Bönecker M, Cleaton-Jones P. Trends in dental caries in Latin American and Caribbean 5-6- and 11-13-year-old children: a systematic review. Community Dent Oral Epidemiol. 2003 Apr;31(2):152-7.

3. Dugmore CR, Rock WP. The progression of tooth erosion in a cohort of adolescents of mixed ethnicity. Int J Paediatr Dent. 2003 Sep;13(5):295-303.

4. Fejerskov O, Kidd E. Dental Caries: the disease and its clinical management. Munksgaard: Blackwell Munksgaard; 2003.

5. Lussi A, Jaeggi T. Chemical factors. Monogr Oral Sci. 2006;20:77-87.

6. Cury J, Tenuta L, Ribeiro C, Paes Leme A. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. Braz Dent J. 2004;15(3):167-74.

7. Azarpazhooh A, Main P. Fluoride varnish in the prevention of dental caries in children and adolescents: a systematic review. J Can Dent Assoc. 2008 Feb;74(1):73-9.

8. Featherstone J. The science and practice of caries prevention. J Am Dent Assoc. 2000 Jul;131(7):887-99.

9. Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:44-65.

10. Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):151-5.

11. Imfeld T. Prevention of progression of dental erosion by professional and individual prophylactic measures. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 (Pt 2)):215-20.

12. Vieira A, Jager D, Ruben J, Huysmans M. Inhibition of erosive wear by fluoride varnish. Caries Res. 2007;41(1):61-7.

13. Marinho V. Substantial caries-inhibiting effect of fluoride varnish suggested. Evid Based Dent. 2006;7(1):9-10.

14. Murakami C, Bönecker M, Corrêa M, Mendes F, Rodrigues C. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. Arch Oral Biol. 2009 Nov;54(11):997-1001.

15. Bowen W. The monitoring of acid production in dental plaque in monkeys. Br Dent J. 1969 Jun;126(11):506-8.

16. Mainwaring P, Naylor M. A four-year clinical study to determine the caries-inhibiting effect of calcium glycerophosphate and sodium fluoride in calcium carbonate base dentifrices containing sodium monofluorophosphate. Caries Res. 1983;17(3):267-76.

17. Rees J, Loyn T, Chadwick B. Pronamel and tooth mousse: an initial assessment of erosion prevention in vitro. J Dent. 2007 Apr;35(4):355-7.

18. Altenburger MJ, Schirrmeister JF, Wrbas KT, Klasser M, Hellwig E. Fluoride uptake and remineralisation of enamel lesions after weekly application of differently concentrated fluoride gels. Caries Res. 2008;42(4):312-8.

19. Caslavska V, Moreno E, Brudevold F. Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. Arch Oral Biol. 1975 1975 May-Jun;20(5-6):333-9.

20. Altenburger M, Bernhart J, Schicha T, Wrbas K, Hellwig E. Comparison of in vitro fluoride uptake from whitening toothpastes and a conventional toothpaste in demineralised enamel. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2010;120(2):104-8.

21. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. Caries Res. 2004 2004 May-Jun;38(3):182-91.

22. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. J Dent Res. 2004;83 Spec No C:C35-8.

23. Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. Adv Dent Res. 2008;20(1):13-6.

24. Marthaler T. Changes in dental caries 1953-2003. Caries Res.38(3):173-81.

25. Marthaler T. Changes in the prevalence of dental caries: how much can be attributed to changes in diet? Caries Res. 1990;24 Suppl 1:3-15; discussion 6-25.

26. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. Caries Res. 2004;38 Suppl 1:34-44.

27. Bartlett D, Dugmore C. Pathological or physiological erosion--is there a relationship to age? Clin Oral Investig. 2008 Mar;12 Suppl 1:S27-31.

28. Moss SJ. Dental erosion. Int Dent J. 1998 Dec;48(6):529-39.

29. Järvinen VK, Rytömaa II, Heinonen OP. Risk factors in dental erosion. J Dent Res. 1991 Jun;70(6):942-7.

30. Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Erosion of deciduous and permanent dental hard tissue in the oral environment. J Dent. 2000 May;28(4):257-63.

31. Hunter ML, West NX, Hughes JA, Newcombe RG, Addy M. Relative susceptibility of deciduous and permanent dental hard tissues to erosion by a low pH fruit drink in vitro. J Dent. 2000 May;28(4):265-70.

32. Amaechi B, Podoleanu A, Higham S, Jackson D. Correlation of quantitative light-induced fluorescence and optical coherence tomography applied for detection and quantification of early dental caries. J Biomed Opt. 2003 Oct;8(4):642-7.

33. Järvinen V, Meurman JH, Hyvärinen H, Rytömaa I, Murtomaa H. Dental erosion and upper gastrointestinal disorders. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988 Mar;65(3):298-303.

34. Peres K, Armênio M, Peres M, Traebert J, De Lacerda J. Dental erosion in 12-year-old schoolchildren: a cross-sectional study in Southern Brazil. Int J Paediatr Dent. 2005 Jul;15(4):249-55.

35. Auad S, Waterhouse P, Nunn J, Steen N, Moynihan P. Dental erosion amongst 13- and 14-year-old Brazilian schoolchildren. Int Dent J. 2007 Jun;57(3):161-7.

36. Mangueira D, Sampaio F, Oliveira A. Association Between Socioeconomic Factors and Dental Erosion in Brazilian Schoolchildren. J Public Health Dent. 2009 Apr.

37. Vargas-Ferreira F, Praetzel JR, Ardenghi TM. Prevalence of tooth erosion and associated factors in 11-14-year-old Brazilian schoolchildren. J Public Health Dent. 2010 Aug.

