TAÍS FONSECA MANTILLA

**Avaliação dos efeitos promovidos pela aplicação do TiF_4 sobre a dentina
humana erodida**

São Paulo

2018

TAÍS FONSECA MANTILLA

Avaliação dos efeitos promovidos pela aplicação do TiF_4 sobre a dentina humana erodida

Versão Corrigida

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

Orientador: Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas

Co-Orientador: Profa. Dra. Cecilia Pedroso Turssi

São Paulo

2018

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.

Avaliação dos efeitos promovidos pela aplicação do TIF₄ sobre a dentina humana erodida / Taís Fonseca Mantilla ; orientador Patricia Moreira de Freitas; coorientador Cecilia Pedroso Turssi . -- São Paulo, 2018.

141 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- 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. Dentina. 3. Fluoreto. 4. Tetrafluoreto de titânio. I. Freitas, Patricia Moreira de. II. Turssi, Cecilia Pedroso. III. Título.

Mantilla TF. Avaliação dos efeitos promovidos pela aplicação do TiF_4 sobre a dentina humana erodida. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Para o papi-papudo-udo.

Só saudades.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu marido **Gabriel**, pelo apoio incondicional. Você foi o responsável por me acalmar nestes últimos meses de ~~loucura~~ doutorado, seja com abraços ou com comida mesmo!

À minha mami **Cecilia**, minha maior fã e minha maior ídola. Eu cheguei e foi você quem me mostrou o caminho!

À minha irmãzinha **Fernanda**, minha voluntária reclamona favorita. Você pode dizer que não, mas sei que você fez por amor e faria quantas vezes eu precisasse!

Apenas amor define!

Nós conseguimos de novo e eu agradeço com todo o meu coração!

AGRADECIMENTOS

À minha **família** e às minhas **amigas**, que se interessam pelo meu trabalho, mesmo sem entender do que se trata; que compreendem meus surtos, mesmo sem ter ideia de porque eu estou reclamando e perdoam minhas ausências, mesmo achando que eu exagero algumas vezes. Eu sei que vocês me amam e eu amo de volta! Contem comigo sempre!

À minha orientadora **Profa. Dra. Patricia Moreira de Freitas**, minha “teacher” e uma das minhas voluntárias mais dedicadas. Hoje eu saio do doutorado melhor do que entrei e devo muito deste crescimento a você! Muito obrigada por ter me guiado até aqui!

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Cecilia Pedroso Turssi**, que mesmo a milhares de quilômetros de distância, nunca demorou mais do que um milésimo de segundo para me responder e nunca me negou ajuda, mesmo em meio às obrigações do pós-doc.

À **Camilinha**, que foi promovida de minha “escravinha” do Mestrado a minha companheira de pesquisa. Seja em Campinas ou em San Francisco, passando por várias idas a Piracicaba, você foi a melhor *roomate* que eu poderia ter. A gente trabalhou bastante, mas nos divertimos muito também!

À **Andréa**, por dividir comigo momentos dentro e fora da faculdade. Definitivamente ganhei uma amiga nesta pós-graduação!

À **Juliane**, aluna de Iniciação Científica mais dedicada que eu já conheci. Vou continuar te ajudando, com todo o prazer, sempre que você precisar!

A todos os meus **colegas da pós-graduação**, principalmente pela companhia no laboratório. Fizeram total diferença no meu dia-a-dia!

Aos meus **voluntários**, que toparam me ajudar a tornar a etapa *in situ* desta pesquisa possível. Vocês fazem parte desta conquista e por isto, serei eternamente grata!

Aos **Profs. Márcia Martins Marques e Jaime Cury** e às alunas de pós-graduação **Ana Clara e Luma**, por me auxiliarem a executar metodologias que não domino. Obrigada pela paciência para responder todas as minhas intermináveis perguntas!

Aos **professores do Departamento de Dentística**, por todos os ensinamentos. Encerro a pós-graduação, mas levo comigo todas as conversas e conselhos!

Aos **funcionários do Departamento de Dentística**, por toda a disposição a me ajudar com a maior agilidade possível.

À **Profa. Dra. Adriana Bona Matos**, chefe do Departamento de Dentística da FOU SP. Obrigada por todo o estímulo!

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. Rodney Garcia Rocha. Aqui eu estudei, trabalhei, comi, dormi e fui muito feliz em todos estes anos!

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. Vahan Agopyan.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

A todos que torceram por mim, meu muito obrigada!

RESUMO

Mantilla TF. Avaliação dos efeitos promovidos pela aplicação do TiF_4 sobre a dentina humana erodida. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

A prevalência da erosão dental tem aumentado dentre diversas populações e tratamentos capazes de prevenir o desenvolvimento ou controlar a progressão das lesões existentes vem sendo investigados. Dados da literatura recente reportam que a utilização de fluoretos para estas finalidades promove resultados positivos, principalmente quando os compostos contém cátions metálicos polivalentes associados ao fluoreto, como é o caso do tetrafluoreto de titânio (TiF_4). Entretanto, sua aplicação clínica ainda não é possível, devido à falta da definição de protocolo ideal, que envolvem fatores que podem influenciar a proteção conferida pelo produto à superfície dental. O objetivo desta tese foi contribuir com o estabelecimento de um protocolo eficiente, mesmo sob a ação dos fatores modificadores presentes na cavidade bucal. Este trabalho apresenta um compilado de cinco estudos laboratoriais, apresentados na forma de capítulos. Nos estudos *in vitro*, foram utilizadas amostras de dentina radicular humana para avaliar os efeitos causados pela variação da concentração, veículo e pH dos produtos fluoretados sobre a perda de superfície após ciclagem erosiva. Os resultados nortearam posterior estudo *in situ* que testou, sob as condições presentes na cavidade bucal, a efetividade do tratamento no controle da erosão. Adicionalmente, determinou-se o grau de oclusão tubular gerado pela aplicação do gel de TiF_4 . Concluiu-se que composições contendo alta concentração de TiF_4 , em seu pH original e em veículos de mais alta substantividade, permitem significativa redução do processo de erosão, tendo sido capazes de desacelerar a progressão das lesões. Além disso, a camada ácido-resistente formada sobre a superfície dental se mantém após severa ciclagem erosiva/abrasiva e pode promover efeitos adicionais como a obliteração parcial da entrada dos túbulos dentinários.

Palavras-chave: Erosão. Dentina. Fluoretos. Tetrafluoreto de titânio.

ABSTRACT

Mantilla TF. Evaluation of the effects promoted by TiF_4 application on eroded human dentin. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

The prevalence of dental erosion has increased among several populations and treatments capable of preventing the development or controlling the progression of existing lesions have been investigated. Recent literature data report that the use of fluoride for these purposes promotes positive results, especially when the compounds contain polyvalent metal cations associated with fluoride, such as titanium tetrafluoride (TiF_4). However, its clinical application is not yet possible, due to the lack of definition of an ideal protocol, which involves factors that may influence the protection achieved by the product on the dental surface. The aim of this thesis was to contribute to the establishment of an efficient protocol, even under the action of modifying factors present in the oral cavity. This paper presents a compilation of five laboratorial studies, presented in the form of chapters. In the *in vitro* studies, human root dentin samples were used to evaluate the effects caused by the variation of concentration, excipient and pH of the fluoride products on the surface loss after erosive cycling. The results guided a subsequent *in situ* study which tested, under the conditions present in the oral cavity, the treatment effectiveness on the erosion control. Additionally, the degree of tubular occlusion generated by TiF_4 gel application was determined. It was concluded that compositions containing a high concentration of TiF_4 , in their original pH and in excipients with higher substantivity, allow a significant reduction of the erosion process, being able to decelerate the lesions progression. Besides, the acid-resistant layer formed on the dental surface remains after severe erosive/abrasive cycling and may promote additional effects, such as partial obliteration of the dentinal tubules entrances.

Keywords: Erosion. Dentin. Fluorides. Titanium tetrafluoride.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	água deionizada
AmF	fluoreto de amina
CaF ₂	fluoreto de cálcio
CaF ₂ -like	semelhantes a fluoreto de cálcio
CEP	comitê de ética em pesquisa
CMC	carboximetilcelulose
EDS	espectroscopia de energia dispersiva
ex	exemplo
F ⁻	íon flúor
FAp	fluorapatita
FFA	fluorofosfato acidulado
g	grama
h	hora
H ⁺	íon hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
kg/mm ²	quilogramas por milímetro quadrado
kGy	quilogray
HMDS	hexametildisilazano
H ₂ O	água
KOH	hidróxido de potássio
kV	quilovolt
log ₁₀	log na base 10
ltda	limitada
M	molar
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MEVa	microscopia eletrônica de varredura ambiental
min	minuto
ml	mililitro
ml/min	mililitro por minuto
mm	milímetro

mM	milimolar
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i> (metaloproteinases da matriz)
mV	milivolt
$\mu\text{g F}^-/\text{cm}^2$	micrograma de flúor por centímetro quadrado
μl	microlitro
μm	micrometro
N	Newton
NaF	fluoreto de sódio
nm	nanometro
n ^o	número
pH	potencial de hidrogênio
ppm F ⁻	partes por milhão de flúor
rpm	rotações por milímetro
s	segundo
Sn	estanho
SnCl ₂	cloreto de estanho
Ti	titânio
TiF ₄	tetrafluoreto de titânio
TiO ₂	óxido de titânio
x/dia	vezes ao dia
1 ^o	primeiro
2 ^a	segunda
3 ^a	terceira
3D	três dimensões
3 ^o	terceiro
3-pt	3 point
5 ^o	quinto

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
<	menor
=	igual
±	mais ou menos
≥	maior ou igual
®	marca registrada
>	maior
x	vezes

SUMÁRIO

1	PREFÁCIO	21
2	INTRODUÇÃO.....	23
3	PROPOSIÇÃO.....	27
4	CAPÍTULO I.....	29
5	CAPÍTULO II.....	43
6	CAPÍTULO III.....	59
7	CAPÍTULO IV	75
8	CAPÍTULO V	95
9	DISCUSSÃO.....	113
10	CONCLUSÕES.....	117
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXOS	125

1 PREFÁCIO

Esta tese é composta pela tradução livre para o português do conteúdo de cinco artigos científicos:

- I. Mantilla TF, Freitas PM. Titanium tetrafluoride (TiF₄) in the treatment of dental erosion. J Health Sci. 2017;19(4):236-40.
- II. Mantilla TF, Ramos-Oliveira TM, Silva CV, Cersosimo MCP, Turssi CP, Freitas PM. Effects of different concentrations and excipients of titanium tetrafluoride on dentin erosion prevention. Oral Health Prev Dent. 2017;15(5):461-5.
- III. Mantilla TF, Silva CV, Matos AB, Turssi CP, Freitas PM. Erosion protection achieved by different fluoride gels to dentin – submetido ao periódico Oral Health and Preventive Dentistry.
- IV. Mantilla TF, Silva CV, Tavares JP, Almeida LF, Cury JA, Turssi CP, Freitas PM. Effects caused by TiF₄ gel's application on human dentin which are responsible for its protection against erosion *in situ* – submetido ao periódico Caries Research.
- V. Mantilla TF, Silva CV, Ramos-Oliveira TM, Turssi CP, Ribeiro MS, Freitas PM. TiF₄ gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. Microsc Res Tech. 2017 Nov;80(11):1182-8.

