TAÍS FONSECA MANTILLA

**Efeitos do gel de TiF_4 no controle da progressão da lesão de erosão em
dentina humana – estudo *in situ***

São Paulo

2014

TAÍS FONSECA MANTILLA

Efeitos do gel de TiF_4 no controle da progressão da lesão de erosão em dentina humana – estudo *in situ*

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas

São Paulo

2014

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.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Mantilla, Taís Fonseca.

Efeitos do gel de TiF₄ no controle da progressão da lesão de erosão em dentina humana: estudo *in situ* / Taís Fonseca Mantilla ; orientador Patricia Moreira de Freitas. -- São Paulo, 2014.

81p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Erosão de dente. 2. Fluoreto. 3. Titânio. 4. Dentina. I. Freitas, Patricia Moreira de. II. Título.

Mantilla TF. Efeito do gel de TiF_4 no controle da progressão da lesão de erosão em dentina humana – estudo *in situ*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em: / / 2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha Lia, minha eterna vizinha.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha mãe **Cecilia**, meu maior exemplo e inspiração, agradeço com todo o meu amor. Tenho muito orgulho de sua força e ainda quero ser como você quando crescer. Se tivesse que escolher, te escolheria de novo!

À minha irmã **Fernanda**, responsável por alguns dos meus cabelos brancos, mas que nunca vai deixar de ser a minha irmãzinha. Sempre vou te proteger!

Ao meu namorado **Gabriel**, pela paciência, companheirismo e suporte. Você foi meu escape nestes últimos meses e eu agradeço seu apoio em todos os momentos. Tenho muita sorte por te ter em minha vida! Você me faz muito feliz!

Nós conseguimos!

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meu pai **Carlos**, minha madrinha **Carla**, minha prima **Juliana** e meus sogros **Izilda** e **Fradinho**, por me apoiarem em todas as minhas decisões. O interesse de vocês pelo meu trabalho, mesmo sendo tão distante de seus assuntos cotidianos, reforça a minha certeza do carinho que têm por mim!

Às minhas muito amigas – quase irmãs – **Anariá**, **Natália**, **Vanessa** e **Angela**, presentes que ganhei cedo na vida e que hoje fazem parte de quem eu sou. Obrigada pela compreensão das minhas loucuras e ausências nos últimos tempos. Podem contar comigo sempre que precisarem!

À minha orientadora **Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas**, que me aceitou como aluna sem hesitar e enxergou em mim um potencial que nem eu mesma sabia que tinha. Você me ajudou a crescer tanto profissional quanto pessoalmente. Muito obrigada pela confiança!

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Cecilia Pedroso Turssi**, por ter sido tão acessível durante todo o meu Mestrado. O seu conhecimento e sua disponibilidade salvaram alguns de meus dias!

À minha antiga orientadora **Profa. Dra. Margareth Oda**, que me iniciou no campo da pesquisa. Sua contribuição foi fundamental para que eu decidisse seguir na área acadêmica.

Às minha amigas do Mestrado, **Samira e Andréa**, por estarem ao meu lado dentro e fora da faculdade. O apoio e companhia de vocês me estimularam a seguir em frente, deixaram meus dias mais leves e tornaram prazerosas até minhas intermináveis horas de laboratório. Nossa amizade foi a melhor surpresa que a pós-graduação me proporcionou. Adoro vocês!

À **Thayanne** e à **Camilinha**, minhas companheiras de pesquisa, que se tornaram amigas muito queridas. As nossas discussões enriqueceram bastante a minha pesquisa e todos estes momentos juntas nos deixaram ainda mais próximas. Apesar de todo o trabalho, eu me divirto muito com vocês!

A todos os meus **colegas da pós-graduação**, em especial à **Maria Cecília**, pela ajuda nesta reta final.

Às minhas **voluntárias**, que toparam me ajudar a tornar esta pesquisa possível. Vocês fazem parte desta conquista e por isto, serei eternamente grata!

A todos os **professores do Departamento de Dentística**, por todos os ensinamentos transmitidos. Guardo com carinho todas as conversas e conselhos.

Aos **funcionários do Departamento de Dentística**, principalmente Soninha, Selminha e David, por toda a ajuda. Se não fosse a disposição de vocês para atender prontamente a qualquer necessidade minha, meus dias na pós-graduação certamente teriam sido mais difíceis.

À **Profa. Dra. Marcia Martins Marques**, chefe do Departamento de Dentística da FOU SP. Seu entusiasmo me incentivou a ir além do que pensava que poderia.

Aos **funcionários da Biblioteca**, pelas orientações e dedicação na correção deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, representada pelo seu diretor Prof. Dr. Waldyr Antonio Jorge, minha segunda casa desde a graduação, onde tive a oportunidade de aprender minha profissão.

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. Marco Antonio Zago.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

A todos que torceram por mim, obrigada de coração!

RESUMO

Mantilla TF. Efeito do gel de TiF_4 no controle da progressão da lesão de erosão em dentina humana – estudo *in situ* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Com o aumento na prevalência das lesões de erosão, medidas preventivas e de controle das mesmas vêm sendo propostas. Dentre elas, encontram-se os produtos fluoretados e, mais recentemente, os compostos contendo cátions metálicos polivalentes, como o tetrafluoreto de titânio (TiF_4). Este estudo *in situ* visou avaliar os efeitos do gel de TiF_4 na inibição da progressão da erosão em dentina humana erodida e abrasionada. Para tanto, foram obtidas oitenta e quatro amostras de dentina ($3 \times 3 \times 1 \text{ mm}$) a partir de terceiros molares humanos hígidos. Setenta e duas amostras foram erodidas *in vitro* previamente a etapa *in situ* e divididas aleatoriamente em 6 grupos ($n=12$) de acordo com o tratamento e com o número de ciclos erosivos/abrasivos a serem executados durante a etapa *in situ*. Os grupos controle foram submetidos a apenas 1 (C1), 2 (C2) e 3 (C3) ciclos erosivos/abrasivos. Já os grupos experimentais receberam 1 (TiF_4 1), 2 (TiF_4 2) e 3 (TiF_4 3) aplicações de gel de TiF_4 (4%) seguidos de 1, 2 e 3 ciclos erosivos/abrasivos, respectivamente. Um sétimo grupo controle ($n=12$) foi incluído, sendo que amostras sem erosão *in vitro* foram submetidas a 3 ciclos erosivos/abrasivos. Cada ciclo erosivo/abrasivo correspondeu a 2 dias de desafios erosivos (ácido cítrico 0,5%, pH 2,6, 6x/dia) e abrasivos (1x/dia). Para realização da etapa *in situ*, as amostras foram posicionadas em dispositivos intra-orais removíveis utilizados por 12 voluntários. Os espécimes foram avaliados em perfilometria ($n=12$), microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEV ambiental) ($n=12$) e microscopia de força atômica (AFM) ($n=3$) para avaliar as alterações causadas pelo fluoreto sobre a superfície da dentina. A ANOVA a dois critérios para medidas repetidas mostrou que o desgaste superficial foi afetado pelos tratamentos avaliados ($p<0,001$). O teste de Tukey demonstrou que o grupo TiF_4 2, que não diferiu dos grupos TiF_4 1 e TiF_4 3, apresentou redução significativa no desgaste quando comparado aos grupos C1, C2, C3 e controle sem erosão *in vitro*. Os grupos TiF_4 1 e TiF_4 3 não revelaram diferença significativa em relação ao grupo C1, porém ambos os grupos de tratamento demonstraram desgaste significativamente menor que C2 e

C3. Os maiores desgastes foram verificados para C3 e controle sem erosão *in vitro*. As micrografias obtidas em MEV ambiental e AFM sugeriram a manutenção do *glaze* sobre a superfície da dentina tratada com o gel de TiF_4 , mesmo após os desafios ácidos. A superfície passou a apresentar um aspecto mais liso que as amostras dos grupos controles, com redução dos diâmetros dos lúmens dos túbulos dentinários, justificando o efeito protetor do TiF_4 . Portanto, o TiF_4 demonstrou potencial em reduzir a progressão das lesões de erosão *in situ*, independente do número de aplicações avaliado.

Palavras-chave: Erosão. TiF_4 . Dentina. *In situ*.

ABSTRACT

Mantilla TF. Effect of TiF_4 gel in the control of the progression of erosion in human dentin – an *in situ* study [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

With the increase in the prevalence of erosion lesions, preventive and control measures for them have been proposed. Among them are the fluoride products and, more recently, compounds containing polyvalent metal ions such as titanium tetrafluoride (TiF_4). This *in situ* study aimed to evaluate the effects of the TiF_4 gel on the erosion progression inhibition in human eroded and abraded dentin. For this purpose, eighty-four dentin samples (3 x 3 x 1 mm) were prepared from undamaged human third molars. Seventy-two samples of previously eroded dentin *in vitro* were allocated into 6 groups (n=12) according to the treatment to be received during the *in situ* phase and the number of erosive/abrasive cycles. Control groups were subjected to 1 (C1), 2 (C2) and 3 (C3) erosive/abrasive cycles only. Experimental groups had TiF_4 gel (4%) applied once (TiF_4 1), twice (TiF_4 2) or three times (TiF_4 3) followed by 1, 2 and 3 erosive/abrasive cycles, respectively. A seventh group (n=12) comprised *in vitro* uneroded samples that were subjected to 3 erosive/abrasive cycles. Each cycle corresponded to 2 days of erosive (citric acid 0.5%, pH 2,6, 6x/day) and abrasive (1x/day) challenges. To perform the *in situ* stage, the samples were placed in removable intra-oral devices used by 12 volunteers. Specimens were evaluated in profilometry (n=12), environmental scanning electron microscopy (ESEM) (n=12) and atomic force microscopy (AFM) (n=3) to evaluate the changes caused by fluoride on the surface of the dentin. The two-factor ANOVA for repeated measures showed that, after profilometric analysis, the surface loss was affected by the treatments evaluated ($p < 0.001$). Tukey's test showed that TiF_4 2 group, which did not differ from TiF_4 1 and TiF_4 3 groups showed a significant reduction in surface loss compared to C1, C2, C3 and *in vitro*-uneroded control. The TiF_4 1 and TiF_4 3 groups showed no significant difference from C1, but both treatment groups demonstrated significantly smaller surface loss than C2 and C3. The greatest losses were observed for C3 and *in vitro*-uneroded control. The micrographs by ESEM and AFM suggested the maintenance of the *glaze* on the dentin surface treated with the TiF_4 gel, even after acid challenge. The surface started to show a smoother appearance than samples from control

groups, with reduced diameters of the dentinal tubules lumens, explaining the protective effect of TiF_4 . Therefore, the TiF_4 demonstrated potential to reduce the progression of erosion lesions, regardless of the number of applications evaluated.

Keywords: Erosion. TiF_4 . Dentin. *In situ*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADD	água destilada-deionizada
Ca	cálcio
cm	centímetro
UPVC	cloreto de polivinil não plastificada
Sn	estanho
Ex	exemplo
F	flúor
AmF	fluoreto de amina
CaF ₂	fluoreto de cálcio
NaF	fluoreto de sódio
FFA	flúor fosfato acidulado
CPP-ACP	fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo
P	fósforo
g	grama
h	hora
F ⁻	íon flúor
H ⁺	íon hidrogênio
Ltda	limitada
L	litro
MMP	metaloproteinase da matriz
μL	microlitros
μm	micrometro
μm/s	micrometros por segundo

AFM	atomic force microscopy (microscopia de força atômica)
MEV	microscópio eletrônico de varredura
mL	mililitro
mL/min	mililitros por minuto
mm	milímetro
M	molar
MFP	monofluorofosfato de sódio
N	newton
TiO ₂	óxido de titânio
ppm	partes por milhão
pH	potencial de hidrogênio
kGy	quilogreys
rpm	rotações por minuto
s	segundo
HfF ₄	tetrafluoreto de háfnio
TiF ₄	tetrafluoreto de titânio
ZrF ₄	tetrafluoreto de zircônia
3D	tridimensional

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
>	maior
<	menor
%	por cento
x	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Erosão – alterações no substrato	21
2.2 Influência da saliva na erosão	24
2.3 Prevenção e tratamentos para erosão	26
2.3.1 Fluoretos	27
2.3.2 Tetrafluoreto de titânio	28
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Aspectos éticos	32
4.2 Delineamento experimental	32
4.3 Preparo das amostras	34
4.4 Seleção das amostras de dentina	35
4.5 Proteção das amostras	35
4.6 Desafio erosivo <i>in vitro</i>	36
4.7 Seleção dos voluntários	37
4.7.1 Avaliação do fluxo salivar estimulado e pH salivar	37
4.8 Preparo do dispositivo intra-oral	38
4.9 Esterilização das amostras	39
4.10 Posicionamento das amostras nos dispositivos	39
4.10.1 Grupos experimentais	40
4.11 Procedimentos intra-bucais	41
4.11.1 Higiene bucal dos voluntários	41
4.11.2 Desafio erosivo/abrasivo <i>in situ</i>	42
4.11.3 Aplicação do TiF_4	44
4.12 Análise perfilométrica	45
4.13 Análise em microscópio eletrônico de varredura ambiental	46
4.14 Análise em microscópio de força atômica	47
4.15 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48

5.1 Perfilometria óptica	48
5.2 Microscopia eletrônica de varredura	49
5.3 Microscopia de força atômica	52
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICES	72
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

A erosão dentária é um processo químico, caracterizado pela dissolução patológica e crônica dos tecidos duros dentais, decorrente da exposição a uma variedade de ácidos de procedência não-bacteriana (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011). Estes podem ter origem intrínseca ou extrínseca. Os ácidos intrínsecos, representados principalmente pelo ácido clorídrico presente no suco gástrico, entram em contato com os dentes por meio da doença do refluxo gastro-esofágico ou por vômitos crônicos causados por transtornos alimentares. Já aqueles de origem extrínseca alcançam a cavidade oral, na maioria das vezes, por meio da ingestão de alimentos e bebidas ácidas (Ganss et al., 2012). No entanto, o potencial erosivo destes produtos não pode ser determinado apenas pelo seu pH, mas também pelo tipo do ácido adicionado ao produto, sua capacidade tampão, propriedade quelante de cálcio e seu conteúdo mineral (Wang; Lussi, 2012).