38. Ganss C, Klimek J, Brune V, Schürmann A. Effects of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in situ. Caries Res. 2004 2004 Nov-Dec;38(6):561-6.

39. Sales-Peres S, Pessan J, Buzalaf M. 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 Feb;52(2):128-32.

40. Rios D, Magalhães A, Polo R, Wiegand A, Attin T, Buzalaf M. The efficacy of a highly concentrated fluoride dentifrice on bovine enamel subjected to erosion and abrasion. J Am Dent Assoc. 2008 Dec;139(12):1652-6.

41. Magalhães A, Levy F, Rios D, Buzalaf M. Effect of a single application of TiF(4) and NaF varnishes and solutions on dentin erosion in vitro. J Dent. 2010 Feb;38(2):153-7.

42. Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Effects of calcium on the erosive potential of acidic candies in saliva. Caries Res. 2007;41(1):68-73.

43. Reynolds E. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? Aust Dent J. 2008 Sep;53(3):268-73.

44. Osborn TWB, Noriskin JN, Staz J. A comparison of crude and refined sugar and cerials in their ability to produce in vitro decalcification of teeth.: Journal of Dental Research; 1937. p. 165-71.

45. Osborn TWB, Noriskin JN, Staz J. Inhibition in vitro of decalcification in teeth.: Journal of Dental Research; 1937. p. 545-50.

46. Grenby T. Trials of 3 organic phosphorus-containing compounds as protective agents against dental caries in rats. J Dent Res. 1973;52(3):454-61.

47. Pianotti R, Ambrozaitis J, McNamara T. Cariostatic activity of calcium glycerophosphate in hamsters: topical vs dietary administration. J Dent Res. 1976;55(6):1092-6.

48. Naylor M, Glass R. A 3-year clinical trial of calcium carbonate dentifrice containing calcium glycerophosphate and sodium monofluorophosphate. Caries Res. 1979;13(1):39-46.

49. Tenuta L, Cenci M, Cury A, Pereira-Cenci T, Tabchoury C, Moi G, et al. Effect of a calcium glycerophosphate fluoride dentifrice formulation on enamel demineralization in situ. Am J Dent. 2009 Oct;22(5):278-82.

50. Lynch R. Calcium glycerophosphate and caries: a review of the literature. Int Dent J. 2004;54(5 Suppl 1):310-4.

51. Lynch R, ten Cate J. Effect of calcium glycerophosphate on demineralization in an in vitro biofilm model. Caries Res. 2006;40(2):142-7.

52. Wycoff S, Morris M, Newbrun E. The effect of mouthrinse containing calcium glycerophosphate on the chemical composition and development of plaque in humans. J Dent Res. 1980 Jan;59(1):23-8.

53. Duke S, Rees D, Forward G. Increased plaque calcium and phosphorus concentrations after using a calcium carbonate toothpaste containing calcium glycerophosphate and sodium monofluorophosphate. Pilot study. Caries Res. 1979;13(1):57-9.

54. Beltrán-Aguilar E, Goldstein J, Lockwood S. Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. J Am Dent Assoc. 2000 May;131(5):589-96.

55. Clark DC. A review on fluoride varnishes: an alternative topical fluoride treatment. Community Dent Oral Epidemiol. 1982 Jun;10(3):117-23.

56. Weintraub JA. Fluoride varnish for caries prevention: comparisons with other preventive agents and recommendations for a community-based protocol. Spec Care Dentist. 2003 2003 Sep-Oct;23(5):180-6.

57. Petersson L. On topical application of fluorides and its inhibiting effect on caries. Odontol Revy Suppl. 1975;34:1-36.

58. Petersson LG. Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. Caries Res. 1993;27 Suppl 1:35-42.

59. van Loveren C, Buijs J, ten Cate J. Protective effect of topically applied fluoride in relation to fluoride sensitivity of mutans streptococci. J Dent Res. 1993 Aug;72(8):1184-90.

60. Jeevarathan J, Deepti A, Muthu MS, Rathna Prabhu V, Chamundeeswari GS. Effect of fluoride varnish on Streptococcus mutans counts in plaque of caries-free children using Dentocult SM strip mutans test: a randomized controlled triple blind study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2007 2007 Oct-Dec;25(4):157-63.

61. ten Cate J. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. Eur J Oral Sci. 1997 Oct;105(5 Pt 2):461-5.

62. Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. Caries Res. 2001 2001 Jan-Feb;35(1):57-60.

63. Sorvari R, Meurman JH, Alakuijala P, Frank RM. Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. Caries Res. 1994;28(4):227-32.

64. Magalhães A, Stancari F, Rios D, Buzalaf M. Effect of an experimental 4% titanium tetrafluoride varnish on dental erosion by a soft drink. J Dent. 2007 Nov;35(11):858-61.

65. Magalhães A, Kato M, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf M. The effect of an experimental 4% Tif4 varnish compared to NaF varnishes and 4% TiF4 solution on dental erosion in vitro. Caries Res. 2008;42(4):269-74.

66. Medeiros F. Avaliação da Liberação e Recarga de Flúor em Cimentos de Ionômero de Vidro. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2006.

67. Cury J, do Amaral R, Tenuta L, Del Bel Cury A, Tabchoury C. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. Eur J Oral Sci. 2010 Aug;118(4):370-5.

68. Vieira A, Ruben J, Huysmans M. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. Caries Res. 2005;39(5):371-9.

69. Magalhães AC, Comar LP, Rios D, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of a 4% titanium tetrafluoride (TiF4) varnish on demineralisation and remineralisation of bovine enamel in vitro. J Dent. 2008 Feb;36(2):158-62.

70. Zero D, Rahbek I, Fu J, Proskin H, Featherstone J. Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. Caries Res. 1990;24(3):181-8.