2 INTRODUÇÃO

A erosão dental é um processo químico, caracterizado pela dissolução patológica e crônica dos tecidos duros dentais, decorrente da sua exposição a uma variedade de ácidos de origem não-bacteriana, que podem ter procedência intrínseca ou extrínseca (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011). Os ácidos intrínsecos são representados principalmente pelo ácido clorídrico presente no suco gástrico, enquanto que os extrínsecos são derivados, principalmente, de alimentos e bebidas ácidas (Ganss et al., 2012).

Aspectos químicos, biológicos e comportamentais determinam 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., 2011). Assim como acontece no esmalte, a porção inorgânica da dentina também é 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). A porção orgânica inicialmente se mantém, expondo uma densa camada de fibras colágenas (Breschi et al., 2002). Abaixo desta camada, encontra-se uma dentina parcialmente desmineralizada, seguida de dentina hígida (Kinney et al., 1995). Clinicamente, a exposição da dentina tende a acarretar o aparecimento de hipersensibilidade dentinária (West, 2008) e, em estágios mais avançados, perda da anatomia dental e da dimensão vertical (Schlueter et al., 2012), resultando em problemas estéticos e/ou funcionais para os pacientes.

Há evidências de que produtos fluoretados, quando aplicados sobre os tecidos dentais, são capazes de formar uma camada de proteção sobre a superfície dental, devido à precipitação de minerais, como o fluoreto de cálcio (CaF_2) (Wahengbam et al., 2011). Frente a desafios ácidos, esta camada funciona como uma barreira física, além de agir como um reservatório mineral, capaz de liberar cálcio e fluoreto para o meio bucal, aumentando sua saturação. Entretanto, frente a reduções significativas no pH, como ocorrem em processos erosivos, esta proteção tem se mostrado limitada e, por este motivo, estudos atuais buscam tratamentos capazes de formar camadas mais ácido-resistentes sobre a superfície dental.

Compostos contendo cátions metálicos polivalentes combinados a fluoretos, dentre eles o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), possuem uma interação única com as estruturas dentais, que leva à formação de uma camada ácido-resistente tipo *glaze* (Mundorff et al., 1972), capaz de aderir fortemente à superfície dental (Sen; Büyükyilmaz, 1998). Acredita-se que o titânio seja capaz de reagir com os átomos de oxigênio provenientes dos grupos fosfato e/ou da água, formando óxidos estáveis de titânio (Tveit et al., 1988; Ribeiro et al., 2006) ou com a própria matriz orgânica do tecido dental, dando origem a complexos organometálicos (Mundorff et al., 1972). O *glaze* pode agir como uma barreira de difusão (Hove et al., 2008) e funcionar como um reservatório de íons flúor, retardando a dissolução do tecido dental frente a desafios ácidos (Wiegand et al., 2010b).

Apesar da comprovada interação entre o TiF_4 e os tecidos dentais, a literatura ainda apresenta resultados controversos quanto a sua proteção frente a desafios erosivos. Isto se deve à variedade de protocolos aplicados nos diferentes experimentos, o que demonstra que fatores como concentração, pH e forma de apresentação do produto influenciam significativamente na efetividade do tratamento com este fluoreto.

Considerando-se primeiramente o fator concentração, compostos contendo 4% de TiF_4 em sua composição obtiveram melhores resultados que formulações com concentrações mais baixas, tendo formado uma camada do tipo *glaze* mais espessa após a sua aplicação (Büyükyilmaz et al., 1997), o que possibilitou a redução do amolecimento (Magalhães et al., 2009) e perda de superfície (Mantilla et al., 2017a) causados pelos desafios ácidos.

Quanto ao fator pH, sabe-se que o TiF_4 em condições de pH baixos apresenta melhores resultados quanto à formação de precipitado sobre a superfície dental e redução da desmineralização (Wiegand et al., 2009). No entanto, esta acidez impossibilita a aplicação doméstica regular do TiF_4 (Wiegand et al., 2010b), uma vez que seu pH natural (pH 1,2) seria prejudicial à saúde dos tecidos moles, caso este fosse utilizado como colutório. Desta forma, aplicações controladas por cirurgiões-dentistas seriam a alternativa de escolha e, para tanto, apresentações na forma de géis (Vieira et al., 2005; Lepri et al., 2013; Mantilla et al., 2017b) e vernizes (Magalhães et al., 2010; Levy et al., 2014) vem sendo testadas, já que a maior viscosidade desses veículos permite uma aplicação mais localizada do material, além de mantê-lo na superfície dental por mais tempo, o que pode influenciar

positivamente a manutenção do efeito do fluoreto (Mantilla et al., 2017a). Mesmo frente a desafios ácidos severos, o *glaze* já se mostrou resistente quando aplicado sobre a dentina, criando uma superfície mais lisa e com obliteração parcial dos túbulos dentinários (Mantilla et al., 2017c), importante para a discussão nos efeitos do tratamento na redução da hipersensibilidade dentinária.

Neste sentido, os estudos apresentados nessa tese foram delineados para contribuir com a definição de um protocolo seguro e eficiente, mesmo sob a ação dos fatores modificadores presentes na cavidade bucal, que possa ser testado clinicamente com o objetivo de trazer benefícios concretos para os pacientes que apresentam erosão dental.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho, composto por 5 artigos de publicação, teve como objetivos:

1. Apresentar os mecanismos de ação do TiF_4 e discutir os fatores que podem melhorar sua capacidade de proteção contra a erosão dental.
2. Avaliar *in vitro* o efeito preventivo do tetrafluoreto de titânio (TiF_4), gel e solução, em diferentes concentrações e pH, na prevenção da erosão em dentina.
3. Avaliar *in vitro* os efeitos protetores de géis fluoretados com diferentes concentrações de fluoreto e pH sobre a dentina erodida.
4. Verificar a proteção conferida pelo gel de TiF_4 (4%, pH original) após ciclagem erosiva *in situ* e auxiliar a elucidar os motivos que influenciam este efeito.
5. Avaliar, por um modelo *in situ*, a oclusão tubular causada pelo gel de TiF_4 na superfície da dentina erodida/abrasionada.

4 CAPÍTULO I

4.1 Resumo

A erosão dental é uma patologia multifatorial que leva a uma perda de substrato dental causada pela sua exposição a ácidos de origem não-bacteriana. O processo se inicia com uma desmineralização superficial do esmalte que, quando continuamente exposta a soluções erosivas, pode até acarretar na exposição da dentina, trazendo problemas estéticos/funcionais aos pacientes, além de elevar as chances de hipersensibilidade dentinária. Os produtos fluoretados, quando aplicados sobre a superfície dental, formam uma barreira física de proteção, que também age como reservatório de íons flúor. Entretanto, frente a recorrentes desafios erosivos, esta proteção tem efetividade limitada. A literatura atual já demonstrou a capacidade de compostos contendo cátions metálicos polivalentes associados a fluoretos, incluindo o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), de formar camadas mais ácido-resistentes. A habilidade do íon titânio de se ligar simultaneamente com íons F^- e o tecido dental permite a formação de uma barreira de difusão sobre a superfície dental, conhecida como *glaze*, que pode protegê-la contra a desmineralização ácida. No entanto, ainda é necessário estabelecer um protocolo clínico ideal envolvendo a definição de fatores capazes de determinar o sucesso do tratamento, como concentração, pH, veículo e forma/tempo de aplicação, além da frequência de reaplicação. A presente revisão crítica tem como objetivo fornecer uma breve visão geral dos mecanismos de ação do TiF_4 e discutir os fatores que podem melhorar sua capacidade de proteção contra a erosão dental.

4.2 Introdução

4.2.1 Erosão dental

O desgaste dentário é uma condição patológica multifatorial 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 (Schlueter et al., 2012).

Estes 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 do tecido dental aumenta exponencialmente (West et al., 2001). No entanto, diferentemente do que ocorre em lesões cariosas, o pH crítico para a formação de lesões de erosão não pode ser definido (Lussi et al., 2011; Ganss et al., 2012). O pH crítico é aquele no qual os fluidos presentes na cavidade bucal encontram-se saturados em relação à superfície dental (Ganss et al., 2012). Entretanto, este também é dependente de outros fatores, como a solubilidade do tecido dental e concentração de minerais presentes na saliva e na solução ácida, como cálcio, fosfato e fluoreto (Lussi et al., 2011). Portanto, se ocorrer um desequilíbrio na reação de troca mineral entre dente e fluidos da cavidade bucal, sendo o tecido dental supersaturado em relação ao meio ao seu redor, a desmineralização da superfície dental se inicia.