Com a dissolução inicial do esmalte, forma-se na superfície dental uma fina camada desmineralizada, que possui dureza reduzida e maior rugosidade de superfície e é mais susceptível à ação de forças mecânicas, como a abrasão por escovação (Jaeggi; Lussi, 1999; Eisenburger et al., 2003; Rios et al., 2006; Magalhães et al., 2007). A esta interação de fatores somam-se aspectos químicos, biológicos e comportamentais, determinando a etiologia multifatorial do desgaste erosivo (Wang; Lussi, 2012). Este desgaste pode levar a uma perda irreversível de esmalte, que pode ocasionar até a exposição da camada de dentina (Lussi et al., 2011; Schlueter et al., 2011a). Clinicamente, a exposição da dentina tende a acarretar o aparecimento de hipersensibilidade dentinária (West, 2008), assim como a perda da anatomia dental e da dimensão vertical (Schlueter et al., 2012), resultando em problemas estéticos e/ou funcionais para os pacientes.

Medidas preventivas e de controle da progressão da lesão de erosão foram propostas no sentido de alterar a superfície do tecido dental, aumentando sua resistência ácida. Os produtos fluoretados têm se mostrado eficientes em controlar lesões de erosão (Vieira et al., 2005; Schlueter et al., 2007; Wiegand et al., 2010a). Dentre os compostos mais comumente utilizados encontram-se o fluoreto de sódio (NaF) (Schlueter et al., 2007), fluoreto de amina (AmF) (Vieira et al., 2005; Wiegand et al., 2010a) e flúor fosfato acidulado (FFA) (Hals et al., 1981). Os mecanismos de

ação dos fluoretos na erosão dental ainda não foram completamente esclarecidos, porém acredita-se que eles ajam pela precipitação de minerais, como o fluoreto de cálcio (CaF_2), na superfície erodida (Wahengbam et al., 2011). Estes interagem com as moléculas de fosfato e/ou proteína da superfície dental, aumentando seu tempo de retenção nesta superfície. Forma-se, então, uma camada que funciona como uma barreira física frente à ação dos ácidos, além de agir como um reservatório mineral, que sob desafio erosivo é capaz de liberar cálcio e fluoreto para o meio oral, deixando-o supersaturado em relação ao tecido dental e, portanto, favorecendo a sua remineralização (Levy et al., 2012).

Atualmente, fluoretos compostos por cátions metálicos polivalentes, especialmente o fluoreto de titânio, têm sido largamente estudados devido à sua interação única com as estruturas dentais, que levam à formação de uma camada ácido-resistente tipo *glaze* (Mundorff et al., 1972), capaz de se aderir fortemente à superfície dental (Sen; Büyükyilmaz, 1998). Dentre as teorias existentes para explicar sua ação, acredita-se que a interação entre o TiF_4 e as proteínas da superfície dental (Yoshida; Hayakawa, 2013) influencie a absorção do fluoreto em esmalte (Hals et al., 1981; Gu et al., 1996; Ribeiro et al., 2006). Também há especulações de que o titânio seja capaz de reagir com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato do tecido dental, formando óxidos estáveis de titânio (Tveit et al., 1988; Ribeiro et al., 2006) ou complexos organometálicos que podem agir como uma barreira de difusão (Mundorff et al., 1972).

Para que se possa determinar a abordagem mais eficaz para o controle da erosão, além da eliminação dos fatores etiológicos associados ao desenvolvimento das lesões, existe a necessidade da indicação do tratamento mais adequado. No entanto, ainda não há um consenso quanto à melhor opção de tratamento para inibição da progressão da erosão. Neste sentido, devido às suas propriedades, o TiF_4 pode ser uma boa alternativa de escolha (Hove et al., 2008; Comar et al., 2012; Wiegand et al., 2010a; Lepri et al., 2013; Levy et al., 2014) para estes casos. Entretanto, como ainda não se sabe qual a ação deste tipo de fluoreto na superfície da dentina erodida e abrasionada, existe a necessidade da simulação das condições biológicas presentes na boca, já que as técnicas disponíveis para avaliação da progressão das lesões de erosão ainda não permitem estudos *in vivo*. Neste sentido, este estudo *in situ* foi delineado para contribuir com o esclarecimento dos efeitos do

TiF₄, na forma de apresentação em gel, sobre a superfície da dentina erodida e submetida à abrasão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Erosão – alterações no substrato dental

O desgaste dentário é uma condição patológica multifatorial (Figura 2.1) que induz à perda progressiva de tecido duro dental. Dentre as lesões não-cariosas, a erosão é causada pela ação de ácidos de origem não-bacteriana (Imfeld, 1996; Schlueter et al., 2012).

Figura 2.1 - Fatores capazes de influenciar o desenvolvimento da erosão (Imagem extraída de Lussi et al., 2011)

Os ácidos, que podem ter sua origem endógena (ex: ácido clorídrico proveniente do suco gástrico) ou exógena (ex: alimentos e bebidas ácidas), agem diretamente sobre a superfície dental (Ganss et al., 2012). Quando a exposição a soluções de pH baixos ocorre, há uma desmineralização inicial do tecido mineralizado (amolecimento) (Lussi et al., 2011), devido ao grau de saturação do meio em relação ao do tecido dental (Larsen, 1990).

Sabe-se que em condições de pH abaixo de 3,5 a dissolução aumenta exponencialmente (Figura 2.2) (West et al., 2001), no entanto, diferentemente do

que ocorre em lesões cariosas, o pH crítico para a formação de lesões de erosão não é definido (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2012). Isto porque o pH crítico é o pH no qual os fluidos presentes na cavidade bucal encontram-se saturados em relação à superfície dental (Ganss et al., 2012), porém este também é dependente de outros fatores, como a solubilidade do tecido dental e concentração de minerais presentes na saliva e na solução ácida, no caso, cálcio, fosfato e fluoreto (Lussi et al., 2011). Portanto, se ocorrer um desequilíbrio na reação de troca mineral entre dente e fluidos da cavidade oral, sendo o tecido dental supersaturado em relação ao meio, a desmineralização da superfície dental se inicia.

Figura 2.2 - Efeito do pH nos desgastes em esmalte (a) e dentina (b) (Imagem extraída de West et al., 2001)

O processo de erosão dental é caracterizado inicialmente por uma desmineralização da superfície do esmalte (Rios et al., 2006; Schlueter et al., 2012) (Figura 2.3a), que leva a um amolecimento superficial, seguido por uma contínua dissolução camada-a-camada dos cristais do esmalte (Lussi et al., 2011; Schlueter et al., 2012). Esta desmineralização ocorre de maneira centrípeta (Magalhães et al., 2011a), iniciando-se pela área interprismática e seguindo pela região central do prisma (Lussi; Jaeggi, 2008). O aumento da área desmineralizada leva a um aumento da rugosidade de superfície (Nekrashevych; Stösser, 2003) e à diminuição de microdureza do substrato dental (Lussi et al., 1993; Lussi et al., 2000; Turssi et al., 2010), tornando a superfície do esmalte mais susceptível à ação de forças

mecânicas (Jaeggi; Lussi, 1999; Eisenburger et al., 2003; Wiegand et al., 2008a). Se o desafio erosivo persistir, a dissolução mineral progride (Figura 2.3b), podendo levar até à exposição da camada de dentina (Figura 2.3c).

Figura 2.3 - Estágios da desmineralização erosiva. Inicia-se com um amolecimento superficial do esmalte, sem perda tecidual visível (a), progredindo para uma perda mineral com formação da lesão de erosão (b) e finalmente, evolução da dissolução até a exposição da camada de dentina (c) (Imagem extraída de Schlueter et al., 2012)

Assim como acontece na camada de esmalte, a porção inorgânica da dentina também é rapidamente dissolvida pelos ácidos. A perda mineral tem início na dentina peritubular, ocasionando um alargamento dos túbulos dentinários, seguido da desmineralização da dentina intertubular (Meurman et al., 1991; Kinney et al., 1995). No entanto, a porção orgânica se mantém, expondo uma densa e fibrosa camada de fibras colágenas (Breschi et al., 2002). Logo abaixo desta camada, encontra-se uma dentina parcialmente desmineralizada, seguida de dentina hígida (Kinney et al., 1995). Isto porque a porção orgânica não é afetada pelos ácidos da cavidade oral (Ganss et al., 2012) e funciona como uma barreira de difusão, limitando as trocas iônicas e consequentemente, protegendo as camadas inferiores de dentina dos efeitos causados pelo baixo pH do meio externo (Ganss et al., 2004). Esta matriz orgânica é bastante resistente a forças mecânicas, mantendo não apenas a cobertura, mas também sua estrutura frente a cargas de até 4 N durante a escovação (Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009a). Entretanto, esta camada pode ser degradada por enzimas proteolíticas, especialmente as metaloproteinases da

matriz (MMPs) presentes na dentina e saliva (van Strijp et al., 2003; Buzalaf et al., 2012a), devido a sua capacidade de hidrolisar componentes da matriz extracelular (Kato et al., 2009).

Diversas MMPs já foram identificadas na dentina (Tjäderhane et al., 1998; van Strijp et al., 2003; Hannas et al., 2007; Santos et al., 2009; Kato et al., 2011), sendo que a MMP-8 parece ser a enzima mais colagenolítica (Sulkala et al., 2007). As MMPs são secretadas na forma de precursores inativos e necessitam de ativação por meio do contato com substâncias de pH baixo para degradar a matriz orgânica (Tjäderhane et al., 1998; Chaussain-Miller et al., 2006; Hannas et al., 2007; Kato et al., 2009). Em lesões de erosão em dentina, a presença de ácidos na cavidade bucal, pode levar à exposição das fibrilas colágenas (Hara et al., 2005) e ativação das MMPs (Chaussain-Miller et al., 2006; Hannas et al., 2007). No entanto, apesar de ativas, estas não são capazes de agir sob pH ácidos. Após a neutralização do pH do meio pela capacidade tampão da saliva, as MMPs previamente ativadas degradam a matriz colágena (Chaussain-Miller et al., 2006), deixando a camada parcialmente desmineralizada da dentina exposta e susceptível novamente à ação de ácidos e, conseqüentemente, à progressão do processo de erosão (Nordbo et al., 2003; Buzalaf et al., 2012b).

2.2 Influência da saliva na erosão

Diversos fatores fisiológicos são capazes de modificar o processo de erosão. Entre eles encontram-se composição e anatomia dentais, oclusão, relação entre dentes e tecidos moles e em especial, a saliva (Imfeld, 1996; Zero, 1996; Gregg et al., 2004; Lussi; Jaeggi, 2008). Características e propriedades inerentes à saliva podem promover proteção ao tecido dental frente a desafios ácidos (Zero, 1996; Lussi; Jaeggi, 2008).

A saliva é formada por compostos orgânicos e inorgânicos. Dentre os inorgânicos, o bicarbonato é responsável pela capacidade tampão salivar (Vukosavljevic et al., 2014), enquanto cálcio e fosfato determinam o seu grau de saturação (Larsen, 1990; Zero, 1996; Buzalaf et al., 2012a). Quando a concentração destes compostos inorgânicos na saliva é maior na superfície dental, pode haver a

sua redeposição sobre o tecido dental e reendurecimento do tecido desmineralizado (Rios et al., 2006). No entanto, pacientes com erosão dental, apesar de apresentarem fluxo salivar normal, possuem menores quantidades de cálcio, sódio e fosfato em sua saliva que indivíduos saudáveis (Bardow et al., 2013). Neste sentido, para auxiliar estes pacientes na prevenção do aparecimento de novas lesões, uma alternativa que pode ser adotada é a estimulação salivar, por exemplo, pelo uso de goma de mascar sem açúcar, que é capaz de diminuir a perda mineral (Rios et al., 2006) devido ao aumento da oferta de bicarbonato no meio bucal (Buzalaf et al., 2012a). Além disso, o fluxo salivar é importante na proteção do tecido dental, já que juntamente com a deglutição, é responsável pela remoção das substâncias da cavidade oral (Ganss et al., 2012).

Alguns autores ainda reportam que a saliva de pacientes com lesões já identificadas apresenta pH crítico mais alto e grau de saturação mais baixo (Bardow et al., 2013), favorecendo a evolução da erosão devido a força de dissolução que age sobre a superfície dental supersaturada em relação ao meio bucal, acarretando na perda mineral superficial (Lussi et al., 2011). Somados a isto, pacientes que apresentam a patologia tendem a apresentar maior queda no pH após a exposição a substâncias ácidas quando comparada a de pacientes saudáveis, além de manter o pH baixo por mais tempo (Lussi et al., 2012), fator este que também contribui para a progressão da dissolução do tecido dental.

A parte orgânica da saliva, por sua vez, é basicamente constituída por proteínas e glicoproteínas (Buzalaf et al., 2012a). Dentre estas, são comumente identificadas proteínas ricas em prolina (PRPs), estaterina e histatina. Estas também são conhecidas como “precursoras de película”, já que logo nos primeiros segundos de exposição dos dentes à saliva, adsorvem-se à superfície dental dando início a formação da película adquirida (Siqueira et al., 2012). A partir daí, inicia-se a agregação de outras proteínas (de origem salivar ou não-salivar) a estas precursoras até que por volta de 2 horas após o começo do processo, alcança-se o equilíbrio e a formação de uma película adquirida madura está completa (Lendenmann et al., 2000).

A película adquirida pode ser definida como uma fina camada acelular, homogênea e livre de bactérias que se forma sobre tecidos duros e moles após exposição aos fluidos presentes na cavidade bucal (Armstrong, 1968; Buzalaf et al., 2012a; Siqueira et al., 2012). A presença desta camada pode auxiliar na proteção

das superfícies dentais contra a dissolução ácida devido a sua capacidade de agir como uma barreira de difusão e membrana de permeabilidade seletiva (Hara et al., 2006; Buzalaf et al., 2012a; Ganss et al., 2012), além de controlar a precipitação de minerais sobre a superfície dental (Zahradnik, 1979) e promover a lubrificação da mesma (Siqueira et al., 2012).

Em pacientes que apresentam lesões de erosão, o total de proteínas e concentração de cálcio presentes na película adquirida são mais baixos que os de indivíduos saudáveis (Carpenter et al., 2014), podendo acarretar uma menor proteção da superfície dental frente a ação de substâncias ácidas e levar a uma rugosidade elevada e redução da dureza superficial (Moazzez et al., 2014).

Devido à importante proteção proporcionada pela saliva aos tecidos dentais frente a desafios erosivos (Wetton et al., 2006), estudos que simulem ao máximo as condições que ocorrem na cavidade oral mostram-se relevantes para a real avaliação de fatores que possam interferir no processo erosivo. Neste sentido, trabalhos *in situ* têm sido realizados (Hove et al., 2008; Magalhães et al., 2009; Wiegand et al., 2010a; Levy et al., 2014), já que além de permitirem o contato das amostras com o ambiente oral, ainda possibilitam condições experimentais padronizadas (Wiegand; Attin, 2011) e utilização das técnicas de avaliação disponíveis (Hove et al., 2008).