71. Newby C, Creeth J, Rees G, Schemehorn B. Surface microhardness changes, enamel fluoride uptake, and fluoride availability from commercial toothpastes. J Clin Dent. 2006;17(4):94-9.

72. Brunner E, Domhof S, Langer F. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. 1 ed. New York: John Wiley & Sons; 2002. p. 288p.

73. Ismail A, Bader J. Evidence-based dentistry in clinical practice. J Am Dent Assoc. 2004 Jan;135(1):78-83.

74. Castillo J, Milgrom P, Kharasch E, Izutsu K, Fey M. Evaluation of fluoride release from commercially available fluoride varnishes. J Am Dent Assoc. 2001 Oct;132(10):1389-92; quiz 459-60.

75. Castillo J, Milgrom P. Fluoride release from varnishes in two in vitro protocols. J Am Dent Assoc. 2004 Dec;135(12):1696-9.

76. Attin T, Lennon A, Yakin M, Becker K, Buchalla W, Attin R, et al. Deposition of fluoride on enamel surfaces released from varnishes is limited to vicinity of fluoridation site. Clin Oral Investig. 2007 Mar;11(1):83-8.

77. Weatherell JA, Robinson C, Strong M, Nakagaki H. Micro-sampling by abrasion. Caries Res. 1985;19(2):97-102.

78. Altenburger MJ, Bernhart J, Schicha TD, Wrbas KT, Hellwig E. Comparison of in vitro fluoride uptake from whitening toothpastes and a conventional toothpaste in demineralised enamel. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2010;120(2):104-8.

79. Ogard B, Seppä L, Rølla G. Professional topical fluoride applications--clinical efficacy and mechanism of action. Adv Dent Res. 1994 Jul;8(2):190-201.

80. Seppä L. Effects of a sodium fluoride solution and a varnish with different fluoride concentrations on enamel remineralization in vitro. Scand J Dent Res. 1988 Aug;96(4):304-9.

81. Villena R, Tenuta L, Cury J. Effect of APF gel application time on enamel demineralization and fluoride uptake in situ. Braz Dent J. 2009;20(1):37-41.

82. Attin T, Grieme R, Paqué F, Hannig C, Buchalla W, Attin R. Enamel fluoride uptake of a novel water-based fluoride varnish. Arch Oral Biol. 2005 Mar;50(3):317-22.

83. Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine in vitro. Caries Res. 2001 2001 Sep-Oct;35(5):325-30.

84. Dijkman A, Tak J, Arends J. Fluoride deposited topical applications in enamel. KOH-soluble and acquired fluoride. Caries Res. 1982;16(2):147-55.

85. Carvalho T, Sampaio F, Buzalaf M, Bonecker M. Avaliação bactericida e bacteriostática do glicerofosfato de cálcio em microorganismos do biofilme oral. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP2009.

86. Ganss C, Schlueter N, Klimek J. Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. Arch Oral Biol. 2007 Jan;52(1):9-14.

87. Voronets J, Lussi A. Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. Clin Oral Investig. 2010 Jun;14(3):251-6.

88. Wiegand A, Bichsel D, Magalhães A, Becker K, Attin T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on in vitro erosion. J Dent. 2009 Aug;37(8):591-5.

89. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher J, Veerman E. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res. 2004 2004 May-Jun;38(3):247-53.

90. Lamkin M, Oppenheim F. Structural features of salivary function. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(3-4):251-9.

91. Kato MT, Italiani FD, de Araujo JJ, Garcia MD, Sales-Peres SHD, Buzalaf MAR. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. Journal of Dentistry. 2009 Mar;37(3):233-6.

92. Lussi A, Megert B, Eggenberger D, Jaeggi T. Impact of different toothpastes on the prevention of erosion. Caries Res. 2008;42(1):62-7.

93. Youngson CC, Barclay CW. A pilot study of intraoral temperature changes. Clin Oral Investig. 2000 Sep;4(3):183-9.

94. Kato M, de Moraes Italiani F, de Araújo J, Garcia M, de Carvalho Sales-Peres S, Buzalaf M. Preventive effect of an iron varnish on bovine enamel erosion in vitro. J Dent. 2009 Mar;37(3):233-6.

95. Saxegaard E, Rölla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. Scand J Dent Res. 1988 Dec;96(6):523-35.

APÊNDICE - Resultados de experimentos preliminares

A.1 Experimento 4.1.2 – Análise da quantidade de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte dentário após o uso dos vernizes.

A.1.1 Preparação das amostras

Para este experimento, foram selecionados 22 molares humanos os quais foram preparados, e medidos conforme relatado no corpo da dissertação (4.2.1).

A.1.2 Escolha do solvente para remoção do verniz da superfície de esmalte.

Para este experimento, foram selecionados 3 dentes, obtendo-se, assim, 6 corpos de prova. Os dentes receberam uma cama de verniz fluoretado e permaneceram em câmara umedecida durante 4h, 30°C, conforme detalhado no corpo do texto (4.3.2).

Posteriormente, os corpos de prova foram divididos em 2 grupos. Aqueles denominados como *a* tiveram o verniz removido com DMSO, e os denominados como *b* tiveram o verniz removido com Acetona.

A quantidade de flúor na superfície do esmalte e na profundidade do esmalte foi analisada conforme explicado no corpo da dissertação (4.3.2 e 4.3.3). Porém, foi utilizada uma quantidade de apenas 1mL de KOH durante esse experimento, o qual pode ter influenciado numa quantidade mais concentrada de flúor nos resultados apresentados abaixo.

Com esses resultado, verificou-se que o DMSO parece remover mais o verniz fluoretado da superfície do esmalte (Tabela A1), conforme encontrado no experimento preliminar A1.2.1 (Apêndice).