O processo de erosão dental é caracterizado inicialmente por uma desmineralização da superfície do esmalte (Schlueter et al., 2012), 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., 2011), iniciando-se pela área interprismática e seguindo pela região central do prisma. 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). Em consequência das alterações causadas nas características da superfície, o esmalte se torna mais susceptível à ação de forças mecânicas (Wiegand et al., 2008a). Se o desafio erosivo persistir, a dissolução mineral progride, podendo levar à exposição da camada de dentina.

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 (Kinney et al., 1995). No entanto, a porção orgânica se mantém, expondo uma densa e fibrosa camada de fibras colágenas. Logo abaixo desta camada, encontra-se uma dentina parcialmente desmineralizada, seguida de dentina hígida (Kinney et al., 1995). Isto ocorre 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., 2009). Por este motivo, a presença da matriz orgânica confere à erosão dental sua característica auto-limitante (Lussi et al., 2011).

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), devido a sua capacidade de hidrolisar componentes da matriz extracelular (Kato et al., 2009). Desta forma, expõem-se camadas mineralizadas, permitindo que a lesão de erosão progrida.

Diversas MMPs já foram identificadas (van Strijp et al., 2003), 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 (Chaussain-Miller et al., 2006; Kato et al., 2009). Em lesões de erosão em dentina, a presença de ácidos na cavidade bucal pode levar à exposição das fibrilas colágenas e ativação das MMPs (Chaussain-Miller et al., 2006). 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 começam a degradar a matriz colágena (Chaussain-Miller et al., 2006). Isto pode resultar na

exposição da camada parcialmente desmineralizada da dentina, a qual se torna novamente susceptível à ação de ácidos e, conseqüentemente, à progressão da lesão de erosão (Buzalaf et al., 2012).

Conforme o processo da erosão persiste, as lesões tornam-se cada vez maiores, podendo trazer problemas estéticos e/ou funcionais aos pacientes. Clinicamente, os cirurgiões-dentistas podem se deparar com lesões amplas e rasas (Lussi et al., 2011), que podem resultar até na perda da anatomia ideal e redução da dimensão vertical. Além disso, a associação entre erosão e hipersensibilidade dentinária é frequente (West, 2008), uma vez que a camada de dentina exposta permite que estímulos sejam propagados pelos túbulos, causando a movimentação do fluido dentinário e a sintomatologia dolorosa (West, 2008).

Como a erosão envolve perda de estrutura dental, após o desenvolvimento das lesões, a remineralização não é possível. Dependendo da quantidade de tecido perdido, pode ser necessária a realização de tratamento restaurador convencional (Schlueter et al., 2012). Entretanto, com a identificação de fatores de risco envolvendo a dieta e saúde do paciente, somados a lesões em estágios iniciais, pode ser realizado o diagnóstico precoce da doença. Nestes casos, mudanças nos hábitos dos pacientes associados a tratamentos preventivos podem proteger a superfície dental contra os desafios ácidos e controlar a progressão da erosão.

Este capítulo tem como objetivo proporcionar aos leitores uma visão geral da literatura atual sobre a aplicação de fluoretos no tratamento para o controle da erosão dental, enfatizando no mecanismo de ação do tetrafluoreto de titânio e em fatores que podem influenciar no seu efeito protetor.

4.3 Como prevenir e tratar lesões de 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; Comar et al., 2012), soluções antiácidas (Turssi et al., 2012), lasers de alta potência (Lepri et al., 2015), adesivos (Sundaram et al., 2007) e selantes (Bartlett et al., 2011).

Os fluoretos são sabidamente capazes de formar uma camada de precipitados minerais sobre a superfície dental (Magalhães et al., 2011). Logo após a aplicação do fluoreto, há a deposição de compostos semelhantes ao fluoreto de cálcio (CaF_2 -like) sobre a superfície dental. Frente a desafios cariogênicos, isto pode ser bastante vantajoso, já que íons F^- são liberados pela dissolução da camada de CaF_2 -like devido à queda no pH do biofilme (Wiegand et al., 2010).

Frente à desafios erosivos, além da liberação de fluoreto, a camada de CaF_2 -like pode funcionar como uma barreira física e evitar o contato direto entre ácidos e superfície dental (Wiegand et al., 2010). No entanto, quando exposta à redução significativa de pH, como ocorre no processo erosivo, 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 eficazes, já que são capazes de formar camadas de compostos CaF_2 -like mais espessas, densas e estáveis (Wiegand et al., 2010). 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; Comar et al., 2012). Por este motivo, compostos contendo cátions metálicos polivalentes combinados a fluoretos vêm sendo testados.

Além das fórmulas fluoretadas formadas com compostos divalentes, como o fluoreto estanhoso, têm sido investigados os tetrafluoretos, especialmente o de titânio (TiF_4).

4.4 Tetrafluoreto de titânio

4.4.1 Mecanismo de ação

O íon titânio tem a capacidade de formar complexos concomitantemente com íons F^- e tecidos dentais (Skartveit et al., 1991). Como resultado, a ação do TiF_4 vem sendo largamente estudada (Wei et al., 1976; Büyükyilmaz et al., 1997; Wiegand et al., 2008b; Levy et al., 2014) na Odontologia. Sob a forma de TiF_4 , este fluoreto

apresenta satisfatória estabilidade e mecanismo de ação diferenciado em relação aos demais fluoretos. No entanto, quando hidrolisado, gera uma solução ácida (Sen; Büyükyilmaz, 1998) após a quebra das moléculas de água promovida pelo íon titânio e, conseqüente, liberação de íons H^+ , o que pode levar a uma relativa citotoxicidade (Sen et al., 1998). Entretanto, o TiF_4 , quando administrado via enteral, não apresenta sinais de toxicidade sistêmica (Shresta, 1983). Ainda assim, mesmo considerando a acidez da solução, a desmineralização superficial causada é apenas parcial (Skarveit et al., 1991) e pode favorecer a penetração do fluoreto no tecido mineralizado (Hals et al., 1981; Skartveit et al., 1989).

Além da penetração do fluoreto e incorporação do titânio na hidroxiapatita (Wiegand et al., 2010), 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 fluoreto pelo tecido dental (Hals et al., 1981). Além disso, há a formação de uma camada ácido resistente sobre a superfície dental (Wei et al., 1976; Büyükyilmaz et al., 1997; Sen; Büyükyilmaz, 1998; Medeiros et al., 2016), 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, uma vez liberado pela hidrólise das moléculas de TiF_4 , pode se unir ao oxigênio derivado da água ou das moléculas de fosfato da superfície dental. Após este processo, uma camada de TiO_2 é formada (Tveit et al., 1988), como demonstrado na figura 4.1. Além disso, uma hipótese alternativa propõe que o *glaze* seja composto por complexos organometálicos formados entre titânio e matriz orgânica dental (Mundorff et al., 1972).

Já que permite a formação desta camada ácido-resistente, o TiF_4 é responsável pela produção de uma barreira de difusão e de um reservatório de íons F^- , que podem retardar a dissolução do tecido dental exposto a desafios ácidos (Wiegand et al., 2010). Por este motivo, seu efeito sobre a erosão tem sido estudado e tem obtido resultados promissores tanto em esmalte (Wiegand et al., 2008b; Magalhães et al., 2009; Wiegand et al., 2009; Comar et al., 2012; Levy et al., 2014) quanto em dentina (Mantilla et al., 2017a). Estes resultados são dependentes da concentração, forma de apresentação, pH e tempo de aplicação do TiF_4 (Vieira et al.,

2005; 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.

Figura 4.1 – Hidrólise da molécula de TiF_4 e mecanismo de formação da camada de *glaze*. Imagem extraída de Mantilla TF, Freitas PM. Titanium tetrafluoride (TiF_4) in the treatment of dental erosion. J Health Sci 2017;19(4):236-40 (Anexo E).

4.4.2 Fatores que podem influenciar na efetividade do TiF_4

Quanto ao veículo que deveria ser utilizado para a aplicação do TiF_4 , o mais simples seria a incorporação do TiF_4 nos dentífrícios, 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), mantendo sua proteção contra a erosão mesmo após desafios abrasivos (Wiegand et al., 2014; Mantilla et al., 2017a).

Um pH baixo pode favorecer a penetração de íons F^- na camada de tecido parcialmente desmineralizada (Buchalla et al., 2007), uma vez que a exposição da matriz orgânica aumenta a área de superfície da dentina e cria zonas de difusão

(Tveit et al., 1988), que promovem a retenção de CaF_2 também na região intratubular da dentina (Buchalla et al., 2007). Entretanto, esta acidez impossibilita a aplicação doméstica regular do TiF_4 em seu pH original (pH 1,2), sendo necessário o ajuste do mesmo. Por outro lado, um pH ajustado pode comprometer a ação do TiF_4 (Comar et al., 2012) e por esta razão, aplicações controladas por cirurgiões-dentistas seriam a alternativa de escolha. Neste sentido, apresentações na forma de soluções (Wiegand et al., 2014), géis (Vieira et al., 2005; Lepri et al., 2015; Mantilla et al., 2017b) e vernizes (Levy et al., 2014) vêm sendo testadas, pois possibilitam aplicações mais controladas sobre as lesões, evitando o contato entre o produto e os tecidos moles. Além disso, a maior substantividade dos produtos nas formas de géis e vernizes pode favorecer a manutenção do efeito do fluoreto, uma vez que promovem uma manutenção mais duradoura do produto na superfície dental e, conseqüentemente, podem prolongar seu contato com os dentes (Ganss et al., 2012; Mantilla et al., 2017b).

Quanto à concentração ideal, compostos contendo 4% de TiF_4 em sua composição obtiveram melhores resultados quando comparados com concentrações menores, sendo capazes de formar um *glaze* mais espesso e tenaz após o tratamento (Büyükyilmaz et al., 1997), promover maior deposição de compostos *CaF_2 -like* (Laufer et al., 1981), reduzir o amolecimento superficial causado pelos desafios ácidos (Magalhães et al., 2009) e promover a liberação de fluoreto para o meio bucal por até 12 h (Comar et al., 2014). Além disso, tempos de aplicação prolongados, entre 2 e 4 minutos, podem favorecer a retenção de F^- na superfície dental (Skartveit et al., 1989) e diminuir a perda mineral pelo tecido dental diante de desafios ácidos (Wiegand et al., 2008b).