2.3 Prevenção e tratamentos para erosão

Diversas alternativas de tratamento vêm sendo propostas para prevenção e controle da erosão. Dentre elas podem ser citados os fluoretos (Wiegand et al., 2008b; Schlueter et al., 2011b; Comar et al., 2012; Mathews et al., 2012), soluções antiácidas (Turssi et al., 2012), lasers de alta potência (Wiegand et al., 2010b; Magalhães et al., 2011b; Lepri et al., 2013), adesivos (Azzopardi et al., 2004; Sundaram et al., 2007), selantes (Bartlett et al., 2011) e em casos com grande perda tecidual, restaurações adesivas (Schlueter et al., 2012).

2.3.1 Fluoretos

Fluoretos são sabidamente capazes de formar uma camada de precipitados minerais sobre a superfície dental (Magalhães et al., 2011a; Schlueter et al., 2011b). Logo após a aplicação do flúor, há a deposição de fluoreto de cálcio (CaF_2) sobre os dentes o que, frente a desafios cariogênicos, pode ser bastante vantajoso devido à liberação de íons fluoreto pela dissolução do composto causada pela queda no pH do biofilme (Wiegand et al., 2010c).

Frente à desafios erosivos, além da liberação de fluoreto, a camada de CaF_2 pode funcionar como uma barreira física e evitar o contato direto entre ácidos e superfície dental (Wiegand et al., 2010c). No entanto, frente à redução significativa de pH, como ocorre em desafios erosivos, esta proteção pode não ser eficiente e a formação de camadas mais resistentes à dissolução ácida é necessária (Ganss et al., 2012). Para tanto, terapias com agentes com altas concentrações de fluoretos ou aplicações com tempo prolongado têm se mostrado mais eficientes, já que são capazes de formar camadas de CaF_2 mais espessas, densas e estáveis (Wiegand; Attin, 2003; Lagerweij et al., 2006; Wiegand et al., 2010c). No entanto, a proteção conferida pelos compostos fluoretados utilizados comumente para prevenção de lesões cariosas, como fluoreto de sódio e fluoreto de amina, ainda têm se mostrado limitada para casos de erosão (Vieira et al., 2005; Ganss et al., 2010a; Levy et al., 2012; Comar et al., 2012; Mathews et al., 2012). Por este motivo, compostos contendo cátions metálicos polivalentes combinados a fluoretos vêm sendo testados.

O fluoreto estanhoso é um exemplo deste tipo de combinação que tem se mostrado eficiente (Ganss et al., 2004; Hove et al., 2008; Ganss et al., 2010a; Schlueter et al., 2011b; Schlueter et al., 2014), agindo provavelmente pela precipitação de uma camada amorfa relativamente ácido resistente (Hove et al., 2006; Schlueter et al., 2009) composta por sais de Sn/F/P ou Ca/P, dependendo da composição da fórmula aplicada (Krutchkoff, 1972; Babcock et al., 1978; Ganss et al., 2010b). No esmalte, sob desafios erosivos, íons de estanho são incorporados à superfície por um processo de desmineralização-remineralização que altera a camada superficial de esmalte, elevando sua resistência ácida (Schlueter et al., 2009; Ganss et al., 2010b). Já na dentina, os íons se distribuem de maneira homogênea na camada orgânica desmineralizada, se difundem, se acumulam e são

retidos na porção mineralizada subsuperficial, já que tem maior afinidade por compostos inorgânicos (Ganss et al., 2010b). Isto porque o colágeno presente na matriz orgânica apresenta grande quantidade de compostos potencialmente carregados negativamente que podem atrair íons estanho (Ganss et al., 2010b). No entanto, caso a porção orgânica desmineralizada tenha sido degradada por enzimas presentes na cavidade bucal, como as MMPs, forma-se uma camada de precipitados na superfície semelhante àquela encontrada em esmalte (Ganss et al., 2010b)

Além das fórmulas fluoretadas formadas com compostos divalentes, como o fluoreto estanhoso, vêm sendo investigados os tetrafluoretos, especialmente os de titânio (TiF_4), zircônia (ZrF_4) e háfnio (HfF_4) (Wiegand et al., 2008c; Wiegand et al., 2010a).

2.3.2 Tetrafluoreto de titânio

O íon titânio tem a capacidade de formar complexos concomitantemente com fluoretos e tecidos dentais (Skartveit et al., 1991; Wahengbam et al., 2011). Por este motivo, a sua ação enquanto TiF_4 vem sendo largamente estudada (Wei et al., 1976; Tveit et al., 1988; Büyükyilmaz et al., 1997; Wiegand et al., 2008b; Levy et al., 2014) na Odontologia. Sob a forma de TiF_4 , o fluoreto apresenta vantajosa estabilidade e mecanismo de ação diferenciado em relação aos demais fluoretos. No entanto, quando hidrolisado, gera uma solução bastante ácida (Sen; Büyükyilmaz, 1998) pela quebra das moléculas de água pelo íon titânio e, conseqüente, liberação de íons H^+ , o que pode levar a uma relativa citotoxicidade (Sen et al., 1998), ainda que o TiF_4 , quando administrado via enteral, não apresente sinais de toxicidade sistêmica (Shresta, 1983). Apesar da acidez da solução, a desmineralização superficial causada é apenas parcial (Tveit et al., 1988; Skartveit et al., 1991) e pode favorecer a penetração do fluoreto no tecido mineralizado (Hals et al., 1981; Skartveit et al., 1989a).

Além da penetração do fluoreto e incorporação do titânio na hidroxiapatita (Wiegand et al., 2010c), outros fatores também contribuem para a proteção conferida pelo TiF_4 ao tecido dental. A interação eletrostática que ocorre entre o TiF_4

e as proteínas da película adquirida (Yoshida; Hayakawa, 2013) e a presença de matriz orgânica na superfície dental (Gu et al., 1996) são capazes de influenciar positivamente a incorporação de flúor pelo tecido dental (Hals et al., 1981). Ainda há a formação de uma camada ácido resistente sobre a superfície dental (Wei et al., 1976; Büyükyilmaz et al., 1997; Sen; Büyükyilmaz, 1998), que assemelha-se a um *glaze* e ultraestruturalmente é composta por numerosas partículas esféricas (Sen; Büyükyilmaz, 1998; Wiegand et al., 2009).

Pela alta afinidade entre os íons titânio e os átomos de oxigênio, o titânio, liberado após a hidrólise das moléculas de TiF_4 , pode se unir ao oxigênio derivado da água ou das moléculas de fosfato da superfície dental, formando uma camada de TiO_2 (Tveit et al., 1988), que é química e termicamente estável e resistente à corrosão (Gordon et al., 2012). Uma alternativa a esta hipótese propõe que o *glaze* seja composto por complexos organometálicos formados entre titânio e matriz orgânica dental (Mundorff et al., 1972).

Devido à possibilidade de formação desta camada ácido resistente, o TiF_4 é responsável pela produção de uma barreira de difusão e de um reservatório de íons flúor, que podem retardar a dissolução do tecido dental frente a desafios ácidos (Wiegand et al., 2010c). Por este motivo, seu efeito sobre a erosão tem sido estudado e tem obtido resultados promissores tanto em esmalte (Hove et al., 2006; Schlueter et al., 2007; Hove et al., 2008; Wiegand et al., 2008b; Magalhães et al., 2009; Wiegand et al., 2009; Magalhães et al., 2010; Comar et al., 2012; Levy et al., 2014) quanto em dentina (Wiegand et al., 2008c; Wiegand et al., 2010a; Levy et al., 2012; Lepri et al., 2013).

Estes resultados são dependentes da concentração, forma de apresentação, pH e tempo de aplicação do TiF_4 (Vieira et al., 2005; Hove et al., 2008; Wiegand et al., 2009; Levy et al., 2014), no entanto não existe um consenso sobre qual seria o protocolo ideal. Variadas combinações já foram testadas, mas alguns fatores obtiveram mais sucesso que outros. Quanto ao veículo de aplicação, o mais simples seria a incorporação do TiF_4 nos dentifrícios, no entanto, sabe-se que em condições de pH baixos, o fluoreto apresenta melhores resultados quanto à formação de precipitado sobre a superfície dental e redução da desmineralização (Wiegand et al., 2009). Esta acidez impossibilita a aplicação doméstica regular do TiF_4 em seu pH natural (pH 1,2), sendo necessário o ajuste do mesmo, o que pode comprometer a sua ação (Comar et al., 2012). Desta forma, aplicações controladas por cirurgões-

dentistas seriam a alternativa de escolha e apresentações na forma de soluções (Schlueter et al., 2007; Hove et al., 2008; Wiegand et al., 2008c; Wiegand et al., 2010a), géis (Vieira et al., 2005; Lepri et al., 2013) e vernizes (Magalhães et al., 2010; Levy et al., 2012; Levy et al., 2014) vêm sendo testadas, podendo influenciar positivamente a manutenção do efeito do fluoreto por se manterem na superfície dental por mais tempo e, conseqüentemente, prolongarem seu contato com os dentes (Ganss et al., 2012).

Quanto à concentração ideal, compostos contendo 4% de TiF_4 em sua composição obtiveram melhores resultados quando comparados com concentrações menores, sendo capaz de formar um *glaze* mais espesso e tenaz após o tratamento (Büyükyilmaz et al., 1997) e reduzir o amolecimento superficial causado pelos desafios ácidos (Magalhães et al., 2009). Além disso, tempos de aplicação prolongados, entre 2 e 4 minutos, podem favorecer a retenção de F^- na superfície dental (Skartveit et al., 1989a) e diminuir a perda mineral pelo tecido dental sob a ação de ácidos (Wiegand et al., 2008b).

Apesar dos estudos atuais buscarem uma padronização nos procedimentos experimentais a fim de simular as condições que ocorrem na cavidade oral durante os desafios erosivos (Wiegand; Attin, 2011), variados modelos, experimentais e de análise (Schlueter et al., 2011a; Wiegand; Attin, 2011), são utilizados para testar a eficácia dos produtos para controle da erosão. Baseado no conhecimento de todos os fatores envolvidos no processo de erosão dental (indivíduo, substrato dental, composição salivar, etc), estudos *in situ* se mostram mais adequados pelo seu potencial de se aproximar às condições fundamentais para a progressão de lesões de erosão sem afetar a dentição natural (Wiegand; Attin, 2011). Entretanto, a escassez deste tipo de experimento com a utilização do TiF_4 (Hove et al., 2008; Magalhães et al., 2009; Wiegand et al., 2010a; Levy et al., 2014) ainda impossibilita um acordo dentro da comunidade científica quanto a sua formulação ideal e mais efetiva. Diante dos resultados apresentados por diversas terapias propostas para a inibição ou redução do processo de perda mineral, torna-se importante avaliar diferentes protocolos do uso do TiF_4 , que se mostrem efetivos e seguros, com vistas a sua futura aplicação clínica.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o potencial do gel de TiF_4 na inibição da progressão da lesão de erosão em dentina humana submetida à erosão e abrasão *in situ*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Foram utilizados 42 terceiros molares humanos recém-extraídos cedidos pelo Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e com a concordância do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOUSP) da mesma instituição (nº CAAE - 24518013.8.0000.0075) (Anexo A).

4.2 Delineamento experimental

O presente estudo *in situ* envolveu um desenho em blocos (voluntário) e foi realizado em 2 períodos de 8 dias, durante os quais 12 voluntários utilizaram dispositivos intra-orais contendo amostras de dentina humana.

O fator em estudo foi o tratamento superficial da dentina humana, em sete níveis, como descrito a seguir:

- C1: dentina erodida *in vitro* submetida a 2 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, totalizando 12 desafios erosivos e 2 abrasivos (1 ciclo);
- C2: dentina erodida *in vitro* submetida a 4 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, totalizando 24 desafios erosivos e 4 abrasivos (2 ciclos);
- C3: dentina erodida *in vitro* submetida a 6 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, totalizando 36 desafios erosivos e 6 abrasivos (3 ciclos);
- Controle sem erosão *in vitro*: dentina hígida submetida a 6 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, totalizando 36 desafios erosivos e 6 abrasivos (3 ciclos);

- TiF₄ 1: dentina erodida *in vitro* submetida a 1 aplicação de gel de TiF₄ e 2 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, totalizando 12 desafios erosivos e 2 abrasivos (1 ciclo);
- TiF₄ 2: dentina erodida *in vitro* submetida a 2 aplicações de gel de TiF₄ e 4 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, totalizando 24 desafios erosivos e 4 abrasivos (2 ciclos);
- TiF₄ 3: dentina erodida *in vitro* submetida a 3 aplicações de gel de TiF₄ e 6 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, totalizando 36 desafios erosivos e 6 abrasivos (3 ciclos).

Para tanto, 84 amostras de dentina com dureza média de $78,62 \pm 8,13$ (Turssi et al., 2010) e curvatura de superfície iniciais de $0,27 \pm 0,18 \mu\text{m}$ (Turssi et al., 2014) foram selecionadas e divididas aleatoriamente entre os 12 voluntários e 7 grupos. No 1º período (fase controle) foram testados os grupos sem aplicação de flúor e no 2º período (fase experimental) foram testados os grupos com aplicação de flúor (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Combinação possível para distribuição das amostras nas fases controle e experimental, em um mesmo voluntário (dispositivos bilaterais)

Após o término da fase *in situ*, foi realizada a análise quantitativa do desgaste (em μm) por meio de teste de perfilometria.

4.3 Preparo das amostras

Foram utilizados 42 terceiros molares recém-extraídos, hígidos, sem lesões de cárie, trincas ou restaurações. Os dentes permaneceram armazenados em solução de cloramina T (4 °C) (Mobarak et al., 2010) por um período máximo de três meses após a data de extração. Foi realizada a limpeza dos dentes com a utilização de curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o polimento com pedra-pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água com o auxílio de escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação, seguidas de lavagem com água destilada. Após a limpeza, as raízes foram seccionadas em máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltda, Lake Buff, Illinois, EUA) e das superfícies radiculares de cada dente foram obtidos 130 fragmentos quadrangulares de dentina com dimensões aproximadas de 3,0 (altura) x 3,0 (comprimento) x 1,0 mm (espessura). Em seguida, ambas as superfícies de cada fragmento foram polidas (Ecomet/Automat 250 grinder-polisher, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) com lixas de óxido de alumínio com granulações de #600 e #1200 (Buehler Ltda., Lake Buff, IL, EUA – Padrão FEPA), seguido da suspensão de alumina de 0,3 μm (Alfa Micropolish, Buehler Ltda., Lake Buff, IL, EUA), com o objetivo de obter superfícies planas, paralelas e polidas (Turssi et al., 2014). Entre cada série de polimento e após o polimento final, os fragmentos foram lavados em solução de detergente enzimático diluído em água destilada-deionizada (ADD) (5 mL:1 L) por 3 minutos em ultrassom (Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil) e enxaguados em água destilada (Lussi et al., 2008b).