Quando analisando a quantidade de flúor fortemente ligada ao esmalte dentário, observou-se que no grupo da Acetona, havia uma menor quantidade de flúor na camada mais profunda de esmalte (entre 50 a 100□m), porém, no grupo com DMSO, havia mais flúor nesta camada de esmalte. (Figura A4).

Tabela A1 - Quantidade de flúor medida usando DMSO ou Acetona para remoção do verniz.

	Acetona	DMSO
ppm F analisado	23.14	17.60
Área de esmalte (cm2)	0.082	0.096
mg de F / cm2 de esmalte	**281.57**	**183.76**

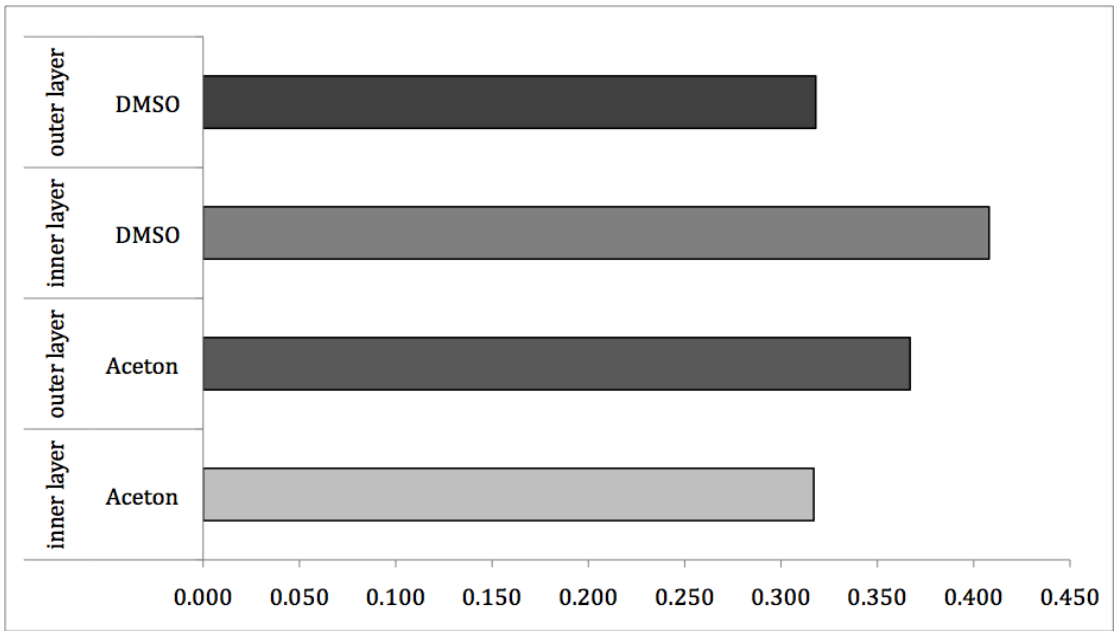

Figura A4. Quantidade de flúor nas diferentes camadas de esmalte dentário (ppmF/MG de esmalte). Camada externa = 0 to 50□m e interna = 50 to 100 □m.

Pode-se sugerir que o DMSO dissolve o verniz mais prontamente e, provavelmente, penetra o esmalte mais facilmente que a acetona, levando, assim, uma parte do fluor dissolvido do esmalte para a camada mais interna do esmalte. Isso pode explicar a maior quantidade de fluor na camada mais interna do grupo de DMSO, que acetona. Dessa forma, optou-se por utilizar acetona para este experimento.

A.1.3 Estabelecendo a técnica para a análise de flúor fraca e fortemente aderida ao esmalte.

A.1.3.1 Análise de flúor fracamente aderida ao esmalte.

Para esta análise, o método escolhido foi estabelecido por Caslavska (1975). Consiste em mergulhar a amostra em 10mL de KOH a 1M durante 24 horas. Isso deve dissolver o fluoreto de cálcio formado na superfície do esmalte dentário. Na discussão de seu trabalho, Caslavska e colaboradores (1975) argumentam que CO2 pode estar presente nas soluções de KOH, e isso pode interferir na dissolução de CaF2 das amostras e ter, de certa forma, influência sobre os resultados.

Uma solução para este problema seria deixar as amostras em KOH sob câmara hermeticamente fechada, em vácuo. Dessa forma, uma menor quantidade de CO2 seria absorvido pelo KOH e, assim, haveria menor influência deste no experimento.

Apohs o período de 24h, as amostras deveriam ser removidas do KOH. A solução de KOH, por sua vez, deveria ser neutralizada com $HClO_4$ ou HCl, já que o pH das amostras para leitura de íons de flúor em eletrodo especihfico deve ser entre 5 e 6. Contudo, experimentos preliminares foram realizados para tentar levar o pH para este intervalo e mostraram que quando o acido era adicionado à solução de KOH, o pH ficava abaixo 4,5. Ainda, uma titulação foi realizada com o KOH e não conseguiu-se obter o pH entre 5 e 6. Dessa forma, optou-se por fazer as anahlises de acordo com as recomendações do fabricante do eletrodo especifico para analises em soluções alcalinas.

A.1.3.2 Análise de flúor fortemente aderida ao esmalte.

Na anahlise de flúor fortemente aderida ao esmalte seria utilizado o protocolo descrito anteriormente por Altenburger et al. (2010). Para tanto, camadas do esmate dentário seriam removidas com lixas e posteriormente dissolvidas em ahcido perclorico (0,5mL a uma concentração de 0,5M). Posteriormente, seria adicionado 2,5mL de TISABII à solução e a concetraçao de flúor seria analisada com eletrodo especifico.