A frequência de aplicação clínica ideal ainda não foi determinada, mas sabe-se que o TiF_4 é capaz de causar modificações na morfologia da superfície desde a sua primeira aplicação (Mantilla et al., 2017a), levando à formação de uma superfície mais lisa (Mantilla et al., 2017c) e recoberta por precipitado tanto em esmalte (Medeiros et al., 2016) quanto em dentina (Basting et al., 2015). Entretanto, a reaplicação do fluoreto pode favorecer a redução da perda de substrato após a exposição do tecido a soluções erosivas (Mantilla et al., 2017a) e promover obliteração parcial da entrada dos túbulos (Mantilla et al., 2017c), o que poderia favorecer a redução da hipersensibilidade dentinária.

4.5 Conclusão

Ainda que já tenha sido comprovada a interação única que ocorre entre o TiF_4 e a superfície dental (Mundorff et al., 1972), diversos fatores podem influenciar na sua efetividade em prevenir e controlar a erosão dental. O fato de o TiF_4 apresentar melhores resultados em seu pH original, que é ácido, exclui a possibilidade de sua aplicação caseira.

A literatura atual demonstra resultados satisfatórios quando o TiF_4 é aplicado sobre a superfície dental em formas com maior substantividade, períodos de aplicação prolongados e concentrações mais altas. Ainda que o TiF_4 seja considerado uma alternativa de tratamento segura, a maioria dos estudos que avaliaram a ação deste fluoreto contra a erosão foram realizados *in vitro* e *in situ*. Portanto, de forma a torná-lo um produto disponível para comercialização, estudos clínicos devem ser conduzidos para confirmar seu potencial em controlar lesões erosivas. Uma vez que um protocolo clínico ideal para a aplicação do TiF_4 tenha sido estabelecido, pacientes poderão se beneficiar da sua utilização na rotina dos consultórios odontológicos.

4.6 Referências

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(1):26-9.

Basting RT, Leme AA, Bridi EC, Amaral FLB, França FMG, Turssi CP, Bedran-Russo AK. Nanomechanical properties, SEM, and EDS microanalysis of dentin treated with 2.5% titanium tetrafluoride, before and after an erosive challenge. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater. 2015;103B:783-9.

Buchalla W, Lennon AM, Becker K, Lucke T, Attin T. Smear layer and surface state affect dentin fluoride uptake. Arch Oral Biol. 2007 Oct;52(10):932-7.

Büyükyılmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci.* 1997 Oct;105(5 Pt 2):473-7.

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

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006 Jan;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;2012:134350. doi: 10.1155/2012/134350. Epub 2012 Nov 8.

Comar LP, Souza BM, Grizzo LT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Evaluation of fluoride release from experimental TiF₄ and NaF varnishes *in vitro*. *J Appl Oral Sci.* 2014 Apr;22(2):138-43.

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 Nov-Dec;38(6):561-6.

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.* 2009 Jun;117(3):255-60.

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 Dec;25(6):351-64.

Gu Z, Li J, Söremark R. Influence of tooth surface conditions on enamel fluoride uptake after topical application of TiF₄ *in vitro*. *Acta Odontol Scand.* 1996 Oct;54(5):279-81.

Hals E, Tveit AB, Tötdal B, Isrenn R. Effect of NaF, TiF₄ and APF solutions on root surfaces *in vitro*, with special reference to uptake of F. *Caries Res.* 1981;15(6):468-76.

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 Nov-Dez;17(6):560-4.

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 Maio;74(5):1179-84.

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

Laufer B, Mayer I, Gedalia I, Deutsch D, Kaufman HW, Tal M. Fluoride-uptake and fluoride-residual of fluoride-treated human root dentine *in vitro* determined by chemical, scanning electron microscopy and x-ray diffraction analyses. *Arch Oral Biol.* 1981;26(3):159-63.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SAM. *In situ* investigation of the effect of TiF₄ and CO₂ laser irradiation on the permeability of eroded enamel. *Arch Oral Biol.* 2015 Jun;60(6):941-7.

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 Maio;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, 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.

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 Jan-Fev;17(1):56-60.

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

Mantilla TF, Turssi CP, Ramos-Oliveira TM, Silva CV, Sasaki LC, Freitas PM. The *in situ* effect of titanium tetrafluoride gel on erosion/abrasion progression in human dentin. Braz Dent J. 2017a Maio-Jun;28(3):337-45.

Mantilla T, Ramos-Oliveira T, Silva C, Cersosimo M, Turssi C, Freitas P. Effects of different concentrations and excipients of titanium tetrafluoride on dentin erosion prevention. Oral Health Prev Dent. 2017b;15(5):461-5.

Mantilla TF, Silva CV, Ramos-Oliveira TM, Turssi CP, Ribeiro MS, Freitas PM. TiF₄ gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. Microsc Res Tech. 2017c Nov;80(11):1182-8.

Medeiros MID, Carlo HL, Lacerda-Santos R, Lima BAG, Sousa FB, Rodrigues JA, Carvalho FG. Thickness and nanomechanical properties of protective layer formed by TiF₄ varnish on enamel after erosion. Braz Oral Res. 2016 Ago;30(1):e75.

Mundorff SA, Little MF, Bibby BG. Enamel dissolution: II. Action of titanium tetrafluoride. J Dent Res. 1972 Nov-Dez;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 Maio-Jun;37(3):225-31.

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

Sen BH, Büyükyılmaz T. The effect of 4% titanium tetrafluoride solution on root canal walls - A preliminary investigation. J Endod. 1998 Abr;24(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 Set;86(3):341-6.

Shresta BM. Effect of systemic titanium fluoride (TiF₄) on fluoride uptake by developing rat enamel. Caries Res. 1983;17(3):264-6.

Skartveit L, Tveit B, Totdal B, Selvig KA. Effects of TiF₄ solutions on root surfaces *in vitro* after different application periods. Acta Odont Scand. 1989 Fev;47(1):25-30.

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 Jun;49(3):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 Feb;52(2):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 Nov-Dec;32(6):539-43.

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 Ago;120(4):349-52.

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 Dez;96(6):536-40.

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 Jan-Feb;37(1):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 Set-Out;39(5):371-9.

Wei SHY, Soboroff DM, Wefel JS. Effects of titanium tetrafluoride on human enamel. *J Dent Res*. 1976 Maio-Jun;55(3):426-431.

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 Set;28(9):860-4.

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

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 Jun;53(6):497-502.

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 Ago;54(8):790-5.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF_4) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. Oral Health Prev Dent. 2010;8(2):159-64.

Wiegand A, Schneider S, Sener B, Roos M, Attin T. Stability against brushing abrasion and the erosion-protective effect of different fluoride compounds. Caries Res. 2014;48(2):154-62.

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.

5 CAPÍTULO II

Efeito de diferentes concentrações e veículos de tetrafluoreto de titânio na prevenção da erosão em dentina.

5.1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito preventivo do tetrafluoreto de titânio (TiF_4), gel e solução, em diferentes concentrações, na prevenção da erosão em dentina. A partir de 140 fragmentos de dentina radicular ($3 \times 3 \times 1$ mm) obtidos de 70 terceiros molares humanos recém-extraídos, foram selecionados 70, com valores de microdureza Knoop intermediários e curvaturas de superfície mais baixas, e divididos aleatoriamente em 7 grupos ($n=10$): G1: controle negativo (sem tratamento); G2: controle positivo (solução de AmF/NaF/SnCl_2); G3: gel placebo (sem adição de fluoreto); G4: solução de TiF_4 a 1%; G5: gel de TiF_4 a 1%; G6: solução de TiF_4 a 4%; G7: gel de TiF_4 a 4%. As amostras foram submetidas a 10 dias de ciclagem erosiva, que consistiu na alternância de exposições a ácido cítrico (0,05 M, pH 2,3, 2 min, 6x/dia) e solução remineralizadora (pH 7,0, 90 min, entre as exposições ao ácido). Após 5 e 10 dias de ciclagem de pH, a perda de superfície foi analisada por perfilometria óptica (μm). Os testes de ANOVA 2-fatores e Tukey ($p < 0,05$) demonstraram que após 5 dias, G7 apresentou uma significativa redução na perda de superfície quando comparado aos demais grupos, enquanto que G4, G5 e G6 não diferiram significativamente do G1. Após 10 dias de desafios erosivos, o grupo G7 não diferiu estatisticamente do G2 e não houve diferença entre G4, G5, G6 e G1. Já o G3 apresentou a maior perda de superfície quando comparado a todos os grupos, exceto G1 e G5. Conclui-se que os tratamentos testados não foram capazes de prevenir a erosão dental, entretanto a aplicação do gel de TiF_4 a 4% reduziu a perda de superfície em dentina.

5.2 Introdução

Estudos epidemiológicos tem demonstrado um aumento na prevalência da erosão dental (Barbour; Rees, 2006; Jaeggi; Lussi, 2006; El Aidi et al., 2010; Bartlett et al., 2013), a qual estimulou a investigação de estratégias para prevenir e controlar as lesões de erosão. Compostos fluoretados, como o fluoreto de sódio (NaF), fluoreto de amina (AmF) e flúor fosfato acidulado (FFA) tem sido usados há anos na prevenção da cárie (Hals et al., 1981; Vieira et al., 2005; Schlueter et al., 2007; Wiegand et al., 2010) e também se mostraram eficientes em controlar e reduzir a erosão (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009a; Yu et al., 2010). Ganss et al. (2004) especulou que a deposição de precipitados semelhantes ao CaF_2 ocorre sobre a superfície do esmalte, prevenindo a perda de tecido dental por fornecer uma quantidade adicional de minerais, a qual é dissolvida quando submetida a condições ácidas antes que o esmalte seja atacado. Entretanto, outros estudos demonstraram que estes agentes promovem benefícios limitados frente a recorrentes desafios erosivos (Ganss et al., 2000; Ganss et al., 2001; Yu et al., 2010).