4.4 Seleção das amostras de dentina

Todos os fragmentos foram observados em uma Lupa Estereoscópica com lente de aumento de 40 vezes para verificar a existência de defeitos e trincas na dentina. As amostras foram então levadas ao perfilômetro óptico (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido) para determinação da curvatura de superfície, como descrito posteriormente. Foram também submetidas à teste de microdureza de superfície (Microdurômetro HMV-2000, Shimadzu, Kyoto, Japão) para padronização das durezas das amostras selecionadas para o estudo. Para tanto, foram realizadas 3 endentações por amostra, com distância de 50 μm entre elas, com endentador Knoop e carga estática de 10 g por 10 s (Turssi et al., 2010). Após estas medições, foram selecionados 84 fragmentos que não possuíam defeitos superficiais, apresentaram valores médios de dureza de superfície ($78,62 \pm 8,13 \text{ kg/mm}^2$) e os menores valores de curvatura de superfície (média = $0,27 \pm 0,18 \mu\text{m}$) (Turssi et al., 2014).

4.5 Proteção das amostras

Na superfície a ser tratada, foram posicionadas duas tiras de fita adesiva de cloreto de polivinil não plastificada (UPVC) (Graphic Tape; Chartpak, Leeds, EUA) com 1,0 mm de espessura cada, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 (comprimento) x 1,0 mm (largura), para delimitação da área de estudo (Turssi et al., 2014) (Figura 4.2). Por fim, todos os fragmentos foram armazenados em umidade relativa a 4 °C até o início da fase experimental.

Figura 4.2 - Amostra de 3 x 3 x 1 mm com janela de 3 x 1 mm exposta para tratamento

4.6 Desafio erosivo *in vitro*

Para induzir a formação de lesão de erosão em estágio inicial (dissolução superficial de 3 a 5 μm), antes dos tratamentos de superfície, as amostras dos grupos C1, C2, C3, TiF_4 1, TiF_4 2 e TiF_4 3 foram submetidas à imersão em solução de ácido cítrico a 0,05 M (pH 2,3) (Ácido cítrico mono-hidratado, Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Ganss et al., 2010a), a temperatura ambiente, sob constante agitação em mesa agitadora orbital (SK-D3309-Pro LCD Digital 3D Shaker, Scilogex, Berlin, NH, EUA), durante 20 minutos, a 35 rpm, de acordo com parâmetros estabelecidos durante estudo piloto. Em seguida, todas as amostras foram lavadas em ADD por 30 segundos e secas com papel absorvente. Após o desafio erosivo, as amostras foram armazenadas em umidade relativa na geladeira a 4 °C até a próxima etapa do estudo.

Ao final do processo de erosão *in vitro*, foi realizada uma nova leitura em perfilômetro óptico para que se pudesse confirmar a homogeneidade das lesões formadas (média = $3,92 \pm 0,35 \mu\text{m}$). Além disso, todas as amostras, inclusive as do grupo sem erosão *in vitro*, foram examinadas em microscópio eletrônico de varredura ambiental para observação do padrão de superfície da dentina antes dos tratamentos de superfície.

4.7 Seleção dos voluntários

Doze voluntários do gênero feminino entre 20 e 35 anos foram selecionados para participar da fase *in situ* da pesquisa. O consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes antes do início da pesquisa (Apêndice A). Foram considerados os seguintes *Critérios de Inclusão e Exclusão* dos participantes da pesquisa (adaptado de Turssi et al., 2014):

- não apresentar nenhum tipo de patologia sistêmica;
- apresentar todos os elementos dentais;
- possuir boa saúde bucal (sem a presença de placa bacteriana visível, cavidades, gengivite ou doença periodontal);
- não apresentar dispositivo ortodôntico;
- não apresentar doença do refluxo gastro-esofágico;
- não fazer uso de tabaco e bebidas alcoólicas;
- residir na área urbana do município de São Paulo;
- não estar grávidas ou amamentando;
- possuir fluxo salivar estimulado $> 0,7$ mL/min (Ericsson; Hardwick, 1978).

4.7.1 Avaliação do fluxo salivar estimulado e pH salivar

A coleta de saliva foi realizada no período matutino, pelo menos duas horas após a ingestão de alimentos e da escovação dental, que foi efetuada com dentífrício fluoretado e escova fornecidos pelos pesquisadores. Para realização da coleta de saliva total estimulada, o participante foi orientado a mascar um pedaço de Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA), medindo 5,0 x 5,0 cm, durante 30 segundos e, em seguida, a deglutir a saliva inicial. Nos 5 minutos subsequentes, o participante foi orientado a expectorar a saliva em um copo plástico, cuja massa (em g) havia sido previamente aferida em balança digital. A massa do recipiente contendo a saliva foi aferida para obter a massa (em gramas) e, consequentemente, o volume de saliva (considerando-se a densidade da saliva igual

a 1 g/cm^3). O fluxo salivar total estimulado foi obtido através da razão entre o volume e o tempo e expresso em mL/min (Ericsson; Hardwick, 1978) (média = $0,89 \text{ mL/min} \pm 0,43$).

Imediatamente após a coleta, o pH da saliva estimulada foi mensurado, utilizando-se um microeletrodo acoplado a um pHmetro digital (Hanna hi2221 calibration check pH/Orp meter, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, EUA) (pH médio obtido = $7,17 \pm 0,37$).

4.8 Preparo do dispositivo intra-oral

Para a realização do estudo *in situ*, os doze participantes tiveram suas arcadas inferiores moldadas com silicone de condensação de consistência pesada (Clonage[®], DFL, Jacarepaguá, RJ, Brasil). A partir dos moldes foram produzidos modelos de gesso (Herostone[®], Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sobre os quais foram confeccionados dispositivos intra-orais inferiores em resina acrílica com grampos para fixação. Nichos com altura e largura de aproximadamente 4,0 mm e profundidade de 2,0 mm foram confeccionados nos dispositivos nas faces vestibulares das regiões de pré-molares e molares bilaterais (Macdonald et al., 2010; Olley et al., 2012; Seong et al., 2013) (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Dispositivos intra-orais inferiores

Os dispositivos foram higienizados em ultrassom com 5,0 mL de detergente enzimático para 1,0 L de ADD, antes da fixação das amostras nos mesmos, com a finalidade de remoção de possíveis resíduos provenientes da fase de confecção.

4.9 Esterilização das amostras

Previamente à inserção das amostras nos dispositivos removíveis, todas foram esterilizadas com radiação gama (Wegehaupt et al., 2012). A fonte de irradiação consistiu de um irradiador de Cobalto-60, modelo Gamacell 220, localizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (São Paulo, SP, Brasil). A dose utilizada foi de 25 kGy, obtida após um ciclo de 21 horas de irradiação.

4.10 Posicionamento das amostras nos dispositivos

Durante ambas as fases do estudo, foi realizada a permutação das amostras nos nichos, para que não houvesse a influência da posição nos resultados do estudo.

Uma amostra de cada grupo foi fixada em cada dispositivo, na sua respectiva fase, com auxílio de cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda., São Paulo, Brasil), sendo que as amostras dos grupos controle foram fixadas na Fase Controle e as dos grupos que foram tratados com o TiF_4 foram posicionadas em uma segunda etapa, denominada Fase Experimental, para que não houvesse influência do flúor nas amostras de controle. As superfícies das amostras ficaram recuadas 0,5 mm em relação aos limites dos nichos para que não houvesse abrasão pelo contato com a mucosa da bochecha (Figura 4.4). Os dispositivos foram instalados nos voluntários após profilaxia e estes receberam orientações por escrito quanto ao uso do dispositivo.

Figura 4.4 - Recuo de 0,5 mm entre amostra e limite do nicho

4.10.1 Grupos experimentais

As aplicações do gel de TiF_4 foram realizadas no 1º, 3º e 5º dias de ciclagem. Antes da próxima aplicação, uma das amostras foi removida, a fim de se evitar a possível influência das demais aplicações (presença de flúor na cavidade bucal) sobre esta. Em ambas as fases, as amostras foram removidas em tempos equivalentes, sempre após a mesma quantidade de ciclos, para possibilitar a posterior comparação entre elas (Tabela 4.1). Cada ciclo da fase controle era composto por 2 dias de ciclagem erosiva/abrasiva. Na fase experimental, além dos 2 dias de ciclagem erosiva/abrasiva, era realizada uma aplicação de TiF_4 , após a formação de película adquirida e antes do primeiro desafio ácido do dia (Danelon et al., 2014).

Tabela 4.1 - Cronograma de aplicações do gel de TiF_4 e remoção das amostras

Quantidade de ciclos	Fase Controle	Fase Experimental
0	--	Aplicação TiF_4 em todas as amostras
1 (2 dias de ciclagens erosivas/abrasivas)	Remoção amostra C1	Remoção amostra TiF_4 1 + aplicação de TiF_4 nas demais amostras
2 (4 dias de ciclagens erosivas/abrasivas)	Remoção amostra C2	Remoção amostra TiF_4 2 + aplicação de TiF_4 na amostra remanescente
3 (6 dias de ciclagens erosivas/abrasivas)	Remoção amostras C3 e controle sem erosão <i>in vitro</i>	Remoção amostra TiF_4 3

4.11 Procedimentos intra-bucais

4.11.1 Higiene bucal dos voluntários

O tempo total da etapa *in situ* foi de 26 dias. Antes do início da etapa *in situ* e entre as fases *Controle* e *Experimental* do estudo, foram incluídos períodos de *run-in* de 2 dias (Turssi et al., 2010) e *wash-out* de 5 dias (Levy et al., 2014), respectivamente. Durante este período, e em todas as fases *in situ*, todos os voluntários fizeram a higiene dental, sem os dispositivos *in situ*, com o auxílio de um dentífrico fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-Cáries® com 1.500 ppm F⁻ (Monofluorofosfato de sódio), Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), escova de dentes macia n. 30 (Colgate Twister Fresh®, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil) e fio dental (Colgate, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), os quais foram doados na forma de um kit pela pesquisadora, e foram instruídos a realizar a escovação de

acordo com a técnica de Bass. O objetivo da doação desses materiais foi padronizar todos os voluntários, que se comprometeram a usar somente esses produtos durante o período do experimento e não utilizar bochechos e outros produtos de higiene bucal.

4.11.2 Desafio erosivo/abrasivo *in situ*

Durante toda a fase *in situ*, os dispositivos foram inseridos 2 horas antes do primeiro desafio erosivo para formação de película adquirida (Wiegand et al., 2008c; Levy et al., 2014) (a partir das 8h00). Com o objetivo de aumentar a padronização do experimento e evitar o contato dos dentes naturais com a solução ácida durante a desmineralização erosiva (Wiegand; Attin, 2011), os dispositivos contendo as amostras de dentina erodida e tratada foram imersos em ácido extra-oralmente (*ex vivo*). Para tanto, foram consideradas 6 imersões ao dia (2 minutos cada), com intervalos de 1,5 h entre elas, em 20 mL de ácido cítrico a 0,5% (pH 2,6) (Schlueter et al., 2014). Após a desmineralização, o excesso de ácido foi vertido sobre um papel absorvente e, então, o aparelho foi reinserido na boca.

A solução erosiva foi renovada no início de cada dia e teve seu pH monitorado (Schlueter et al., 2011b). Os dispositivos foram usados durante 11 horas diárias (das 8h00 as 19h00) e armazenados em gaze umedecida com ADD (fornecida pela pesquisadora responsável) em geladeira durante a noite e refeições. Os voluntários foram permitidos a beber água com os aparelhos *in situ*. Após as refeições, ingestão de bebidas e higiene oral, os voluntários aguardaram 15 minutos para reinserção do dispositivo na boca (Ganss et al., 2004; Schlueter et al., 2011b; Schlueter et al., 2014).

A abrasão por escovação foi realizada 60 minutos após o último desafio erosivo de cada dia. Seguindo o protocolo proposto por Schlueter et al. (2014), os voluntários usaram uma escova de dentes elétrica equipada com um alerta de pressão, que é ativado em 2,5 N (Oral B Professional Care 3000; Oral B, Schwalbacham Taunus, Alemanha). A quantidade de dentifrício fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-Cáries® com 1.500 ppm F⁻ (Monofluorofosfato de sódio), Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil) colocada sobre a cabeça da escova de

dentes para o procedimento de abrasão foi do tamanho de uma ervilha. Os voluntários foram instruídos a começar a escovar as superfícies oclusais dos seus próprios dentes inferiores por 15 segundos para produzir uma suspensão de dentífrico/saliva. Depois, eles passaram das superfícies oclusais para as superfícies das amostras (fixadas nos dispositivos). A cabeça da escova de dentes deveria estar paralela à superfície das amostras e os voluntários deveriam empurrar as cerdas até que o alerta fosse ativado. Em seguida, deveriam mover a escova sobre a amostra, sem alterar a pressão e escová-los sem qualquer movimento manual adicional durante 10 segundos. O procedimento de escovação era realizado apenas sob o controle visual. Após o período de escovação, a escova de dentes era desativada. Em seguida, os voluntários foram orientados a expectorar o conteúdo e enxaguar a boca com água corrente durante 3 segundos, seguido pela remoção do dispositivo. O dispositivo foi, em seguida, enxaguado com água corrente durante 1 minuto para remover remanescentes de dentífrico, reinserido na boca e utilizado por mais 30 minutos. A ciclagem diária foi realizada por todos os voluntários como apresentada na figura 4.5:

Figura 4.5 - Organograma da ciclagem diária

Os participantes foram treinados extensivamente em relação a todos os procedimentos (em especial, aos processos de lavagem com soluções, à colocação e à limpeza dos dispositivos intra-orais e procedimento de secagem após desafio erosivo). Eles também receberam um protocolo escrito (Apêndice B), um cronograma (Apêndice C) e uma tabela de horários (Apêndice D) para ser preenchida caso houvesse qualquer intercorrência que impossibilitasse a realização dos desafios erosivos e/ou escovação nos horários sugeridos.