Em testes preliminares com essa técnica, observou-se que o pH da solução de acido perchlorico apohs a adição de TISABII não atingia a amplitude de valores de pH necessária para a analise. Dessa forma, optou-se utilizar 1mL de acido clorídrico (HCL, 0,5M). Este acido permaneceu em contato com o pó do esmalte durante 24h, a 25°C e em agito constante. Apos esse período, eh adicionado ao

acido 1mL de TISABII contendo 20g/L de NaOH, conforme adaptado de Cury et al. (2010).

A.2 Experimento 4.2.2 – Efeito dos vernizes na progressão da desmineralização por erosão – *in vitro*.

A.2.1 Preparação das amostras

Para este experimento, foram selecionados 22 molares humanos foram preparados conforme relatado no corpo da dissertação (4.2.2.1).

Os blocos foram, então, avaliados para microdureza superficial, utilizando um Microhardness Tester (Anton Paar acoplado a um microscópio Leica, Alemanha). Os valores de microdureza variaram entre 318,3 e 394,1. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em compartimento fechado, contendo solução de armazenamento (1,5mmol/L Cálcio ($CaCl_2.2H_2O$); 1,0mmol/L fosfato (KH_2PO_4); 50mmol/L NaCl, e pH ajustado com KOH para pH=7,0), em refrigerador (5^oC)(70), até a inicialização dos testes preliminares. Esses testes preliminares foram realizados para verificar, adaptar e estabelecer o protocolo do experimento.

A.2.2 Resultados dos pré-testes estabelecendo o protocolo experimental.

Primeiramente, o projeto proposto seria para realizar um experimento de erosão em 60 amostras, com apenas 10 amostras por grupo. Entretanto, este número de amostras por grupo estava baixo, e o departamento de estatística da Universidade de Berna, representado pela Senhora Haioz, sugeriu o aumento do número de amostras por grupo para o experimento de erosão. Dessa forma, o número de amostras, que antes era 10, aumentou para 18 por grupo.

O experimento inicial seria realizado com ácido cítrico em uma concentração de 1%, pH=4,0, a 30^oC, durante 4 minutos. Porém, isso causaria uma erosão mais severa, dessa forma, optou-se por utilizar uma erosão de 90 segundos. Também, optou-se por utilizar uma solução de ácido cítrico a 0,65%; 0,034M; pH=3,6, por acreditar estar mais próximo da concentração encontrada no suco de laranja. Depois do desafio erosivo inicial, os blocos seriam mantidos em saliva artificial durante uma ciclagem de 7 dias. Porém, testes preliminares exigiram a alteração desse protocolo.

A.2.2.1 Escolha do solvente utilizado para remoção do verniz fluoretado da superfície dentária.

O protocolo para o experimento com os vernizes exigia a aplicação dos vernizes na superfície do esmalte dentário e, posteriormente, a remoção dos mesmos, para continuar os desafios erosivos e avaliar se os vernizes teriam a capacidade de proteção do esmalte. Em protocolos estabelecidos na literatura, essa remoção dos vernizes geralmente é realizada esfregando-se levemente uma bola de algodão umedecida com acetona (14, 64). Porém, no presente experimento, onde se deseja verificar o efeito do verniz em uma superfície já erodida, esse procedimento poderia causar abrasão, e parte da superfície do esmalte seria mecanicamente removida alterando os resultados. Ainda, a acetona também corrói a resina acrílica onde a amostra de esmalte está embutida, e isso poderia acabar alterando os resultados.

Para eliminar esse efeito indesejado da acetona, optou-se por utilizar o solvente Sulfóxido de Dimetila (DMSO). Das 22 amostras, foram selecionadas 4, as quais sofreram desafio erosivo utilizando ácido cítrico (0,65%; 0,034M; pH=3,6) durante 90 segundos. Após o desafio erosivo, as amostras receberam uma camada de Duraphat® e foram mantidas em saliva artificial, à 30°C, durante 6 horas. As amostras foram, então, retiradas da saliva artificial, lavadas em água deionizada e secas com ar comprimido. As amostras foram imersas em 7mL de DMSO (n=2) ou Acetona (n=2), e mediu-se o tempo para que o verniz fosse completamente removido, sem a necessidade de algodão, mas mantendo um fluxo contínuo com uma pipeta. Verificando as amostras em microscópio 20X, em intervalos de 30 segundos, observou-se que as amostras mantidas em DMSO já não apresentavam mais restos do verniz após 5 minutos. Já as amostras mantidas em acetona, ainda apresentavam restos do verniz mesmo após 8 minutos, sendo necessária uma fricção para remoção completa do verniz. Assim, optou-se por utilizar DMSO no experimento principal, no lugar da acetona.

A.2.2.2 Determinando o tempo de permanência do verniz sobre o esmalte.

O tempo inicial da permanência do verniz no esmalte dentário seria de 6 horas. Porém, isso seria inviável para ser realizado no laboratório, devido a logística dos operadores. Portanto, foram realizados pré-testes para verificar o efeito de diferentes tempos de permanência dos vernizes no esmalte. Para este teste preliminar, foi utilizado o verniz Duraphat®, por este ser o padrão ouro internacional.

Para este pré-teste, foram selecionadas 9 amostras. Essas amostras foram polidas logo antes do uso no experimento para padronizar as superfícies de esmalte. O polimento foi realizado com feltro e pasta de diamante (1µm) durante 1 minuto. A dureza superficial inicial foi medida com 5 endentações, da mesma forma como relatado anteriormente. As superfícies de esmalte foram desmineralizadas utilizando ácido cítrico (0,65%; 0,034M; pH=3,6) durante 90 segundos. A microdureza superficial foi medida mais uma vez, com outras 5 endentações, enfileiradas paralelamente e com uma distância de 100µm das endentações iniciais.