Baseado nisto, diversos estudos têm investigado preparações fluoretadas contendo vários cátions metálicos polivalentes, como o tetrafluoreto de titânio (TiF_4) (Wei et al., 1976; Tveit et al., 1988; Vieira et al., 2005; Wiegand et al., 2008; Magalhães et al., 2010; Wiegand et al., 2010a; Wiegand et al., 2010b; Lepri et al., 2015). O mecanismo de ação do TiF_4 consiste na formação de uma camada ácido-resistente sobre a superfície dental, aumento na incorporação de fluoreto e incorporação do titânio no cristal de hidroxiapatita (Wiegand et al., 2010b). Alguns autores acreditam que o titânio seja capaz de reagir com os grupos oxigênio derivados da água ou das moléculas de fosfato (Tveit et al., 1988; Ribeiro et al., 2006), o que contribui para a formação de uma camada ácido-resistente semelhante a um *glaze*, que pode ser formada por óxido de titânio estável – TiO_2 – ou complexos organometálicos de titânio e matriz orgânica dental (Mundorff et al., 1972; Wei et al., 1976). Em ambos os casos, a camada de *glaze* é rica em titânio e fluoreto, e age também como um reservatório de íons F^- , reduzindo a dissolução ácida ou aumentando a remineralização do tecido duro dental (Wiegand et al., 2010a).

Devido às propriedades citadas, o TiF_4 pode ser uma alternativa para reduzir a erosão (Hove et al., 2008; Magalhães et al., 2009; Wiegand et al., 2010a; Lepri et al., 2013; Levy et al., 2014). No entanto, diferentes formas de apresentação do produto (ex: gel, solução, verniz), concentração do fluoreto e tempo de exposição recomendado podem levar a uma variação na incorporação de íons F^- na estrutura dental e, assim, alterar o seu potencial em prevenir a erosão em dentina. Portanto, este estudo visa comparar o potencial do TiF_4 , gel e solução, em diferentes concentrações, em prevenir a erosão em dentina humana.

5.3 Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 919.043/14 - Anexo A).

5.3.1 Delineamento experimental

O presente estudo *in vitro* seguiu um delineamento bloco randomizado, com dois fatores experimentais: 1. tratamentos de superfície em 7 níveis: controle negativo (sem tratamento de superfície), controle positivo (solução de $\text{AmF}/\text{NaF}/\text{SnCl}_2$), gel placebo (sem adição de fluoreto), solução de TiF_4 a 1%, gel de TiF_4 a 1%, solução de TiF_4 a 4% e gel de TiF_4 a 4%; 2. tempo de avaliação em dois níveis: após 5 e 10 dias de ciclagem erosiva. A variável resposta foi a perda de superfície mensurada em perfilômetro óptico (μm).

5.3.2 Preparação das amostras

Cento e quarenta fragmentos de dentina radicular (3 x 3 x 1 mm) foram obtidos a partir de 70 terceiros molares humanos recém-extraídos, com o auxílio de uma cortadeira de alta precisão (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) sob irrigação, e foram armazenados em solução de timol 0,1%. Os fragmentos foram incluídos em resina acrílica (VariDur 10, Buehler) e polidos com uso de uma série de lixas de carbeto de silício (#1200, #2400 e #4000) e suspensão de alumina de 0,3 µm (Alfa Micropolish, Buehler) em politriz (Buehler). Subsequentemente, as amostras foram lavadas com água deionizada em ultrassom por 10 min para remover os *debris* gerados durante o procedimento de polimento e, em seguida, armazenadas em umidade relativa a 4 °C.

5.3.3 Seleção das amostras de dentina e grupos experimentais

A fim de padronizar as amostras, a microdureza Knoop foi mensurada na superfície de cada uma delas com o auxílio de um microdurômetro (HMV-2000, Shimadzu, Kyoto, Japão). Três endentações (10 g por 10 s) (Turssi et al., 2010) com 200 µm entre elas foram realizadas, a 500 µm do canto superior direito de cada amostra. Noventa e oito amostras das 140 produzidas inicialmente foram selecionadas baseado em seus valores de microdureza médios (média de microdureza de superfície = $61,4 \pm 5,2 \text{ kg/mm}^2$). As amostras selecionadas foram então avaliadas em um perfilômetro óptico (3D Proscan 2100, Scantron; Eagan, MN, EUA) para determinar a curvatura de superfície. As 70 amostras com os menores valores de curvatura de superfície foram incluídas (média de curvatura de superfície = $0,18 \pm 0,11 \text{ µm}$).

As amostras de dentina selecionadas foram distribuídas aleatoriamente em 7 grupos (n = 10) como descrito na tabela 5.1. Soluções e géis foram produzidos pela pesquisadora responsável, exceto a solução de AmF/NaF/SnCl₂ (Elmex Erosion, Gaba International, Therwill, Suíça). Os géis foram produzidos pela adição de carboximetilcelulose às soluções. O pH original de todas as soluções e géis foram mantidos e monitorados em eletrodo específico de pH imediatamente antes da aplicação. As concentrações foram determinadas com base em estudos anteriores (Büyükyilmaz et al., 1997; Vieira et al., 2005; Comar et al., 2014; Lepri et al., 2015).

Tabela 5.1 – Grupos experimentais

Grupo	Tratamento	Fabricante	ppm F⁻	pH	Aplicação
G1	Controle negativo: sem tratamento	-	-	-	-
G2	Controle positivo: solução de AmF/NaF/SnCl ₂	GABA International (Therwill, Suíça)	500	4,5	Passiva (5 ml, 30 s, aplicação diária)
G3	Gel placebo: sem adição de fluoreto	-	0	6,3	Ativa (20 µl, 4 min, aplicação única)
G4	Solução de TiF ₄ a 1%	Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil)	6132	1,2	Passiva (10 µl, 1 min, aplicação única)
G5	Gel de TiF ₄ a 1%	Sigma Aldrich	6132	1,5	Ativa (20 µl, 4 min, aplicação única)
G6	Solução de TiF ₄ a 4%	Sigma Aldrich	24530	1,2	Passiva (10 µl, 1 min, aplicação única)
G7	Gel de TiF ₄ a 4%	Sigma Aldrich	24530	1,5	Ativa (20 µl, 4 min, aplicação única)

5.3.4 Tratamentos de superfície

Tiras de fita adesiva (UPVC) (Graphic Tape, Chartpak; Leeds, MA, EUA) foram fixadas sobre a superfície de cada amostra, mantendo exposta uma área central de 1 x 3 mm e duas áreas de referência laterais (Turssi et al., 2014). Antes do início da ciclagem erosiva, as amostras foram tratadas como descrito na tabela 5.1.

Amostras do grupo G2 foram tratadas diariamente antes de cada ciclo erosivo (seguindo as recomendações do fabricante), enquanto os outros grupos receberam uma única aplicação do respectivo tratamento, antes do primeiro desafio erosivo do primeiro dia da ciclagem. Os protocolos de aplicação – ativos ou passivos – foram determinados baseados em resultados positivos apresentados na literatura para prevenção da erosão (Vieira et al., 2005; Wiegand et al., 2009; Wiegand et al., 2010a; Lepri et al., 2013; Lepri et al., 2015).

5.3.5 Ciclagem erosiva

Após a aplicação dos tratamentos de superfície, a ciclagem erosiva foi realizada por 10 dias consecutivos por meio de imersões individuais das amostras em 4 ml de ácido cítrico a temperatura ambiente sob leve agitação em agitador orbital (35 rpm). A exposição ao ácido foi repetida 6 vezes ao dia (2 min cada), por 10 dias. Após cada desafio erosivo, as amostras foram lavadas com água corrente por 1 min e imersas em solução remineralizadora. O tempo entre os ciclos foi de 1,5 h. As soluções de ácido cítrico foram renovadas a cada novo desafio; as amostras foram armazenadas entre os desafios e durante a noite em solução remineralizadora (Ganss et al., 2010). As composições das soluções estão descritas na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Soluções utilizadas durante a ciclagem erosiva

Solução	Fabricante	Composição	pH
Ácido cítrico	Merck (Darmstadt, Alemanha)	Ácido cítrico monohidratado 0,05 M	2,3
Solução remineralizadora	Merck	4,08 mM H ₃ PO ₄ ; 11,90 mM NaHCO ₃ ; 20,10 mM KCl e 1,98 mM CaCl ₂ *	6,7

*Gerrard; Winter, 1986

5.3.6 Análise de perda de superfície

A perda de superfície foi mensurada em perfilômetro óptico (3D Proscan 2100, Scantron). Após a remoção das fitas, uma área central de cada amostra foi escaneada (2 x 1 mm) e imagens foram analisadas de maneira cega com o auxílio de software específico (Proscan Application software v. 2.0.17). A altura média das duas áreas de referência laterais foi calculada e subtraída da altura da área experimental em μm (3-pt step height). As amostras foram mantidas sob umidade relativa até o escaneamento para evitar a desidratação da dentina. Imediatamente antes da análise, o excesso de água foi removido com papel absorvente (Magalhães et al., 2010). As medições foram realizadas após 5 e 10 dias de ciclagem erosiva.

5.3.7 Análise estatística

O teste de ANOVA 2-fatores para medidas repetidas de acordo com o modelo linear geral foi usado para determinar os efeitos do tratamento de superfície e tempos de aplicação (variáveis independentes). A comparação *post-hoc* foi realizada utilizando o teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5% e os procedimentos estatísticos foram executados no programa SPSS 20 (SPSS; Chicago, IL, EUA).