4.11.3 Aplicação do TiF_4

As amostras dos grupos TiF_4 1, TiF_4 2 e TiF_4 3 incluíram o tratamento com flúor. Estas amostras foram secas com papel absorvente e submetidas à aplicação de flúor TiF_4 (4% de flúor na forma de tetrafluoreto de titânio (Vieira et al., 2005), 24530 ppm F). O flúor foi aplicado na forma de gel e, para tanto, foi manipulado pela pesquisadora com a adição de 0,4 g de fluoreto de titânio (IV) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) em 10 mL de água destilada-deionizada e posterior dissolução de 1,0 g de carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) pela alternância de períodos em banho-maria, a aproximadamente 40 °C e em agitador eletromagnético. O pH original do gel de TiF_4 foi mantido (pH 1,5) (Wiegand et al., 2010a), sem a adição de qualquer solução tampão, e monitorado imediatamente antes de cada aplicação.

Nos tempos pré-determinados para a aplicação de flúor nas amostras, um volume de 20 µl de TiF_4 , em cada uma delas, foi padronizado com o auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL. As aplicações foram realizadas com o auxílio de pincéis descartáveis (*Brush Fine*, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), que foram trocados para cada nova amostra, executando-se movimentos intermitentes sobre a superfície durante 4 minutos. Após este tempo, cada amostra teve o excesso de gel fluoretado removido com algodão e sua superfície, seca com papel absorvente. Todas as aplicações foram realizadas por uma única pessoa, a pesquisadora responsável pela execução do experimento.

4.12 Análise perfilométrica

A análise perfilométrica foi realizada em um perfilômetro 3D (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido) (Figura 4.6), sendo que as superfícies de dentina hígida (preservadas pela fita de UPVC) foram utilizadas como referência.

Figura 4.6 - Amostra posicionada no perfilômetro óptico

Após a remoção da fita (Figura 4.7), o sensor do aparelho foi programado para escanear uma área central da amostra de 2 mm de comprimento (no eixo X) por 1 mm de largura (eixo Y) no centro da amostra, que corresponde à área tratada e às superfícies de referências de ambos os lados. O aparelho foi ajustado de forma a percorrer 200 passos, com um tamanho de 0,01 mm, no eixo X, e 20 passos de 0,05 mm, no eixo Y. A profundidade da lesão (*3-pt step height*) foi calculada por um software específico (ProscanApplication software version 2,0,17), com base na subtração da média da altura da área teste, em relação à média da altura das superfícies de referência.

Figura 4.7 - Amostra com lesão erosiva formada, após remoção da fita de UPVC

Todas as amostras foram analisadas em perfilômetro óptico três vezes durante o experimento. Primeiramente, todas passaram pela análise de curvatura, a fim de eliminar discrepâncias entre as amostras e selecionar apenas aquelas que apresentassem superfície com curvatura semelhante (*baseline*). Após a realização do processo de erosão *in vitro*, foi realizada uma nova leitura para que se pudesse confirmar a homogeneidade das lesões formadas. A terceira varredura ocorreu após a remoção de cada amostra dos dispositivos, em tempos pré-determinados de acordo com o grupo experimental a que pertencia. Os fragmentos de dentina foram mantidos em umidade relativa até o momento da leitura a fim de se evitar a sua desidratação. Imediatamente antes da análise, o excesso de água foi removido com o auxílio de um papel absorvente (Magalhães et al., 2010).

As análises das amostras dos grupos controle (hígido e erodido) tiveram como objetivo analisar o efeito do desafio ácido *in vitro* e erosão/abrasão *in situ* sobre os substratos sem tratamento. Já nos grupos TiF₄ 1, TiF₄ 2 e TiF₄ 3, a perfilometria permitiu a observação do efeito das aplicações do gel de TiF₄ sobre o aumento da profundidade da lesão na superfície da dentina erodida e abrasionada quando comparada à área de controle da amostra.

4.13 Análise em microscópio eletrônico de varredura ambiental

A fim de se observar as características de superfície da dentina antes e após cada aplicação de TiF₄, todas as amostras foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEV ambiental) (Hitachi Analytical Table Top Microscope TM3000, Hitachi, Tóquio, Japão) (Palazon et al., 2013). Foram feitas duas leituras, uma antes do tratamento e uma após cada tempo experimental, possibilitando a observação dos efeitos causados pela aplicação de TiF₄ sobre a superfície da dentina. Esta repetição de leituras foi possível, pois a MEV ambiental é um método de análise não destrutivo que permite a obtenção de imagens sem a necessidade de qualquer tratamento de superfície.

As amostras foram fixadas com adesivo à base de cianocrilato em *stubs* de alumínio e posicionadas com a sua superfície tratada paralela à superfície do *stub*. As eletromicrografias obtidas no MEV, com aumentos de 1000x e 3000x, permitiram

uma comparação qualitativa entre a oclusão de túbulos obtida após cada aplicação do tratamento proposto neste estudo.

4.14 Análise em microscópio de força atômica

Com a finalidade de acessar a topografia de superfície da dentina nos diferentes tempos, três amostras de cada grupo experimental foram selecionadas aleatoriamente para serem observadas em microscópio de força atômica (AFM) (Nanosurf Flex AFM, Nanosurf, Liestal, Suíça).

Uma amostra por vez foi posicionada sob a ponta mecânica de silício de alta frequência e ressonância para varredura em *tapping mode*. Foi utilizada uma velocidade de varredura de 20 $\mu\text{m/s}$ e com resolução de 256 x 256 pixels (Wang et al., 2014). Para cada amostra foi obtida uma imagem tridimensional de 20 μm x 20 μm , o que possibilitou a observação das superfícies tratadas.

4.15 Análise estatística

A diferença entre a perda de superfície causada pelos tratamentos e a erosão *in vitro* foi utilizada como a medida para cada espécime. Previamente à realização da análise estatística, a normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, que demonstrou que não havia aderência à curva normal. Para obter-se a normalidade, os resultados foram transformados pela realização da raiz quadrada e dois *outliers* foram identificados pelo Blox-Plot e excluídos. Os dados transformados foram avaliados por meio da Análise de Variância a dois critérios para medidas repetidas (ANOVA), de acordo com o modelo linear generalizado para avaliação dos efeitos das variáveis independentes (Tratamento e Voluntário) no desgaste de superfície (variável dependente). A comparação *post hoc* foi realizada pelo teste de Tukey. O nível de significância de 5% foi estabelecido e a análise estatística foi executada com a utilização do programa SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Perfilometria óptica

A ANOVA a dois critérios para medidas repetidas, realizada com os valores transformados, mostrou que o desgaste foi afetado significativamente pelos tratamentos avaliados ($p < 0,001$). O teste de Tukey demonstrou que as amostras do grupo TiF_4 2 (2 ciclos), que não diferiu de nenhum dos outros grupos tratados com TiF_4 , revelou significativa redução no desgaste quando comparado aos grupos controles erodidos sem tratamento (C1, C2 e C3) e ao controle sem erosão *in vitro* (Tabela 5.1). Os grupos TiF_4 1 e TiF_4 3 (1 e 3 ciclos, respectivamente) não apresentaram diferença significativa do grupo controle sem tratamento (C1), porém ambos os grupos de tratamento demonstraram desgaste significativamente menor que o observado nos demais grupos controles sem tratamento (C2 e C3). O maior desgaste foi observado nos grupos controle C3 e controle sem erosão *in vitro* (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Médias (desvios padrões) dos dados originais, em μm , do desgaste de superfície da dentina humana medido após a erosão *in vitro*, após o tratamento de superfície e erosão *in situ*, seguido da diferença entre os dois valores (desgaste pós-tratamento menos desgaste pós-erosão *in vitro*)

Tratamento	Tempo		Diferença
	Pós-erosão <i>in vitro</i>	Pós-tratamento	
TiF ₄ 1 (1 ciclo)	4,080 (0,856)	6,910 (0,950)	2,830 (1,284) AB
TiF ₄ 2 (2 ciclos)	4,662 (0,656)	6,480 (1,528)	1,818 (1,296) A
TiF ₄ 3 (3 ciclos)	3,692 (0,554)	8,117 (6,298)	4,425 (6,473) AB
C1 (1 ciclo)	3,642 (0,484)	10,396 (2,283)	6,754 (2,477) BC
C2 (2 ciclos)	3,638 (0,788)	11,998 (2,050)	8,359 (1,797) C
C3 (3 ciclos)	4,004 (0,664)	20,523 (7,691)	16,518 (7,726) D
Sem erosão <i>in vitro</i>	—	20,844 (9,121)	20,844 (9,121) D

Médias seguidas por distintas letras maiúsculas diferem entre si.

5.2 Microscopia eletrônica de varredura

A figura 5.1 representa o padrão de morfologia superficial apresentado pelas amostras dos grupos controle sem erosão *in vitro* e C3, antes e após a fase *in situ*. Previamente à ciclagem erosiva/abrasiva realizada durante a fase *in situ*, o grupo sem erosão *in vitro* (Figura 5.1a) apresentou uma superfície plana com túbulos dentinários abertos e distribuídos homogeneamente pela área observada. Em comparação com o grupo sem erosão *in vitro*, o grupo C3, com erosão *in vitro* (Figura 5.1b - antes da fase *in situ*), apresentou um padrão superficial mais rugoso, com túbulos dentinários mais abertos e evidentes, com aparente colabamento da matriz colágena, que confere à superfície um aspecto mais irregular. Após a fase *in situ* e sem terem sido submetidas a nenhum tratamento adicional além da ciclagem erosiva/abrasiva, as amostras de ambos os grupos apresentaram padrões de desgaste diferenciados. O grupo sem erosão *in vitro* (Figura 5.1c) demonstrou danos

à superfície causados pelos desafios erosivos/abrasivos; no entanto, manteve o padrão de abertura tubular apresentado antes da fase *in situ*. Já as amostras do grupo C3 (Figura 5.1d), que foram removidas da cavidade oral após a mesma quantidade de ciclos que as do grupo sem erosão *in vitro*, apresentaram uma modificação no padrão de túbulos expostos (em menor quantidade) e aspecto de colabamento da matriz colágena mais evidente.

Figura 5.1 - Eletromicrografias dos grupos sem erosão *in vitro* e C3 (quantidades de ciclos equivalentes) antes ((a) e (b), respectivamente) e após ((c) e (d), respectivamente) a fase *in situ*. Aumento de 1000x

Pela comparação entre os grupos controle (Figuras 5.2a, 5.2c e 5.2e) e os grupos experimentais (Figuras 5.2b, 5.2d e 5.2f), percebe-se que o TiF_4 , independente da quantidade de aplicações, conferiu à superfície das amostras tratadas uma característica mais lisa e homogênea com redução do diâmetro dos lúmens dos túbulos, que se apresentavam ligeiramente achatados (forma de losango) e com distribuição mais irregular pela área observada nas eletromicrografias. Somado a isso, não se pode identificar o colabamento das fibras

colágenas, presente na superfície irregular nas amostras dos grupos controles (Figuras 5.2a, 5.2c e 5.2e).

Figura 5.2 - Eletromicrografias dos grupos C1 (a), TiF_4 1 (b), C2 (c), TiF_4 2 (d), C3 (e) e TiF_4 3 (f) após a fase *in situ*. Aumento de 1000x

5.3 Microscopia de força atômica

As fotomicrografias obtidas em AFM demonstraram a irregularidade da superfície dos grupos controles, com (Figura 5.3a, 5.3c e 5.3e) ou sem erosão *in vitro* (Figura 5.3g), quando comparados aos grupos experimentais (Figuras 5.3b, 5.3d e 5.3f). As aplicações de TiF_4 modificaram a topografia de superfície das amostras, sendo que, ainda que os túbulos tenham permanecido abertos, apresentaram-se parcialmente obliterados e em quantidade reduzida. Além disso, o aspecto rugoso das amostras sem tratamento foi diminuído pela presença do TiF_4 .

Figura 5.3 - Fotomicrografias obtidas em AFM dos grupos C1 (a), TiF₄ 1 (b), C2 (c), TiF₄ 2 (d), C3 (e), TiF₄ 3 (f) e sem erosão *in vitro* (g) após a fase *in situ*

6 DISCUSSÃO

Várias pesquisas *in vitro* já comprovou a eficácia do TiF_4 na proteção do tecido dental mineralizado frente a desafios ácidos (Wei et al., 1976; Büyükyilmaz et al., 1997; Schlueter et al., 2007; Wiegand et al., 2008c; Magalhães et al., 2010; Comar et al., 2012; Levy et al., 2012; Lepri et al., 2013). No entanto, diversos processos fisiológicos, que não podem ser simulados em trabalhos conduzidos em laboratório, são capazes de modificar a formação das lesões de erosão (Imfeld, 1996; Zero, 1996; Gregg et al., 2004; Lussi; Jaeggi, 2008). Dentre eles, características e propriedades inerentes à saliva podem promover proteção ao tecido dental frente a desafios ácidos, como composição (Bardow et al., 2013), fluxo salivar (Rios et al., 2006), pH (Lussi et al., 2012) e presença de película adquirida (Zahradnik, 1979; Hara et al., 2006; Wetton et al., 2006; Moazzez et al., 2014). A proteção conferida pela película adquirida (Hara et al., 2006) aos tecidos dentais se dá pela sua capacidade de agir como uma barreira de difusão, inibindo o contato direto entre dentes e ácidos (Vukosavljevic et al., 2014) e, assim, modulando o desenvolvimento da erosão. Esta camada orgânica se forma pela adsorção de proteínas salivares aos tecidos dentais (Siqueira et al., 2012) e pode ter sua capacidade protetora influenciada pela superfície sobre a qual se forma (Glantz et al., 1996), espessura e tempo de maturação (Vukosavljevic et al., 2014). Estudos recentes têm demonstrado a importância da formação de uma película adquirida com quantidades adequadas de proteínas (Carpenter et al., 2014) sobre o seu possível efeito protetor (Moazzez et al., 2014).

Neste sentido, o presente estudo foi realizado seguindo um modelo *in situ*, devido ao seu potencial de se aproximar ao máximo das condições bio-físico-químicas que ocorrem na cavidade oral durante a progressão da erosão (Wiegand; Attin, 2011) e desta forma, aproximar os resultados desta pesquisa do que ocorreria durante a aplicação *in vivo* do TiF_4 sobre a estrutura dental. Para que isto fosse possível, foram selecionados voluntários que atendessem a critérios de inclusão e exclusão propostos na literatura (Turssi et al., 2014), dentre eles fluxo salivar estimulado e pH salivar considerados normais (Ericsson; Hardwick, 1978).