Uma camada de verniz Duraphat® foi aplicada sobre os blocos, e os blocos foram mantidos em saliva artificial durante 2 (n=2), 3 (n=2), 4 (n=2) ou 6 (n=3) horas. Após esse tempo, as amostras de esmalte foram imersas em 7mL de DMSO durante 5 minutos para remover o verniz. Após remoção da camada de verniz, a microdureza superficial foi medida mais uma vez utilizando o mesmo protocolo descrito acima.

Depois, os blocos eram submetidos a mais um desafio erosivo, conforme relatado acima, para verificar o efeito do verniz na progressão da erosão. E, depois desse desafio erosivo, a microdureza superficial dos blocos foi mais uma vez avaliada.

Observou-se que com um maior tempo de permanência do verniz fluoretado no esmalte, maiores valores de microdureza superficial eram obtidos. Porém, após o segundo desafio erosivo, os valores de microdureza dos blocos que receberam 4 e 6 horas do verniz praticamente se igualaram. Porém, esses valores eram mais elevados que àqueles os quais tiveram apenas 2 ou 3 horas de permanência do verniz (Figura A1). Dessa forma, optou-se por utilizar 4 horas de verniz para o experimento principal.

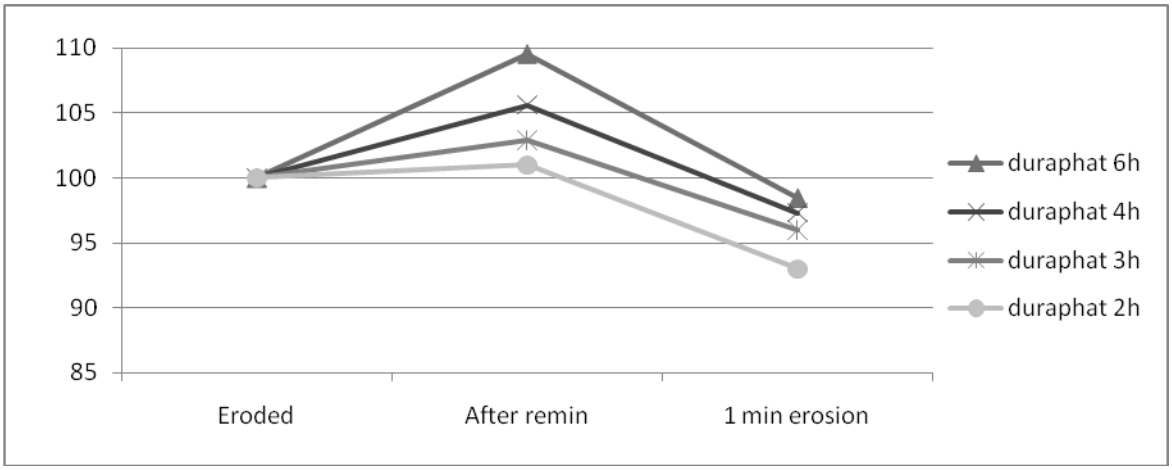

Figura A1 - Mudança percentual de microdureza superficial dos blocos que receberam 2, 3, 4 ou 6 horas de verniz após desfio erosivo inicial.

A.2.2.3 Escolha entre saliva artificial ou saliva humana para a ciclagem de erosão.

O protocolo experimental inicial tinha estabelecido que os dentes seriam mantidos em saliva artificial, como solução remineralizante. Essas soluções são ricas em íons de cálcio e fosfato, e isso favorece a remineralização do esmalte dentário. Entretanto, apesar desses íons também estarem presentes na saliva humana, esta é rica em proteínas e enzimas, as quais podem se aderir ao esmalte dentário e impedir a remineralização. Então, o uso de saliva humana nos experimentos *in vitro* pode levar a resultados mais realistas.

Como são necessários muitos doadores de saliva, em condições especiais, muitas vezes não se consegue uma quantidade suficiente de saliva humana para a realização dos experimentos *in vitro*. Uma publicação de Newby et al. (2006), sugere a mistura de saliva artificial e saliva humana em partes iguais (1:1).

Para verificar a possibilidade do uso dessa mistura nos experimentos, e se há diferenças nos uso de saliva artificial e humana após desafios erosivos, optou-se por fazer um outro experimento preliminar.

Para tanto, utilizou-se 9 amostras. As amostras foram dividas em 3 grupos (n=3), sendo um de saliva artificial; outro de saliva humana; outro de uma mistura de 1:1 de saliva humana com saliva artificial. A saliva artificial utilizada foi: 0,213g/L $CaCl_2.2H_2O$; 0,738g/L KH_2PO_4; 0,381g/L NaCl; 1.114g/L KCl; ajustado a pH=7,0 com NaOH.

Como a saliva humana seria utilizada para verificar o efeito da interação protéica sobre a remineralização do esmalte, optou-se por fazer uma adaptação na mistura proposta por Newby et al. (2006) onde a saliva artificial utilizada na mistura não continha mucina. Dessa forma, evitou-se a ocorrência de interações entre a mucina gástrica de suínos e as proteínas presentes na saliva humana, e, assim, ter um resultado mais semelhante à realidade.

A saliva humana foi coletada de 5 indivíduos saudáveis, não fumantes, no período da manhã, após 2 horas da última refeição. A salivação foi estimulada utilizando parafina para mascar. A saliva dos voluntários foi unida, formando um *pool*, e misturada a um volume igual de saliva artificial sem mucina.

As amostras de esmalte foram polidas e tratadas, avaliou-se a microdureza inicial; realizou-se o desafio erosivo; avaliou-se a microdureza mais uma vez e as amostras foram imersas na solução remineralizante (2,2mL/bloco), conforme os grupos, durante 4 horas e avaliou-se a microdureza superficial final. Não foram utilizados vernizes fluoretados nesta etapa.