5.4 Resultados

Os resultados da análise de perfilometria estão descritos na tabela 5.3. O teste de ANOVA a 2-fatores para medidas repetidas demonstrou que a perda de superfície foi afetada significativamente pelo tratamento de superfície e ciclagem erosiva ($p = 0,002$). Segundo teste de Tukey, todos os grupos apresentaram perdas de superfície significativamente maiores após 10 dias de desafios ácidos. Após 5 dias, foi observada uma redução significativa para o grupo G7 comparado aos

demais. Por sua vez, o grupo G2 apresentou melhores resultados que o G4, que não diferiu estatisticamente do G1, G5 e G6. Após 10 dias, o G7 não diferiu significativamente do G2. Não foi observada diferença entre G4, G5, G6 e G1. O grupo G3 teve uma performance significativamente inferior quando comparado aos grupos G2, G4, G6 e G7, não tendo diferido de G1 e G5.

Tabela 5.3 – Médias $\pm$ desvios padrões dos valores de perda de superfície obtidos após 5 e 10 dias de ciclagem erosiva após diferentes tratamentos de superfície

Grupo	Dias de ciclagem erosiva	
	5 dias	10 dias
G1: sem tratamento de superfície	18,26 $\pm$ 3,30 CDa	28,37 $\pm$ 3,07 BCb
G2: solução de AmF/NaF/SnCl₂	14,07 $\pm$ 1,07 Ba	18,39 $\pm$ 1,46 Ab
G3: gel placebo	20,60 $\pm$ 1,01 Da	30,12 $\pm$ 4,58 Cb
G4: Solução de TiF₄ a 1%	17,36 $\pm$ 2,38 Ca	26,58 $\pm$ 2,18 Bb
G5: Gel de TiF₄ a 1%	19,07 $\pm$ 2,17 CDa	28,81 $\pm$ 2,63 BCb
G6: Solução de TiF₄ a 4%	18,44 $\pm$ 1,04 CDa	26,41 $\pm$ 1,22 Bb
G7: Gel de TiF₄ a 4%	9,80 $\pm$ 2,37 Aa	19,71 $\pm$ 2,19 Ab

Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas dentro da mesma coluna. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas dentro da mesma linha.

5.5 Discussão

Este estudo visou determinar se diferentes concentrações e veículos do TiF₄ podem prevenir a erosão da dentina, uma vez que recentes estudos de prevalência tem demonstrado uma aumento deste tipo de lesões em todas as idades (Barbour; Rees, 2006; Jaeggi; Lussi, 2006; El Aidi et al., 2010; Bartlett et al., 2013). Os presentes resultados demonstraram que os tratamentos não conseguiram prevenir a erosão, no entanto, o gel de TiF₄ foi capaz de reduzir a perda de superfície e pode

ser considerado como uma alternativa de tratamento para controlar as lesões de erosão.

Quando comparamos diferentes concentrações do gel de TiF_4 , os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com os de estudos anteriores, nos quais compostos contendo 4% de TiF_4 apresentaram melhores resultados que concentrações menores, revelando um potencial para 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).

Contrariamente aos géis, ambas as soluções de TiF_4 testadas foram ineficientes em reduzir a progressão da erosão, possivelmente devido a sua mais baixa substantividade e consequente menor retenção na superfície, quando comparado a um gel (Ganss et al., 2012). Especula-se que o período de contato entre superfície dental e fluoreto possa ter sido insuficiente para que os íons titânio se ligassem ao oxigênio – derivado das moléculas de água ou fosfato (Tveit et al., 1988) – e/ou à própria matriz orgânica (Mundorff et al., 1972), comprometendo a formação do *glaze*. Esta camada, formada por TiO_2 ou complexos organometálicos, é ácido-resistente e responsável por reduzir a dissolução dos tecidos dentais quando expostos a desafios ácidos (Wiegand et al., 2010b). Sua ausência pode ter causado o fracasso do tratamento com as soluções de TiF_4 .

Duas outras explicações para a ineficiência das soluções de TiF_4 testadas neste estudo são possíveis: o tempo de aplicação, que foi de 1 min para as soluções *versus* os 4 min utilizados para a aplicação dos géis, e a forma de aplicação, a qual foi ativa para géis e passiva para as soluções. A aplicação ativa combinada com períodos de aplicação mais longos, entre 2 e 4 min, podem aumentar a incorporação de F^- (Skartveit et al., 1989), uma vez que pode causar uma desmineralização parcial, possivelmente favorecendo a penetração tanto de fluoreto quanto de titânio (Skartveit et al., 1991). Embora as formas de aplicação não tenham sido similares para todos os grupos, os protocolos empregados foram baseados em investigações prévias que utilizaram diferentes soluções e géis para a prevenção da erosão (Vieira et al., 2005; Wiegand et al., 2009; Wiegand et al., 2010a; Lepri et al., 2013; Lepri et al., 2015).

Além disso, deve ser mantido em mente que a solução usada como controle positivo (Elmex Erosion) foi aplicada diariamente nas superfícies dentais, como recomendado pelo fabricante, enquanto as soluções de TiF_4 foram aplicadas apenas

uma vez (antes do início da ciclagem erosiva). As soluções de TiF_4 foram aplicadas apenas uma vez devido ao seu pH, que não foi ajustado, já que este fluoreto forma mais precipitados na superfície dental e reduz de maneira mais eficiente a desmineralização em baixos valores de pH (Wiegand et al., 2009). Consequentemente, a sua acidez contraindica sua utilização como colutório, e aplicações diárias em consultório comprometeriam a viabilidade do tratamento.

Como esperado, o grupo controle positivo (solução de AmF/NaF/SnCl_2) revelou potencial em reduzir a perda de superfície em dentina, provavelmente devido à deposição de uma camada amorfa relativamente ácido-resistente (Hove et al., 2006; Schlueter et al., 2009b) e rica em sais de estanho (Sn) sobre a superfície dental. Após 5 dias de desafios erosivos, entretanto, o grupo tratado com o gel de TiF_4 a 4% demonstrou a melhor performance entre os grupos testados, alcançando melhores resultados que o controle positivo, considerado o tratamento “padrão-ouro” para erosão (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009b; Ganss et al., 2010; Rakhmatullina et al., 2013). Isto pode ser considerado um resultado positivo, uma vez que aplicações em consultório não dependem da cooperação do paciente. Embora a contribuição do paciente em modificar seus hábitos, que podem acelerar a progressão da erosão, seja essencial para o sucesso do tratamento (Lussi et al., 1993; Zero, 1996), produtos que possam controlar a perda de superfície com mais eficiência são desejáveis.

Estudos futuros devem focar na determinação da exata duração do tratamento com aplicação única de TiF_4 pela realização de um maior número de ciclos erosivos. Adicionalmente, poderia ser interessante fazer a reaplicação do gel de TiF_4 a 4% após 5 dias de desafios erosivos, considerando o aumento na perda de superfície demonstrada neste estudo após 10 dias. Caso uma segunda aplicação tivesse sido realizada, a perda observada poderia ter sido menor do que aquela apresentada pelo padrão-ouro (solução de AmF/NaF/SnCl_2), que – mesmo com uso diário – apresentou perda constante e progressiva.

5.6 Conclusão

Embora não tenham prevenido a erosão, o gel de TiF_4 a 4% (aplicação única) e a solução de $\text{AmF}/\text{NaF}/\text{SnCl}_2$ (aplicação diária) reduziram a perda de superfície causada pelo ácido cítrico.

5.7 Referências

- Barbour ME, Rees GD. The role of erosion, abrasion and attrition in tooth wear. *J Clin Dent*. 2006;17(4):88-93.
- Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. *J Dent*. 2013 Nov;41(11):1007-13.
- Büyükyılmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci*. 1997 Oct;105(5 Pt 2):473-7.
- Comar LP, Souza BM, Grizzo LT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Evaluation of fluoride release from experimental TiF_4 and NaF varnishes *in vitro*. *J Appl Oral Sci*. 2014 Abr;22(2):138-43.
- El Aidi H, Bronkhorst EM, Huymans MCDNJM, Truin GJ. Dynamics of tooth erosion in adolescents: A 3-year longitudinal study. *J Dent*. 2010 Feb;38(2):131-7.
- Ganss C, Klimek J, Schwarz N. A comparative profilometric *in vitro* study of the susceptibility of polished and natural human enamel and dentine surfaces to erosive demineralisation. *Arch Oral Biol*. 2000 Oct;45(10):897-902.
- Ganss C, Klimek J, Schäffer U, Spall T. Effectiveness of two fluoridation measures on erosion progression in human enamel and dentine *in vitro*. *Caries Res*. 2001 Set-Oct;35(5):325-30.

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

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion *in vitro*: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. Caries Res. 2008;42(1):2-7.

Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. Caries Res. 2010;44(3):248-52.

Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized *in situ* trial on erosion. J Dent Res. 2010 Nov;89(11):1214-8.

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 Dez;25(6):351-64.

Gerrard WA, Winter PJ. Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel *in vitro*. Caries Res. 1986;20(3):209-16.

Hals E, Tveit AB, Tøtdal B, Isrenn R. Effect of NaF, TiF₄ and APF solutions on root surfaces *in vitro*, with special reference to uptake of F. Caries Res. 1981;15(6):468-76.

Hove L, Holme B, Øgaard B, Willumsen T, Tveit AB. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF on erosion of enamel by hydrochloric acid *in vitro* measured by white light interferometry. Caries Res. 2006;40(5):440-3.

Hove LH, Holme B, Young A, Tveit AB. The protective effect of TiF₄, SnF₂ and NaF against erosion-like lesions *in situ*. Caries Res. 2008;42(1):68-72.

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

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SAM. Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO₂ laser. Laser MedSci. 2013 Jan;28(1):235-40.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SA. *In situ* investigation of the effect of TiF₄ and CO₂ laser irradiation on the permeability of eroded enamel. Arch Oral Biol. 2015 Jun;60(6):941-7.

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 Maio;18(4):1097-102.

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

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 Jan-Fev;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 Fev;38(2):153-7.

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

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous and fluoride containing rinsing solutions. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2013;123(3):192-8.

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

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(2):141-5.

Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel *in vitro*. Caries Res. 2009a;43(1):10-6.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine *in situ*. Caries Res. 2009b;43(6):415-21.

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. 1989 Feb;47(1):25-30.