Os voluntários utilizaram dispositivos removíveis inferiores por serem posicionados em uma área comum de aparecimento de lesões de erosão (Imfeld,

1996) e por permitirem a simulação da abrasão por escovação intra-oral, como ocorre clinicamente. Optou-se por uma ciclagem erosiva/abrasiva para que a dinâmica de ingestão de bebidas ácidas e higiene bucal fosse estabelecida como na vida cotidiana (Eisenburger et al., 2003; Wiegand et al., 2010a; Levy et al., 2012; Levy et al., 2014). O desafio erosivo consistiu na imersão das amostras em ácido cítrico, o qual foi escolhido pela sua frequente presença na composição de bebidas e alimentos (West et al., 2001; Wang; Lussi, 2012) e a preferência pela manipulação em laboratório de uma solução ácida, ao invés de produtos comercializados, se deu pelo melhor controle da composição, o que permite uma maior padronização das variáveis que podem interferir nos resultados do estudo (Jaeggi; Lussi, 1999).

Após a manutenção do dispositivo por 2 horas na cavidade oral, com o objetivo de conferir às amostras a proteção da película adquirida (Nekrashevych; Stösser, 2003; Wiegand et al., 2008c), as imersões em ácido cítrico foram realizadas *ex vivo* para evitar o contato do ácido com a dentição natural dos voluntários. Cada período de desafio erosivo consistiu em 2 minutos de imersão, conforme ocorre na queda de pH da saliva após desafios ácidos (Meurman et al., 1987). Os desafios erosivos e abrasivos não foram realizados alternadamente (Comar et al., 2012; Levy et al., 2012; Levy et al., 2014), para representar os hábitos da maioria da população (Ganss et al., 2009b; Wiegand; Attin, 2011), e a duração dos desafios abrasivos foi determinada no sentido de simular o tempo necessário para alcançar uma redução de biofilme ideal *in vivo*, que é obtida após 30 segundos de escovação por quadrante (van der Weijden et al., 1993), totalizando aproximadamente 5 segundos por superfície do dente. Como a maioria da população escova os dentes 2 vezes por dia (Ganss et al., 2009b), cada amostra recebeu 10 segundos de abrasão diários.

Com base nos resultados favoráveis recentemente encontrados na literatura (Hove et al., 2008; Magalhães et al., 2009; Wiegand et al., 2010a), o TiF_4 foi selecionado para ter sua ação avaliada sob a influência dos fatores inerentes aos voluntários neste estudo. Pela capacidade do íon titânio de formar complexos simultaneamente com fluoretos e tecidos dentais (Skartveit et al., 1991; Wahengbam et al., 2011), o TiF_4 é capaz de formar uma camada ácido resistente sobre a superfície dental (Wei et al., 1976; Büyükyilmaz et al., 1997; Sen; Büyükyilmaz, 1998), que assemelha-se a um *glaze* e ultraestruturalmente é composta por numerosas partículas esféricas (Sen; Büyükyilmaz, 1998; Wiegand et al., 2009). Esta camada é formada por moléculas de TiO_2 - derivadas da união entre o titânio e

o oxigênio oriundo da água ou das moléculas de fosfato da superfície dental (Tveit et al., 1988) - e/ou complexos organometálicos (Mundorff et al., 1972) e age como uma barreira de difusão e reservatório de íons flúor, podendo retardar a dissolução do tecido dental frente a desafios ácidos (Wiegand et al., 2010c). Quando o TiF_4 é hidrolisado, gera uma solução ácida capaz de desmineralizar superficialmente o tecido dental; entretanto, esta desmineralização parcial (Tveit et al., 1988; Skartveit et al., 1991) pode ser favorável por possibilitar a incorporação do fluoreto no tecido mineralizado (Hals et al., 1981; Skartveit et al., 1989a).

Como ainda não existe um consenso quanto à concentração, pH e forma de apresentação ideais de aplicação do TiF_4 (Vieira et al., 2005; Hove et al., 2008; Wiegand et al., 2009; Levy et al., 2014), a formulação do produto manipulado no presente estudo foi determinada pela viabilidade e possibilidade de sua utilização clínica no futuro. Decidiu-se pela aplicação de um gel de TiF_4 (Vieira et al., 2005; Lepri et al., 2013), por ser uma forma de apresentação fácil de ser utilizada pelo cirurgião-dentista e confortável para o paciente, já que pode ser rapidamente aplicado e não possui sabor desagradável. A concentração de 4% e o pH original (pH 1,5) foram utilizados pela eficiência demonstrada em outros estudos (Wiegand et al., 2008b; Wiegand et al., 2009). Além das aplicações tópicas de flúor, a escovação com dentifrício fluoretado foi mantida para simular as condições clínicas habituais (Wiegand et al., 2010a), já que a maioria dos dentifrícios disponíveis no mercado atualmente tem adição de flúor em sua composição (Zero, 1996; Wiegand; Attin, 2011).

A opção pelo TiF_4 levou a uma adaptação do modelo *cross-over*, devido à prolongada manutenção do fluoreto na amostra, reportada por alguns autores como sendo por períodos de mais de 20 semanas (Tveit et al., 1988; Skartveit et al., 1989b). Especula-se que esta retenção possa levar a uma disponibilidade frequente de fluoreto no meio bucal, que poderia alterar a dinâmica de trocas iônicas na cavidade oral (Larsen, 1990). Por não haver referências na literatura que determinem o período de *wash-out* (intervalo de tempo entre os dois tratamentos propostos no estudo) necessário para que as aplicações de TiF_4 não interfiram nos resultados do grupo controle - caso este fosse realizado após a fase experimental na etapa *in situ* - todos os voluntários foram submetidos primeiro à fase controle e só então, à fase experimental.

Diferente do que acontece em estudos que utilizam esmalte como substrato (Paepegaey et al., 2013), para dentina nem todos os métodos de análise de desgaste de superfície são apropriados (Ganss et al., 2009c). Portanto, o critério a ser investigado deve ser levado em consideração (Ganss et al., 2009c; Schlueter et al., 2011a). Para avaliação dos efeitos causados pelos tratamentos de superfície, o perfilômetro óptico foi utilizado, por permitir a medição do desgaste de superfície sem a danificação da matriz orgânica desmineralizada, caso esta estivesse presente (Comar et al., 2012).

Foi verificado que com o aumento do número de ciclos erosivos realizados por amostra foi maior o desgaste encontrado (Hara et al., 2005; Hara et al., 2006; Hove et al., 2006). Dentro dos grupos controle, as amostras que foram submetidas a 01 ciclo de desafio erosivo (grupo C1) tiveram um aumento de 23,9% na perda de tecido mineral quando comparadas às amostras que foram submetidas a 02 ciclos (C2). Diante de mais um ciclo de desafios erosivos (03 ciclos – C3), o desgaste na superfície dentinária foi 97,6% maior se comparado aos dois ciclos realizados anteriormente. A evolução da amplitude do desgaste verificado entre os grupos pode ser justificada pela perda progressiva que ocorre em lesões de erosão (Schlueter et al., 2012) pela impossibilidade de remineralização deste substrato, já que o tecido mineralizado original é dissolvido pelos constantes desafios ácidos e se perde permanentemente (Lussi et al., 2011).

Entre os grupos experimentais, as amostras que foram submetidas a 01 ciclo de desafio erosivo (grupo TiF_4 1) apresentaram desgaste 35,7% menor que as amostras que foram submetidas à 02 ciclos (grupo TiF_4 2), ainda que não tenham resultado em diferenças significativas em relação ao desgaste. No entanto, entre as amostras do grupo TiF_4 2 e das amostras que foram submetidas ao desafio erosivo por 03 ciclos (TiF_4 3), notou-se um desgaste 143,4% maior. Observa-se, então, que mesmo com a aplicação do gel de TiF_4 , a interrupção da progressão da lesão de erosão não foi possível (Hove et al., 2006; Lepri et al., 2013).

Quando da comparação entre os grupos sem erosão *in vitro* e o grupo controle em que as amostras foram submetidas ao desafio erosivo por 03 ciclos (C3), sem qualquer tratamento adicional, comprova-se que a proteção da matriz orgânica é mesmo limitada (Hara et al., 2005) e sua permanência não deve ser prolongada (Hara et al., 2005), já que apesar do desgaste de superfície verificado

nas amostras do grupo C3 ter sido numericamente inferior, os resultados não apresentaram diferença estatística entre si.

No presente estudo, verificou-se que a presença da saliva também não apresentou efeito protetor adicional sobre o tecido dental frente aos desafios erosivos/abrasivos. Sabe-se que pacientes que apresentam lesões de erosão podem apresentar fatores salivares que levam a uma predisposição do desenvolvimento destas lesões, como menor quantidade mineral (Bardow et al., 2013), pH crítico mais elevado (Bardow et al., 2013), grau de saturação mais baixo (Bardow et al., 2013) e película adquirida com menor total de proteínas (Carpenter et al., 2014). Entretanto, todos os voluntários selecionados, além de serem submetidos a testes de fluxo e pH salivares, tiveram suas cavidades orais avaliadas e nenhuma lesão de erosão foi identificada e, ainda assim, a saliva dos mesmos não foi capaz de prevenir a progressão das lesões criadas nas amostras. Hara et al. (2006) demonstrou, em amostras de esmalte dental bovino, que a película adquirida é capaz de promover uma proteção frente a desafios ácidos de até 10 minutos; no entanto, em dentina este efeito não foi obtido, talvez pela maior solubilidade desse substrato diante de desafios ácidos ou pelo próprio modelo de desafio erosivo considerado nos dois estudos, que diferem entre si.

Ainda na comparação entre os grupos, os experimentais (TiF₄) apresentaram redução significativa do desgaste da superfície dentinária em relação aos controles com quantidades equivalentes de ciclos de desafios erosivos, desde a primeira aplicação do produto. Após 01 ciclo de desafios erosivos, o TiF₄ foi capaz de reduzir em 58,1% o desgaste de superfície, comparado ao grupo controle submetido ao mesmo número de ciclos. Após 02 ciclos de desafios erosivos, a redução foi de 78,2% e ao final de 3 ciclos, 73,2%. Estes resultados são indicativos da existência de um potencial de proteção por parte do *glaze* formado sobre a superfície dental desde o primeiro momento após a aplicação do TiF₄ (Schlueter et al., 2007; Wiegand et al., 2008c; Wiegand et al., 2010a; Lepri et al., 2013).

Nas micrografias obtidas em MEV e AFM é possível observar o efeito do TiF₄ sobre a superfície das amostras tratadas com o gel. As lesões passaram a apresentar um aspecto mais liso, o que sugere a presença do *glaze*, mesmo após a realização dos desafios ácidos. Os túbulos apresentaram os diâmetros de suas luzes reduzidas, com achatamento dos mesmos. O *glaze* criou uma barreira de difusão e um reservatório de íons flúor (Wiegand et al., 2010c), podendo ter sido

responsável pela redução do desgaste dos grupos experimentais, quando comparados aos grupos controle.

Vale ressaltar que o primeiro desafio ácido pós-aplicação do TiF_4 foi realizado antes da reinserção do dispositivo na boca dos voluntários com o intuito de demonstrar a proteção mecânica conferida por esta camada ácido-resistente à dentina. A opção pela realização da aplicação do fluoreto seguida pela imersão em ácido se deu pela comprovada formação de um forte *glaze* quando o ácido cítrico é utilizado como tratamento adicional, produzindo uma camada altamente hidrofóbica com aspecto vítreo (Mundorff et al., 1972). Somado a ação de proteção física proporcionada pela formação do *glaze*, logo após a aplicação de géis de flúor ácidos, há a formação de depósitos de CaF_2 maiores que os depositados por géis neutros (Danelon et al., 2014), o que pode conferir uma proteção adicional ao TiF_4 .

Apesar disto, ainda há a necessidade da orientação do paciente quanto à alteração de hábitos alimentares nocivos (Lussi et al., 1993; Zero, 1996) e outras atitudes capazes de acelerar a progressão das lesões de erosão, como a pressão elevada durante a escovação (Ganss et al., 2009a) e higiene logo após a alimentação (Zero, 1996; Jaeggi; Lussi, 1999; Lussi et al., 2008; Wiegand et al., 2008c), pois independente da proteção proporcionada pelo fluoreto aplicado, a progressão da lesão pôde ser retardada, mas não inibida. Partindo deste pressuposto, pode ser que a ação do TiF_4 apresentasse resultados ainda mais promissores, caso os desafios erosivos cessassem, já que apesar da presença do ácido não impedir a formação do *glaze*, este não foi capaz de deter a progressão das lesões de erosão. Sendo assim, o ideal seria a associação entre o tratamento profissional e redução de fatores de risco (Lussi et al., 1993; Zero, 1996; Jaeggi; Lussi, 1999; Lussi et al., 2008; Wiegand et al., 2008a; Ganss et al., 2009a), para que houvesse o favorecimento da reprecipitação mineral sobre a superfície e a possibilidade da interrupção da perda de substrato dental (Lussi et al., 2011). No entanto, na ausência da modificação dos hábitos por parte do paciente, pode haver a necessidade da realização de novas aplicações do TiF_4 para que sua ação seja prolongada e talvez possa impedir a continuidade do processo erosivo. Desta forma, estudos devem ser efetuados para determinação da duração da proteção gerada pelo número de aplicações de TiF_4 frente a desafios erosivos/abrasivos recorrentes.

Apesar das dúvidas remanescentes, o TiF_4 , na forma como foi utilizado neste estudo, foi capaz de demonstrar seu potencial protetor e sua capacidade de auxiliar na prevenção da progressão da erosão.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites desse estudo *in situ*, o gel de TiF_4 demonstrou potencial em reduzir a progressão das lesões de erosão, independente do número de aplicações avaliado.

REFERÊNCIAS

Armstrong WG. Origin and nature of the acquired pellicle. Proc R Soc Med. 1968 Sep;61(9):923-30.

Azzopardi A, Bartlett DW, Watson TF, Sherriff M. The surface effects of erosion and abrasion on dentine with and without a protective layer. Br Dent J. 2004 Mar;196(6):351-4.

Babcock FD, King JC, Jordan TH. The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. J Dent Res. 1978 Sep-Oct; 57(9-10):933-8.

Bardow A, Lykkeaa J, Qvist V, Ekstrand K, Twetman S, Fiehn NE. Saliva composition in three selected groups with normal stimulated salivary flow rates, but yet major differences in caries experience and dental erosion. Acta Odontol Scand. 2013; doi:10.3109/00016357.2013.860621. Epub Dec 6.

Bartlett D, Sundaram G, Moazzez R. Trial of protective effect of fissure sealants, *in vivo*, on the palatal surfaces of anterior teeth, in patients suffering from erosion. J Dent. 2011 Jan;39:26-9.

Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Ellis TH, Stangel I. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric acid. Dent Mater. 2002;18:26-35.

Büyükyilmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. Eur J Oral Sci. 1997;105:473-7.

Buzalaf MAR, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. J Appl Oral Sci. 2012a;20(5):493-502.

Buzalaf MAR, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. Adv Dent Res. 2012b;24(2):72-6.