Com este experimento preliminar, pôde-se observar que a dureza superficial do esmalte mantido em saliva artificial aumentou consideravelmente, havendo uma possível remineralização. Porém, não foi observada nenhuma remineralização nos blocos mantidos em saliva humana, ou na mistura (1:1) de saliva humana e saliva artificial. Ainda, observa-se na Figura A2 um padrão de comportamento semelhante entre as amostras mantidas em saliva humana pura e aquelas mantidas na mistura de saliva humana e artificial. Portanto, optou-se por utilizar a mistura salivar no experimento propriamente dito, por esta ter uma ação semelhante à saliva humana.

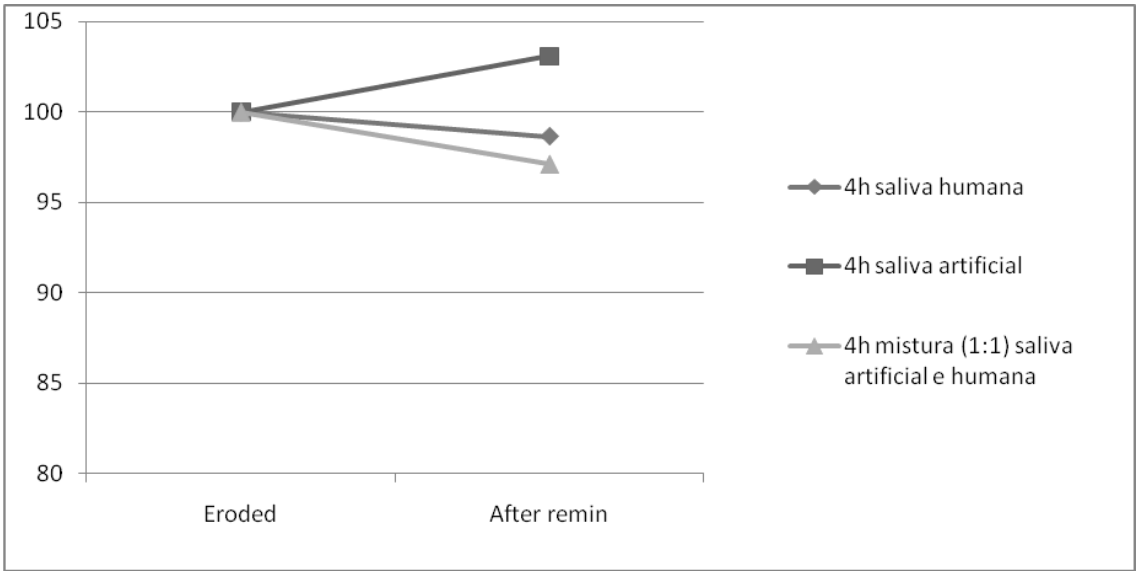

Figura A2 - Mudança percentual de microdureza superficial dos blocos mantidos em diferentes soluções “salivares”.

A.2.3 Estabelecendo o protocolo experimental.

A partir dos diversos experimentos preliminares, o protocolo experimental foi estabelecido como relatado abaixo.

Até o momento do início do experimento, os blocos foram mantidos em solução de armazenamento, contendo:

1,5mmol/L Cálcio ($CaCl_2.2H_2O$); 1,0mmol/L fosfato (KH_2PO_4); 50mmol/L NaCl, e pH ajustado com KOH para pH=7,0.

Como os blocos eram mantidos em solução de armazenamento, havia a possibilidade de alteração da microdureza inicial. Portanto, inicialmente, os blocos foram polidos em feltro e pasta de diamante de granulação de 1µm durante 1 minuto para padronização das superfícies.

A microdureza inicial (SMH_1) foi avaliada a partir de 5 endentações de carga de 50g aplicada durante 15 segundos. Essas endentações foram realizadas paralelamente entre si com uma distância de 25µm. O valor da microdureza para o bloco de esmalte será calculado obtendo-se a média entre esses valores.

Após a avaliação da SMH_1, os blocos foram imediatamente submetidos a erosão. Para tanto, os blocos foram imersos em 50mL de ácido cítrico (0,03M; 0,065%; tamponado com KOH a pH=3,6; a temperatura ambiente) durante 90 segundos em movimento constante. Após a desmineralização inicial, os blocos

foram reavaliados para microdureza superficial (SMH_2), da mesma forma como para a microdureza inicial. As novas endentações foram realizadas adjacentes às endentações inicias, a uma distância de 50µm.

Após medição da SMH_2 os blocos receberão uma camada do verniz teste. Apenas os blocos do grupo (i) não receberam essa camada de verniz. Sobre a superfície de esmalte foi colocado um molde com uma janela circular de raio medindo r=2,5mm. Esse molde foi fixado sobre o bloco de esmalte e resina acrílica com cera utilidade. Utilizando um *microbrush*, o verniz (média de 0,025g) foi colocado na janela circular sobre a superfície do esmalte.

As amostras foram, então, imersas em uma mistura de saliva humana e saliva artificial (1:1 por volume, totalizando 2,2mL/bloco) e mantidas sob movimento constante, à 30°C, durante 4 horas.

Para preparar essa mistura, foi utilizada saliva humana estimulada que foi adicionada à saliva artificial a uma proporção de 1:1 por volume. A saliva artificial foi adaptada da *Standard Laboratory Operating Procedures* onde não continha mucina gástrica: 0,213g/L $CaCl_2.2H_2O$; 0,738g/L KH_2PO_4; 0,381g/L NaCl; 1.114g/L KCl; ajustado a pH=7,0 com NaOH.