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 Jun; 49(3):183-90.

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, 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 Maio;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 Dez;96(6):536-40.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion *in vitro*. Caries Res. 2005 Set-Out;39(5):371-9.

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

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. 2008 Jun;53(6):497-502.

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 Ago;54(8):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 Mar;55(3):223-8.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF_4) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the the literature. Oral Health Prev Dent. 2010b;8(2):159-64.

Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of various fluoride solutions on enamel erosion *in vitro*. Caries Res. 2010;44(4):390-401.

Zero DT. Etiology of dental erosion – extrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996 Apr;104(2 Pt 2):162-77.

6 CAPÍTULO III

Proteção contra erosão conferida por diferentes géis fluoretados em dentina.

6.1 Resumo

Este estudo buscou avaliar os efeitos protetores de géis fluoretados com diferentes concentrações de fluoreto e pH sobre a dentina erodida. Oitenta fragmentos de dentina humana previamente erodidos foram aleatoriamente divididos em 8 grupos de acordo com o tratamento de superfície (n=10): G1 – controle negativo (sem tratamento); G2 – gel placebo (H_2O + espessante); G3 – controle positivo (gel de NaF a 2%, pH 7,0); G4 – gel de NaF a 2% (pH 1,5); G5 – gel de NaF a 5,42% (pH 7,0); G6 – gel de NaF a 5,42% (pH 1,5); G7 – gel de TiF_4 a 4% (pH 1,5) e G8 – gel de TiF_4 a 4% (pH 7,0). Após os tratamentos, as amostras foram submetidas a 10 dias de ciclagem erosiva por alternância de imersões em ácido cítrico (0,05 M, pH 2,3, 2 min, 6x/dia) e solução remineralizadora. Após a formação das lesões de erosão iniciais, aplicação dos géis, 5 e 10 dias de ciclagem foram realizadas análises perfilométricas (perda de superfície). Após a aplicação dos géis, foi observado que G4 e G6 mais que dobraram a perda de superfície e, por este motivo, estes grupos foram excluídos da ciclagem erosiva. O teste de ANOVA 2-fatores para medidas repetidas revelou diferença estatística entre *tratamentos de superfície*, *tempos* e na interação *tratamentos de superfície x tempos* ($p < 0,05$). De acordo com teste de Tukey, após os tratamentos, o único grupo que apresentou aumento na perda de superfície foi o G7, entretanto este não se diferenciou estatisticamente do G1. Após 5 dias, os grupos G5, G7 e G8 diferiram estatisticamente de G1, enquanto após 10 dias, G7 apresentou os menores valores de perda de superfície, apresentando diferença estatística quando comparado aos grupos G1, G2 e G3. Os produtos fluoretados foram capazes de reduzir a progressão da erosão em dentina e tanto concentração quando pH podem influenciar seus potenciais.

6.2 Introdução

A erosão dental é um processo químico caracterizado pela dissolução crônica e patológica dos tecidos duros dentais, devido a sua exposição a uma variedade de ácidos de origem não-bacteriana (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011), que podem ser originados intrínseca ou extrinsecamente. Ácidos intrínsecos são essencialmente representados pelo ácido hidrocloreídrico presente no suco gástrico, enquanto que aqueles de origem extrínseca são principalmente derivados de alimentos e bebidas ácidos (Ganss et al., 2012).

A perda erosiva pode levar à perda irreversível do esmalte e exposição da dentina (Lussi et al., 2011). Clinicamente, a exposição dos túbulos dentinários pode causar hipersensibilidade dentinária (West, 2008) e perda de anatomia dental e dimensão vertical (Schlueter et al., 2012), resultando em problemas estéticos e/ou funcionais.

Há evidências que produtos fluoretados convencionais têm pequena efetividade em controlar lesões de erosão (Vieira et al., 2005; Schlueter et al., 2007; Wiegand et al., 2010a). Mesmo considerando a precipitação de minerais similares ao fluoreto de cálcio (CaF_2 -like) sobre a superfície erodida após aplicação dos fluoretos (Wahengbam et al., 2011), a barreira física formada é altamente solúvel e pode ser rapidamente degradada na cavidade bucal. De forma a aumentar a proteção conferida após tratamentos com fluoretos, compostos contendo cátions metálicos polivalentes, como o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), têm sido investigados. Estes compostos podem levar à formação de uma camada ácido-resistente (Mundorff et al., 1972), conhecida como *glaze*, que é capaz de aderir fortemente sobre a superfície dental (Sen; Büyükyilmaz, 1998). Esta age como uma barreira de difusão e funciona como um reservatório de íons fluoreto, retardando a dissolução dos tecidos dentais quando submetidos a desafios ácidos (Wiegand et al., 2010a).

Sabe-se que a solução de TiF_4 , em condições de baixos pHs (pH 1,2), apresenta resultados promissores quanto à formação de precipitados sobre a superfície dental e redução da desmineralização (Wiegand et al., 2009; Wiegand et al., 2010b). Entretanto, esta acidez contraindica a aplicação caseira regular do TiF_4 pelo paciente (Hjortsjö et al., 2014), já que seu pH original (pH 1,2) poderia ser prejudicial à saúde dos tecidos moles, caso fosse utilizado como colutório. Neste

sentido, aplicações controladas pelos cirurgiões-dentistas seriam a melhor alternativa, e portanto, géis (Vieira et al., 2005; Lepri et al., 2015) e vernizes (Magalhães et al., 2010) têm sido testados, uma vez que podem influenciar positivamente a manutenção do efeito do fluoreto. A alta viscosidade destes veículos permite a aplicação localizada e precisa do fluoreto, além de mantê-lo na superfície dental por um período maior, prolongando seu contato com os dentes quando comparado a soluções (Ganss et al., 2012).

A acidez inerente ao produto pode causar desmineralização parcial da superfície tratada (Skartveit et al., 1991), favorecendo a penetração do fluoreto no tecido mineralizado (Skartveit et al., 1989). Esta penetração pode contribuir para a proteção da erosão já promovida pela camada de *glaze*; entretanto, também pode causar um aumento na perda de superfície, especialmente quando associado com tempos de aplicação prolongados, que têm sido recomendados a fim de promover maior retenção de F^- (Skartveit et al., 1989) e proteção à superfície da dentina (Wiegand et al., 2008).

A combinação de um pH ácido e uma alta concentração de fluoreto poderia ser responsável pelo sucesso na proteção contra erosão apresentada pelo TiF_4 , já que o mecanismo de desmineralização superficial/ penetração de F^- poderia aumentar a formação de compostos *CaF₂-like* e criar uma barreira física mais espessa. No entanto, ainda não foi definido se isto também melhoraria os resultados obtidos pelos tratamentos com fluoretos não-metálicos após exposição a desafios ácidos. Neste sentido, este estudo foi delineado para contribuir com a elucidação dos efeitos de diferentes géis fluoretados na dentina humana submetida à erosão.

6.3. Materiais e Métodos

6.3.1 Aspectos éticos

Um total de 50 terceiros molares foram usados nesta pesquisa, após concordância do Comitê de Ética local (Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Odontologia/ Universidade de São Paulo) (nº 1.121.852 – Anexo B) e de acordo

com a Declaração de Helsinki. Termos de consentimento livre e esclarecido não foram necessários já que os dentes foram obtidos do Banco de Dentes Humanos da mesma instituição.

6.3.2 Delineamento experimental

Durante o presente estudo, 80 fragmentos de dentina radicular humana previamente erodidos foram usados. O efeito da utilização dos géis de tetrafluoreto de titânio (TiF_4) e fluoreto de sódio (NaF) na progressão da erosão foi avaliado. Após a aplicação dos tratamentos na dentina previamente erodida, procedeu-se com a ciclagem erosiva e a perda de superfície foi mensurada após a aplicação dos géis, 5 e 10 dias de ciclagem. Os fatores em estudo foram “tratamento de superfície” em oito níveis ($n=10$): controle negativo; placebo (água + espessante); controle positivo (NaF a 2% com pH 7,0); NaF a 2% com pH 1,5; NaF a 5,42% com pH 7,0; NaF a 5,42% com pH 1,5; TiF_4 a 4% com pH 1,5 e TiF_4 a 4% com pH 7,0 – e “tempos” em quatro níveis: lesão inicial, após aplicação dos géis e após 5 e 10 dias de ciclagem erosiva. A variável resposta foi a perda de superfície, mensurada em perfilômetro óptico.

6.3.3 Preparo das amostras

Os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1% (4 °C) por um período máximo de 3 meses após a extração. Estes foram limpos, polidos com pedra-pomes e água em baixa rotação e lavados em água destilada. Fragmentos de dentina radicular (4,0 x 4,0 x 2,0 mm) foram obtidos em máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) e incluídos em resina acrílica. As amostras tiveram suas superfícies polidas (Ecomet / Automet 250 grinder-polisher, Buehler Ltda.) com lixas de polimento (Buehler Ltda.). Entre cada série e após o polimento final, as amostras foram lavadas em água destilada por 3 min em cuba ultrassônica.

6.3.4 Seleção das amostras de dentina

Todas as amostras foram observadas em Lupa Estereoscópica (40x) – a fim de verificar a existência de defeitos na dentina – e, então, submetidas à teste de microdureza de superfície (HMV-2000, Shimadzu). Três endentações foram realizadas no centro de cada amostra, com 50 μm de distância entre elas, com penetrador Knoop (10 g por 10 s) (Turssi et al., 2010). As amostras com médias de microdureza de superfície discrepantes foram excluídas e as demais foram analisadas em perfilômetro óptico (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido). As amostras que apresentaram valores de curvatura de superfície acima de 0,3 μm foram descartadas (Eisenburger et al., 2003). Dentre as amostras aprovadas, 80 foram selecionadas aleatoriamente e incluídas neste estudo (médias de dureza = $75,98 \pm 1,86 \text{ kg/mm}^2$ e curvatura = $0,14 \pm 0,09$).