Carpenter G, Cotroneo E, Moazzez R, Rojas-Serrano M, Donaldson N, Austin R, Zaidel L, Bartlett D, Proctor G. Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. Caries Res. 2014;48:361-7.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res. 2006;85(1):22-32.

Comar LP, Gomes MF, Ito N, Salomão PA, Grizzo LT, Magalhães AC. Effect of NaF, SnF₂, and TiF₄ toothpastes on bovine enamel and dentin erosion-abrasion *in vitro*. Int J Dent. 2012; doi: 10.1155/2012/134350. Epub 2012 Nov 8.

Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sassaki KT, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. Clin Oral Invest. 2014;18:1119-27.

Eisenburger M, Shellis RP, Addy M. Comparative study of wear of enamel induced by alternating and simultaneous combinations of abrasion and erosion *in vitro*. Caries Res. 2003;37:450-5.

Ericsson Y, Hardwick L. Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention. Caries Res. 1978;12(Suppl 1):94-102.

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

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. Eur J Oral Sci. 2007;115:390-6.

Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. Eur J Oral Sci. 2009a;117:255-60.

Ganss C, Schlueter N, Preiss S, Klimek J. Tooth brushing habits in uninstructed adults - frequency, technique, duration and force. Clin Oral Invest. 2009b;13:203-8.

Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Hardt M, Klimek J, Schlueter N. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. Caries Res. 2009c;43:422-9.

Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. Caries Res. 2010a;44:248-52.

Ganss C, Hardt M, Lussi A, Cocks A-K, Klimek J, Schlueter N. Mechanism of action of tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in dentine - an *in vitro* tin-uptake, tissue loss, and scanning electron microscopy study. Eur J Oral Sci. 2010b;118:376-84.

Ganss C, Lussi A, Schlueter N. Dental erosion as oral disease. Insights in etiological factors and pathomechanisms, and current strategies for prevention and therapy. *Am J Dent*. 2012;25:351-64.

Glantz PO, Baier RE, Christersson CE. Biochemical and physiological considerations for modeling biofilms in the oral cavity: A review. *Dent Mater*. 1996 May;12:208-14.

Gordon TR, Cargnello M, Paik T, Mangolini F, Weber RT, Fornasiero P, Murray CB. Nonaqueous synthesis of TiO_2 nanocrystals using TiF_4 to engineer morphology, oxygen vacancy concentration, and photocatalytic activity. *J Am Chem Soc*. 2012;134:6751-61.

Gregg T, Mace S, West NX, Addy M. A study *in vitro* of the abrasive effect of the tongue on enamel and dentine softened by acid erosion. *Caries Res*. 2004;38:557-60.

Gu Z, Li J, Söremark R. Influence of tooth surface conditions on enamel fluoride uptake after topical application of TiF_4 *in vitro*. *Acta Odontol Scand*. 1996;54(5):279-81.

Hals E, Tveit AB, Tötdal B, Isrenn R. Effect of NaF, TiF_4 and APF solutions on root surfaces *in vitro*, with special reference to uptake of F. *Caries Res*. 1981;15:468-76.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007;65:1-13.

Hara AT, Ando M, Cury JA, Serra MC, González-Cabezas C, Zero DT. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by citric acid. *Caries Res*. 2005;39:134-8.

Hara AT, Ando M, González-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges *in situ*. *J Dent Res*. 2006;85(7):612-6.

Hove L, Holme B, Ogaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF_4 , SnF_2 and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid *in vitro* measured by white light interferometry. *Caries Res*. 2006;40:440-3.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF_4 , SnF_2 and NaF against erosion-like lesions *in situ*. *Caries Res*. 2008; 42:68-72.

Imfeld T. Dental erosion - Definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996;104:151-5.

Jaeggi T, Lussi A. Toothbrush abrasion of erosively altered enamel after intraoral exposure to saliva: An in situ study. Caries Res. 1999;33:455-61.

Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MAR. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. J Appl Oral Sci. 2009;17(6):560-4.

Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrilho M, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human dentine. Caries Res. 2011;45:429-34.

Kinney JH, Balooch M, Haupt Jr. DL, Marshall SJ, Marshall Jr. GW. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. J Dent Res. 1995;74(5):1179-84.

Krutchkoff DJ. Surface characterization of the stannous fluoride-enamel interaction. Arch Oral Biol. 1972 Jun;17(6):923-30.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. Caries Res. 2006;40:148-53.

Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. J Dent Res. 1990;69(Spec Iss):575-80.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle - a review. Adv Dent Res. 2000 Dec;14:22-8.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SAM. Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO₂ laser. Laser Med Sci. 2013;28:235-40.

Levy FM, Magalhães AC, Gomes MF, Comar LP, Rios D, Buzalaf MAR. The erosion and abrasion-inhibiting effect of TiF₄ and NaF varnishes and solutions on enamel *in vitro*. Int J Pediatr Dent. 2012 Jan;22:11-6.

Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Efficacy of TiF₄ and NaF varnish and solution: a randomized *in situ* study on enamel erosive-abrasive wear. Clin Oral Invest. 2014 May;18(4):1097-102.

Lussi A, Jäggi T, Schärer S. The influence of different factors on *in vitro* enamel erosion. Caries Res. 1993;27(5):387-93.

Lussi A, Kohler V, Zero D, Schaffner M, Megert B. A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanente teeth using na *in vitro* model. Eur J Oral Sci. 2000;108:110-4.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion - diagnosis and risk factors. Clin Oral Invest. 2008a;12(1):S5-S13.

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

Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C. Dental erosion - an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. Caries Res. 2011;45(suppl 1):2-12.

Lussi A, von Salis-Marincek M, Ganss C, Hellwig E, Cheaib Z, Jaeggi T. Clinical study monitoring the pH on tooth surfaces in patients with and without erosion. Caries Res. 2012;46:507-12.

Macdonald E, North A, Maggio B, Sufi F, Mason S, Moore C, Addy M, West NX. Clinical study investigating abrasive effects of three toothpastes and water in an *in situ* model. J Dent. 2010;38(6):509-16.

Magalhães AC, Rios D, Delbem ACB, Buzalaf MAR, Machado MAAM. Influence of fluoride dentifrice on brushing abrasion of eroded human enamel: An *in situ/ex vivo* study. Caries Res. 2007;41:77-9.

Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of 4% titanium tetrafluoride solution on the erosion of permanent and deciduous human enamel: an *in situ/ex vivo* study. J Appl Oral Sci. 2009;17(1):56-60.

Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF₄ and NaF varnishes and solutions on dentin erosion *in vitro*. J Dent. 2010;38(2):153-7.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MAR, Lussi A. Fluoride in dental erosion. *Monogr Oral Sci.* 2011a;22:158-70.

Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, Aranha ACC, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF₄ and NaF varnishes and solutions combined with Nd:YAG laser irradiation on enamel erosion *in vitro*. *Photomed Laser Surg.* 2011b; 29(8):537-44.

Mathews MS, Amaechi BT, Ramalingam K, Ccahuana-Vasquez RA, Chedjieu IP, Mackey AC, Karlinsey RL. *In situ* remineralisation of eroded enamel lesions by NaF rinses. *Arch Oral Biol.* 2012;57:525-30.

Meurman JH, Rytömaa I, Kari K, Laakso T, Murtomaa H. Salivary pH and glucose after consuming various beverages, including sugar-containing drinks. *Caries Res.* 1987;21:353-9.

Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent.* 1991;99:457-62.

Moazzez RV, Austin RS, Rojas-Serrano M, Carpenter G, Cotroneo E, Proctor G, Zaidel L, Bartlett DW. Comparison of the possible protective effect of the salivary pellicle of individuals with and without erosion. *Caries Res.* 2014;48:57-62.

Mobarak EH, El-Badrawy W, Pashley DH, Jamjoom H. Effect of pretest storage conditions of extracted teeth on their dentin bond strengths. *J Prosthet Dent.* 2010 Aug;104:92-7.

Mundorff SA, Little MF, Bibby BG. Enamel dissolution: II. Action of titanium tetrafluoride. *J Dent Res.* 1972 Nov;51(6):1567-71.

Nekrashevych Y, Stösser L. Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion - An *in vitro* study. *Caries Res.* 2003;37:225-31.

Norbdo H, Leirskar J, Ngo H, Mount GJ, Wahigren J. The influence of a matrix metalloproteinase on the remineralization of artificially demineralized dentin. *Oral Health Prev Dent.* 2003;1:267-72.

Olley RC, Pilecki P, Hughes N, Jeffery P, Austin RS, Moazzez R, Bartlett D. An *in situ* study investigating dentine tubule occlusion of dentifrices following acid challenge. *J Dent.* 2012;40:585-93.

Paepegaey AM, Barker ML, Bartlett DW, Mistry M, West NX, Hellin N, Brown LJ, Bellamy PG. Measuring enamel erosion: A comparative study of contact profilometry, non-contact profilometry and confocal laser scanning microscopy. *Dent Mater.* 2013 Dec;29(12):1265-72.

Palazon MT, Scaramucci T, Aranha ACC, Prates RA, Lachowski KM, Hanashiro FS, Youssef MN. Immediate and short-term effects of in-office desensitizing treatments for dentinal tubule occlusion. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(6):274-82.

Ribeiro CC, Gibson I, Barbosa MA. The uptake of titanium ions by hydroxyapatite particles - structural changes and possible mechanisms. *Biomaterials.* 2006;27(9):1749-61.

Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem ACB, Machado MAAM, Silva SMB, Buzalaf MAR. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: An *in situ/ex vivo* study. *Caries Res.* 2006;40:218-23.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjäderhane L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod.* 2009;35:686-9.

Schlueter N, Ganss C, Muelles U, Klimek J. Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine *in vitro*. *Caries Res.* 2007;41:141-5.

Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C. Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an *in vitro* tin-uptake, tissue loss, and scanning electron micrograph study. *Eur J Oral Sci.* 2009;117:427-34.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res.* 2011a;45(suppl 1):13-23.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine *in situ*. *Clin Oral Invest.* 2011b;15:361-67.

Schlueter N, Jaeggi T, Lussi A. Is dental erosion really a problem?. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):68-71.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn^{2+} -containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy - a controlled randomized *in situ* trial. Clin Oral Invest. 2014;18:107-15.

Sen BH, Büyükyilmaz T. The effect of 4% titanium tetrafluoride solution on root canal walls - A preliminary investigation. J Endod. 1998;24 Apr(4):239-43.

Sen BH, Kazemi RB, Spangberg LSW. Morphologic effects on L929 fibroblasts of titanium tetrafluoride application. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;86(3):341-6.

Seong J, Macdonald E, Newcombe RG, Davies M, Jones SB, Johnson S, West NX. *In situ* randomised trial to investigate the occluding properties of two desensitising toothpastes on dentine after subsequent acid challenge. Clin Oral Invest. 2013;17:195-203.

Shrestha BM. Effect of systemic titanium fluoride (TiF_4) on fluoride uptake by developing rat enamel. Caries Res. 1983;17:264-6.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. J Dent Res. 2012;91(12):1110-8.

Skartveit L, Tveit B, Totdal B, Selvig KA. Effects of TiF_4 solutions on root surfaces *in vitro* after different application periods. Acta Odont Scand. 1989a; 47:25-30.

Skartveit L, Tveit AB, Klinge B, Totdal B, Selvig KA. *In vivo* uptake and retention of fluoride after a brief application of TiF_4 to dentin. Acta Odont Scand. 1989b; 47:65-8.

Skartveit L, Selvig KA, Tveit AB. Root surface reactions to TiF_4 and SnF_2 solutions *in vitro*. An ultrastructural study. Acta Odontol Scand. 1991;49:183-90.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. Arch Oral Biol. 2007;52:121-7.

Sundaram G, Wilson R, Watson TF, Bartlett D. Clinical measurement of palatal tooth wear following coating by a resin sealing system. Oper Dent. 2007;32(6):539-43.

Tjäderhane L, Larjava H, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998;77(8):1622-9.

Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. *Braz Dent J*. 2010;21(4):332-6.

Turssi CP, Vianna LMFF, Hara AT, Amaral FLB, França FMG, Basting RT. Counteractive effect of antacid suspensions on intrinsic dental erosion. *Eur J Oral Sci*. 2012;120:349-52.

Turssi CP, Hara AT, Amaral LB, França FMG, Basting RT. Calcium lactate pre-rinse increased fluoride protection against enamel erosion in a randomized controlled *in situ* trial. *J Dent*. 2014 May;42(5):534-9.

Tveit AB, Klinge B, Tötdal B, Selvig KA. Long-term retention of TiF_4 and SnF_2 after topical application to dentin in dogs. *Scand J Dent Res*. 1988;96:536-40.

Van der Weijden GA, Timmerman MF, Nijboer A, Lie MA, Van der Valken U. A comparative study of electric toothbrushes for the effectiveness of plaque removal in relation to toothbrushing duration. *J Clin Periodontol*. 1993;20:476-81.

van Strijp AJP, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen *in situ*. *Caries Res*. 2003;37:58-65.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion *in vitro*. *Caries Res*. 2005;39:371-9.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol*. 2014;59:631-8.

Wahengbam P, Tikku AP, Lee WB. Role of titanium tetrafluoride (TiF_4) in conservative dentistry: A systematic review. *J Conserv Dent*. 2011 Apr-Jun;14:98-102.

Wang X, Lussi A. Functional foods/ingredients on dental erosion. *Eur J Nutr*. 2012;51(Suppl 2):S39-S48.

Wang CP, Huang SB, Liu Y, Li JY, Yu HY. The CPP-ACP relieved enamel erosion from carbonated soft beverage: An *in vitro* AFM and XRD study. Arch Oral Biol. 2014;59:277-82.

Wegehaupt FJ, Tauböck TT, Stillhard A, Schmidlin PR, Attin T. Influence of extra- and intra-oral application of CPP-ACP and fluoride on re-hardening of eroded enamel. Acta Odontol Scand. 2012;70:177-83.

Wei SHY, Soboroff DM, Wefel JS. Effects of titanium tetrafluoride on human enamel. J Dent Res. 1976 May-Jun;55(3):426-31.

West NX. Dentine hypersensitivity: preventive and therapeutic approaches to treatment. Periodontol. 2000. 2008;48(1):31-41.

West NX, Hughes JA, Addy M. The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids *in vitro*. J Oral Rehabil. 2001 Sep;28(9):860-4.

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M. Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: A study *in vitro*. Caries Res. 2006;40:213-7.

Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions - a review. Oral Health Prev Dent. 2003;1:245-53.

Wiegand A, Egert S, Attin T. Toothbrushing before and after an acidic challenge to minimize tooth wear? An *in situ/ex vivo* study. Am J Dent. 2008a Feb;21(1):13-6.