Após 4 horas na mistura salivar, os blocos de esmalte foram removidos e lavados em água deionizada durante 20 segundos. Os blocos foram, então, imersos em 7mL/bloco de DMSO (Sulfóxido de Dimetila) durante 5 minutos. Utilizando uma pipeta, criou-se um fluxo sobre os blocos de esmalte para facilitar a dissolução dos vernizes.

Posteriormente, os blocos foram levados ao microdurômetro e avaliados para microdureza superficial (SMH_3). Os blocos de esmalte foram mantidos durante a noite em câmara fechada, em 100% umidade e temperatura ambiente.

No dia seguinte, os blocos sofreram outro desafio erosivo. Para isso, eles foram, mais uma vez, imersos em ácido cítrico durante 90 segundos, depois foram lavados em água deionizada durante 20 segundos e imersos em mistura salivar durante 4 horas, conforme detalhado acima. Após esse período, os blocos foram levados ao Microdurômetro e sua dureza superficial foi mais uma vez avaliada (SMH_4). Após um período noturno, conforme explicado acima, os blocos foram

submetidos a mais um ciclo de erosão e remineralização, e, depois, a última medição da dureza superficial (SMH_5) (Figura A3).

No total, a ciclagem de erosão durou 3 dias (Figura A3), sendo que os vernizes foram aplicados apenas no primeiro dia. Ainda, os blocos sofreram erosão de 90 segundos antes da aplicação dos vernizes, e um total de 180 segundos de erosão após a aplicação dos vernizes. Foram obtidas 5 medidas de microdureza superficial de cada bloco (com um total de 25 endentações): SMH_1 – dureza inicial; SMH_2 – dureza após erosão; SMH_3 – dureza após aplicação dos vernizes; SMH_4 e SMH_5 – dureza após 2º e 3º desafio erosivo e 4 horas na mistura salivar.

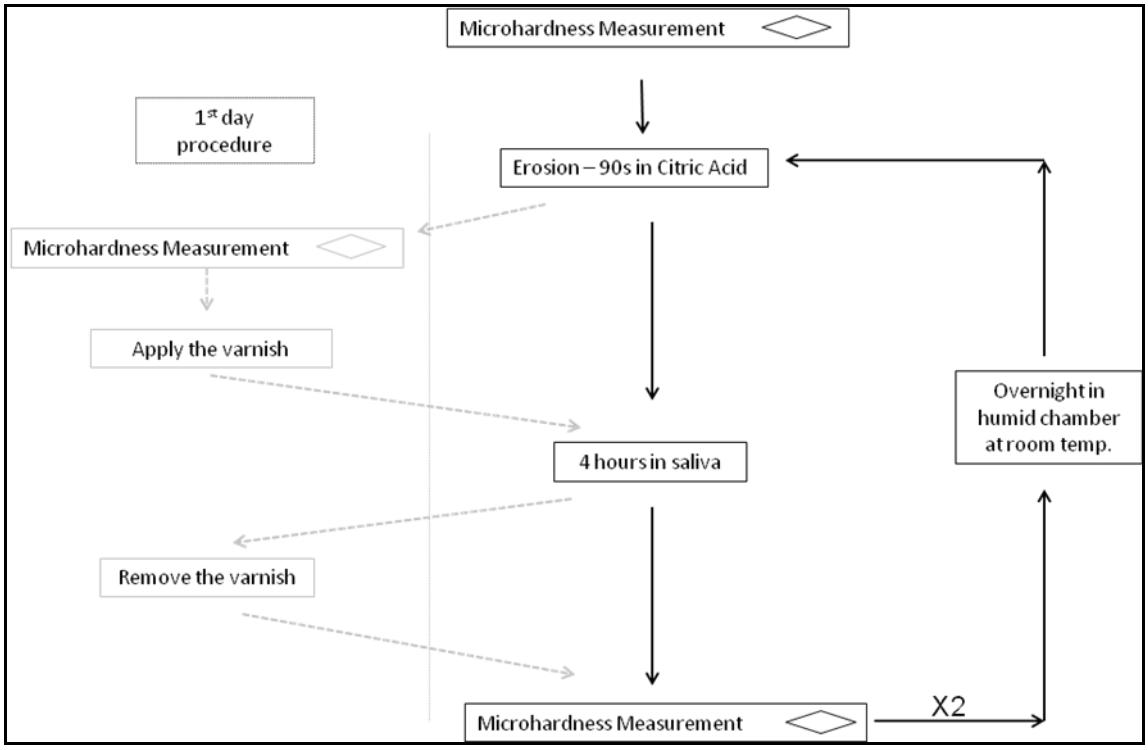

Figura A3. Fluxograma do protocolo experimental estabelecido para o primeiro experimento proposto.

UNIVERSITÄT
BERN

Medizinische Fakultät

Zahnmedizinische Kliniken

Department of Preventive, Restorative and Pediatric Dentistry

Bern, 15th February 2011

To whom it may concern

I herewith confirm that the teeth used in the study Thiago Saads Carvalho carried out were donated to the University of Bern with the consent of the patients. The teeth were going to be used for research. The kind of research made using extracted human teeth does not need a permission from an Ethic Committee in Switzerland.

Best regards

A. Lussi

Prof. Dr. med. dent. A. Lussi
Director of the Department of Preventive,
Restorative and Pediatric Dentistry

zmk bern
Zahnmedizinische
Kliniken Bern

Prof. Dr. med. dent. Adrian Lussi
Director
Dipl. Chem. Ing. ETHZ
Freiburgstrasse 7, CH-3010 Bern

Tel.: +41 (0)31 632 25 70
Fax: +41 (0)31 632 98 75
adrian.lussi@zmk.unibe.ch
www.dent.unibe.ch