Wiegand A, Laabs KA, Grebmann G, Roos M, Magalhães AC, Attin T. Protection of short-time enamel erosion by different tetrafluoride compounds. Arch Oral Biol. 2008b;53:497-502.

Wiegand A, Meier W, Sutter E, Magalhães AC, Becker K, Roos M, Attin T. Protective effect of different tetrafluorides on erosion of pellicle-free and pellicle-covered enamel and dentine. Caries Res. 2008c;42:247-54.

Wiegand A, Magalhães AC, Sener B, Waldheim E, Attin T. TiF_4 and NaF at pH 1.2 but not at pH 3.5 are able to reduce dentin erosion. Arch Oral Biol. 2009;54:790-5.
Wiegand A, Hiestand B, Sener B, Magalhães AC, Roos M, Attin T. Effect of TiF_4 , ZrF_4 , HfF_4 and AmF on erosion and erosion/abrasion of enamel and dentin *in situ*. Arch Oral Biol. 2010a;55:223-8.

Wiegand A, Magalhães AC, Navarro RS, Schmidlin PR, Rios D, Buzalaf MAR, Attin T. Effect of titanium tetrafluoride and amine fluoride treatment combined with carbon dioxide laser irradiation on enamel and dentin erosion. *Photomed Laser Surg*. 2010b;28(2):219-26.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF₄) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. *Oral Health Prev Dent*. 2010c;8:159-64.

Wiegand A, Attin T. Design of erosion/abrasion studies - Insights and rational concepts. *Caries Res*. 2011;45(Suppl 1):53-9.

Yoshida E, Hayakawa T. Adsorption study of pellicle proteins to gold, silica and titanium by quartz crystal microbalance method. *Dent Mater J*. 2013 Nov;32(6):883-7.

Zahradnik RT. Modification by salivary pellicles of *in vitro* enamel remineralization. *J Dent Res*. 1979 Nov;58(11):2066-73.

Zero DT. Etiology of dental erosion - extrinsic factors. *Eur J Oral Sci*. 1996;104:162-77.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: **“Efeito do gel de TiF_4 no controle da progressão da lesão de erosão em dentina humana – estudo *in situ*”**, a ser realizada pela aluna do curso de mestrado em dentística Taís Fonseca Mantilla, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Moreira de Freitas, no Laboratório Especial de Laser em Odontologia (LELO) do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP).

As informações contidas neste formulário têm objetivo de firmar acordo escrito mediante o qual você - o voluntário da pesquisa - autoriza a sua participação na pesquisa, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que se submeterá, com capacidade de livre-arbítrio e sem qualquer coação.

Objetivo

Este estudo *in situ* tem como objetivo avaliar a ação do gel de TiF_4 na evolução da lesão de erosão em dentina humana erodida e submetida à abrasão.

Justificativa

Apesar de vários estudos terem demonstrado resultados promissores da aplicação do TiF_4 na prevenção e controle das lesões de erosão, ainda não se tem um protocolo ideal quanto à sua concentração, forma de apresentação e frequência de aplicação. Cabendo assim uma avaliação *in situ* da ação deste fluoreto em diferentes tempos sobre a superfície dentinária erodida e abrasionada.

Procedimentos

Os voluntários selecionados terão suas arcadas dentais moldadas para a confecção de um aparelho removível em resina acrílica, que ficará em contato com a face da frente dos pré-molares e molares inferiores, contendo fragmentos de dentina humana (devidamente esterilizados em radiação gama).

Dois dias antes do início do experimento e durante todo o experimento, você, voluntário da pesquisa, deverá utilizar exclusivamente a escova de dente, a pasta de dente e o fio dental fornecidos pela pesquisadora.

O experimento total irá durar 26 dias, sendo 2 fases compostas de 2 dias de preparação e 8 dias de utilização do aparelho removível, com exceção dos fins de semana.

Durante as 4 semanas de utilização do aparelho, você, voluntário da pesquisa, irá imergir o mesmo, contendo os fragmentos, em ácido cítrico 0,5% (pH 2,6) por 2 minutos, 6 vezes ao dia, em intervalos de 1,5h, durante os dias e horários pré-determinados. Após a desmineralização, o excesso de ácido deverá ser vertido sobre um papel absorvente e então, o aparelho deverá ser reinserido na boca. Você continuará higienizando seus dentes normalmente com pasta de dente com flúor. 60 minutos após o último desafio de cada dia, você deverá realizar a abrasão por escovação, com a escova elétrica e o creme dental fornecidos pela pesquisadora, e de acordo com as instruções transmitidas durante o treinamento com a pesquisadora. A porção interna do aparelho (que fica em contato com a mucosa) poderá ser escovada com a mesma escova de dente e pasta de dente fornecidos pela pesquisadora para sua higiene bucal.

Você deverá comparecer a faculdade 3 vezes por semana durante estas 4 semanas de utilização do aparelho em dias pré-determinados pela pesquisadora para aplicação do gel de TiF_4 , remoção de algumas amostras de acordo com a divisão dos grupos experimentais e recolhimento e armazenamento do aparelho (fins de semana).

As análises das amostras serão realizadas antes do início da fase *in situ* e logo após a retirada dos fragmentos do aparelho.

Riscos e Desconforto

Os voluntários poderão sentir um leve desconforto pelo uso do aparelho removível, que será minimizado com o ajuste criterioso do dispositivo. Além disso, com o passar dos dias, poderá haver uma leve halitose, principalmente ao acordar, devido ao acúmulo de biofilme. Porém, esses possíveis desconfortos não acarretam risco à saúde geral ou bucal dos voluntários.

Benefícios

Os resultados desta pesquisa contribuirão para um maior conhecimento sobre o tema abordado no meio científico, sem benefício direto para você. Clinicamente, pacientes com predisposição à erosão dental ou com sinais clínicos de erosão poderão ser beneficiados com os avanços das pesquisas nesta área.

Forma de acompanhamento e assistência

Todos os procedimentos serão acompanhados pelas pesquisadoras. Além disso, as mesmas oferecerão toda a assistência necessária durante a pesquisa, se o voluntário tiver qualquer problema com o uso do dispositivo intra-oral.

Garantia de sigilo da identidade do sujeito da pesquisa:

A pesquisadora irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. As informações fornecidas e o material que indique a sua participação serão confidenciais e de conhecimento apenas das pesquisadoras responsáveis. Nada será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

Garantia de esclarecimentos e Liberdade de recusa

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. A sua participação é voluntária e você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem prejuízos.

Custos da participação, Ressarcimento ou Indenização

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Você será ressarcido(a) de eventuais despesas com transporte para comparecimento na FOU SP para realização dos procedimentos laboratoriais. Não há indenização prevista, pois a presente pesquisa não oferece qualquer dano ao indivíduo.

Qualquer dúvida ou problema relativo à pesquisa deve ser comunicado com a maior brevidade possível à Taís Fonseca Mantilla através dos telefones (11) 97105-6035 ou pelo e-mail tais.mantilla@usp.br.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone (11) 3091-7960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br).

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pela pesquisadora, declaro que concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Local e Data

Nome do Participante	Assinatura	RG ou CPF
Pesquisadora Responsável	Assinatura	CRO/SP
Orientadora	Assinatura	CRO/SP

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

- A fase experimental *in situ* terá duração de 26 dias, sendo 2 períodos compostos por 8 dias de utilização do aparelho removível, com exceção dos fins de semana;
- O aparelho deverá ser removido para beber, comer, realizar a higiene bucal e ao fim do ciclo do dia;
- Em todas as ocasiões em que for beber (exceto água) ou comer, remova o aparelho da boca e coloque-o na caixa sobre a gaze umedecida com água destilada-deionizada (que será fornecida pela pesquisadora). Após ingestão de alimentos e bebidas (exceto água), proceda com a escovação dos dentes com o kit (escova e pasta de dentes e fio dental) fornecido pela pesquisadora. Se não for possível, enxágue a boca com água corrente e aguarde 15 minutos antes de colocar novamente o aparelho na boca;
- Realize a higienização dos dentes naturais, se possível, após todas as refeições e antes de dormir com a escova de dente, creme dental e fio dental fornecidos pela pesquisadora;
- Escove somente a superfície interna do aparelho que fica em contato com a tábua óssea vestibular duas vezes por dia: ao acordar e antes de dormir. Não escove a superfície que contém os fragmentos de dentina, e evite também, que o dentifrício entre em contato com as amostras;
- Durante o experimento, interrompa o uso de qualquer enxaguatório bucal;
- Durante toda a fase experimental *in situ* você deverá realizar devidamente os procedimentos instruídos pela pesquisadora, sendo:
 - Desafio ácido: imersão dos aparelhos no frasco de ácido com a data correspondente, 6x ao dia com intervalos de 1,5h (horários sugeridos na tabela “HORÁRIOS”) durante 2 minutos. Após a desmineralização, remover o excesso de ácido em papel absorvente, sem friccionar.
 - Escovação das amostras: deverá ser realizada 60 minutos após o último desafio ácido. Utilizar a escova de dentes elétrica fornecida pela pesquisadora com uma quantidade de creme dental (o mesmo utilizado para escovação dos dentes) do

tamanho de uma ervilha. Escovar inicialmente as superfícies oclusais dos próprios dentes inferiores por 15 segundos para produzir uma suspensão creme dental/saliva e então passar para as amostras. A cabeça da escova de dentes deverá estar perpendicular aos espécimes e empurrar as cerdas até que o alerta seja ativado (luz vermelha). Em seguida, vai manter a escova sobre o espécime, sem alterar a pressão e escová-los sem qualquer movimento manual adicional durante 10 segundos. Repetir o procedimento para todas as amostras. Após o período de escovação, a escova de dentes será desativada e enxaguada em água corrente. Os voluntários deverão expectorar o conteúdo e enxaguar a boca com água corrente durante 3 segundos, seguido pela remoção do aparelho. O aparelho será, em seguida, enxaguado com água corrente durante 1 minuto para remover remanescente de creme dental, reinserido na boca e utilizado por mais 30 minutos.

- Nos dias marcados no “CRONOGRAMA” como **“remoção amostra”** e **“aplicação”**, você deverá comparecer a faculdade nos horários determinados para aplicação do TiF_4 e remoção das amostras pré-determinadas;
- Caso você tenha algum desconforto durante o experimento, comunique imediatamente a pesquisadora responsável pelos telefones: (11) 97105-6035 ou pelo e-mail: tais.mantilla@usp.br;
- Sua colaboração é de extrema importância para o bom andamento deste experimento. Os horários e número de imersões na solução de ácido cítrico, bem como as escovações são essenciais para que a pesquisa forneça resultados confiáveis;

AGRADEÇEMOS SUA COLABORAÇÃO E DISPONIBILIDADE, E ESTAMOS
À DISPOSIÇÃO PARA QUAISQUER ESCLARECIMENTOS.

APÊNDICE C – Cronograma da fase in situ entregue aos voluntários

Dia	Dia da semana	Cronograma
1	Sáb	<i>Run-in</i> (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
2	Dom	<i>Run-in</i> (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
3	Seg	Instalação aparelho
4	Ter	
5	Qua	Remoção amostra controle 1 (após formação da película adquirida)
6	Qui	
7	Sex	Remoção amostra controle 2 (após formação da película adquirida) + Armazenamento aparelho
8	Sáb	Pausa (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
9	Dom	Pausa (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
10	Seg	Instalação aparelho
11	Ter	
12	Qua	Remoção amostra controle 3 (após formação da película adquirida) + Armazenamento aparelho
13	Qui	Pausa (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
14	Sex	Pausa (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
15	Sáb	<i>Wash-out</i> (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
16	Dom	<i>Wash-out</i> (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
17	Seg	Instalação aparelho + Aplicação 1 (após formação da película adquirida)
18	Ter	
19	Qua	Remoção amostra TiF₄ 1 + Aplicação 2 (após formação da película adquirida)
20	Qui	
21	Sex	Remoção amostra TiF₄ 2 (após formação da película adquirida) + Armazenamento aparelho
22	Sáb	Pausa (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
23	Dom	Pausa (higienização dos dentes com escova, pasta e fio fornecidos pela pesquisadora)
24	Seg	Instalação aparelho + Aplicação 3 (após formação da película adquirida)
25	Ter	
26	Qua	Remoção amostra TiF₄ 3 (após formação da película adquirida) + Remoção aparelho

APÊNDICE D – Tabela de horários entregue aos voluntários

Horários sugeridos	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Cronograma
8h						Inserção aparelho
10h					-----	Desafio ácido 1(2 min)
11h30					-----	Desafio ácido 2 (2 min)
13h					-----	Desafio ácido 3 (2 min)
14h30					-----	Desafio ácido 4 (2 min)
16h					-----	Desafio ácido 5 (2 min)
17h30					-----	Desafio ácido 6 (2 min)
18h30					-----	Escovação das amostras
19h					-----	Remoção do aparelho

Horários sugeridos	Segunda	Terça	Quarta	Cronograma
8h				Inserção aparelho
10h			-----	Desafio ácido 1 (2 min)
11h30			-----	Desafio ácido 2(2 min)
13h			-----	Desafio ácido 3 (2 min)
14h30			-----	Desafio ácido 4 (2 min)
16h			-----	Desafio ácido 5 (2 min)
17h30			-----	Desafio ácido 6 (2 min)
18h30			-----	Escovação das amostras
19h			-----	Remoção do aparelho

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito do Tif4 no controle da progressão da lesão de erosão em dentina. Estudo in situ.

Pesquisador: Tais Fonseca Mantilla

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24518013.8.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 544.566

Data da Relatoria: 27/02/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto inicial foi aprovado por este CEP em 12/2013. O adendo solicita a redução do período experimental das análises "in situ" de 38 para 26 dias.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo in situ visa avaliar os efeitos do gel de Tif4 sobre a dentina erodida e abrasionada. Para tanto, serão utilizados 48 terceiros molares humanos, a partir dos quais serão confeccionadas 96 amostras de dentina de 3 x 3 x 1,5 mm, que serão posicionadas em dispositivos intra-orais removíveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e expostos no projeto. Os resultados desta pesquisa contribuirão para um maior conhecimento sobre o tema abordado no meio científico. Clinicamente, pacientes com predisposição à erosão dental ou com sinais clínicos de erosão poderão ser beneficiados com os avanços das pesquisas nesta área.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta é interessante, relevante e executável. Os aspectos éticos foram respeitados e previstos no projeto.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepto@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 544.566

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados TCLE e a carta de doação de dentes do Banco de Dentes da FOUSP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 27 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** ceplo@usp.br