6.3.5 Análise perfilométrica

As análises perfilométricas foram realizadas em perfilômetro 3D (PROSCAN 2100 3D, Scantron). A primeira medição foi feita apenas para determinação da curvatura de superfície (usada para seleção das amostras). Durante as leituras subsequentes, realizadas nos diferentes tempos experimentais, as áreas laterais das superfícies das amostras foram protegidas por duas tiras de fita adesiva UPVC de forma a deixar uma área central exposta de aproximadamente 3,0 x 1,0 mm (Turssi et al., 2014) e manter regiões de dentina hígida para serem utilizadas como áreas de referência para cálculo da perda de superfície.

Durante todos os escaneamentos, o sensor foi programado para percorrer uma área central de 2,0 mm no eixo-X por 1,0 mm no eixo-Y (duração da leitura: 28 s). O equipamento executou 200 passos (0,01 mm) no eixo-X e 10 passos (0,1 mm) no eixo-Y e a perda de superfície foi calculada por um software específico (ProscanApplication software version 2.0.17) (Hara et al., 2013; Scaramucci et al., 2016). As amostras foram mantidas úmidas até o momento da leitura para evitar

desidratação. Imediatamente antes da realização da análise, o excesso de água foi removido com papel absorvente (Magalhães et al., 2010).

6.3.6 Formação das lesões de erosão iniciais

Após o posicionamento das fitas de UPVC, todas as amostras foram imersas em solução de ácido cítrico a 0,05 M (pH 2,3) (Ácido cítrico monohidratado, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) (Ganss et al., 2010a), em temperatura ambiente, sob constante agitação (35 rpm), por 20 min. Então, as amostras foram lavadas em água destilada por 30 s e armazenadas em umidade relativa a 4 °C. Após o processo da formação das lesões iniciais, a primeira avaliação da perda de superfície em perfilômetro óptico foi realizada para confirmar a homogeneidade das lesões formadas.

6.3.7 Grupos experimentais

As amostras previamente erodidas foram divididas aleatoriamente em oito grupos experimentais de acordo com o tratamento de superfície a ser aplicado (n=10) como descrito na tabela 6.1. Todos os géis, fluoretados ou não, foram preparados pela pesquisadora logo antes de suas aplicações. Os géis dos grupos G4 e G6 tiveram os valores de pH ajustados pela adição de ácido hidrocloreídrico, enquanto o pH do grupo G8 foi ajustado pela adição de hidróxido de sódio.

Em todos os grupos experimentais, apenas uma aplicação do gel foi realizada para simular a viabilidade clínica do tratamento. Para cada amostra, um volume de 20 µl de gel foi padronizado. As aplicações foram realizadas com o auxílio de pincéis descartáveis (Brush Fine, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), que foram substituídos para cada nova amostra, com movimentos intermitentes na superfície durante 4 min (Skartveit et al., 1989; Wiegand et al., 2008). Após este período, cada amostra teve o excesso de gel removido com uma gaze. As aplicações foram realizadas pela pesquisadora responsável. Então, todas as amostras foram submetidas a uma segunda análise de perda de superfície em perfilômetro óptico. Neste tempo de

avaliação, pode ser observado que os tratamentos dos grupos G4 e G6 mais que dobraram os valores de perda de superfície ($26,87 \pm 9,00$ e $8,29 \pm 6,39$, respectivamente). Portanto, ambos os grupos foram excluídos da ciclagem erosiva, já que estes resultados contraindicariam sua utilização para controlar a erosão dental.

Tabela 6.1 – Grupos experimentais

Grupos	Agente ativo	pH	Concentração do composto fluoretado (%)	ppm F	Composição
G1	-	7,0	0	0	Água destilada (AD)
G2	-	6,3	-	0	Carboximetilcelulose (CMC) + AD
G3	NaF	7,0	2,0	9.051	Fluoreto de sódio (NaF) + CMC + AD
G4	NaF	1,5	2,0	9.051	NaF + CMC + AD
G5	NaF	7,0	5,42	24.523	NaF + CMC + AD
G6	NaF	1,5	5,42	24.523	NaF + CMC + AD
G7	TiF ₄	1,5	4,0 *	24.530	Tetrafluoreto de titânio (TiF ₄) + CMC + AD
G8	TiF ₄	7,0	4,0	24.530	TiF ₄ + CMC + AD

* Büyükyilmaz et al. (1997), Vieira et al. (2005) e Mantilla et al. (2017)

6.3.8 Ciclagem erosiva

As amostras foram fixadas com cera pegajosa em tampas de placas de 12 poços para cultura de células, de forma a permitir imersões individualizadas nas soluções. Por um período de 10 dias, as amostras foram imersas 6x/dia em solução

de ácido cítrico (ácido cítrico monohidratado a 0,05 M (pH 2,3)) por 2 min cada, com intervalos de 1,5 h entre eles, em temperatura ambiente e sob constante agitação em mesa agitadora orbital (35 rpm). As amostras de um mesmo grupo foram imersas simultaneamente em poços separados contendo 5 ml de solução erosiva cada. As soluções de ácido cítrico foram renovadas a cada novo desafio. Após cada imersão, as amostras foram lavadas com água destilada e armazenadas em solução remineralizadora (4,08 mM H_3PO_4 , 11,90 mM NaHCO_3 , 20,10 mM KCl e 1,98 mM CaCl_2 (pH 6,7)) até o próximo desafio. Durante as noites, as amostras também foram mantidas em solução remineralizadora (Ganss et al., 2010a). Após 5 e 10 dias de ciclagem, novas análises de perda de superfície foram realizadas.

6.3.9 Análise estatística

Os dados primeiramente foram submetidas a testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe para determinar a normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente. Os resultados indicaram uma distribuição normal e homogênea dos dados; portanto, testes paramétricos foram selecionados. As análises foram realizadas por meio dos testes de ANOVA 2-fatores para medidas repetidas seguido de *post-hoc* de Tukey. Os níveis de significância foram mantidos em 5% e os cálculos estatísticos foram realizados com o auxílio do *software* SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

6.4 Resultados

Após análise dos dados de perda de superfície, o teste de ANOVA 2-fatores para medidas repetidas revelou diferença estatisticamente significativa entre “tratamentos de superfície”, “tempos” e na interação “tratamentos de superfície” x “tempos” ($p < 0,05$). De acordo com teste de Tukey (Tabela 6.2), não houve diferença significativa entre os “tratamentos de superfície” após a formação das lesões de erosão. Para análise do “tempo” imediatamente após aplicação dos géis, nenhum

dos tratamentos diferiu significativamente do grupo controle negativo (G1), entretanto o G7 apresentou maiores valores de perda de superfície quando comparado aos demais grupos tratados com géis, fluoretados ou não. Após 5 dias de ciclagem, os grupos G5, G7 e G8 reduziram significativamente a perda de superfície em relação ao controle negativo, mas não diferiram estatisticamente de G2 e G3. Após 10 dias, o G7 teve os menores valores de perda de superfície, apresentando diferença estatística quando comparado aos grupos G1, G2 e G3.

Considerando a comparação entre “tempos”, apenas o G7 aumentou a perda de superfície após a aplicação dos géis; entretanto, apenas este grupo foi capaz de controlar a progressão da erosão após 5 e 10 dias de ciclagem em relação aos grupos controle.

Tabela 6.2 – Resultados de perda de superfície em μm (média e desvio padrão)

Grupos / Tempos	Lesões de erosão iniciais	Aplicação	5 dias	10 dias
G1	3,44 (0,52) Ca	3,48 (0,60) Cab	10,38 (2,00) Ba	13,75 (2,31) Aa
G2	3,03 (0,57) Ca	2,89 (0,89) Cb	9,06 (1,96) Bab	12,73 (3,20) Aab
G3	3,00 (0,68) Ca	2,65 (0,80) Cb	8,50 (2,66) Bab	11,14 (3,75) Ab
G5	3,05 (0,63) Ca	2,76 (0,74) Cb	7,33 (2,47) Bb	10,46 (3,02) Abc
G7	3,27 (0,65) Ca	5,68 (2,31) Ba	6,88 (2,55) ABb	8,43 (2,62) Ac
G8	3,49 (0,41) Ca	2,89 (0,58) Cb	7,00 (2,25) Bb	10,74 (4,27) Abc

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

***G4 e G6 foram excluídos da análise estatística após determinação da perda de superfície no “tempo” de análise da aplicação dos géis.**

6.5 Discussão

O tetrafluoreto de titânio tem sido estudado na literatura recente (Comar et al., 2015; Magalhães et al., 2016; Medeiros et al., 2016; Mantilla et al., 2017) devido ao

seu particular mecanismo de ação e seu potencial protetor aos tecidos dentais erodidos. Entretanto, diferentes resultados vêm sendo observados e, por este motivo, ainda não foi possível estabelecer um protocolo ideal para aplicação clínica desse produto fluoretado. Baseado em pesquisas prévias que apresentaram resultados satisfatórios após o tratamento com TiF_4 , o presente estudo investigou um gel (Vieira et al., 2005; Lepri et al., 2015) em alta concentração (Mantilla et al., 2017) em seu pH original (Wiegand et al., 2009), que foi aplicado ativamente na superfície da dentina por 4 min (Skartveit et al., 1989).

Sabe-se também, baseado em resultados prévios, que a formulação comercial do gel de NaF não é totalmente eficiente no controle da erosão (Lepri et al., 2013) e atualmente o “padrão-ouro” para o tratamento destas lesões é uma solução contendo AmF/NaF/SnF_2 (Schlueter et al., 2009; Ganss et al., 2010b). Entretanto, no presente estudo, o gel de NaF foi selecionado como controle positivo, uma vez que resultados produzidos por produtos apresentados em diferentes veículos não são comparáveis. Produtos com maiores viscosidades, como géis e vernizes, tendem a permanecer sobre a superfície tratada por períodos mais longos e, conseqüentemente, promover maior proteção contra desafios erosivos (Magalhães et al., 2016; Mantilla et al., 2017). Além disso, os fabricantes recomendam a aplicação diária das soluções, já que o próprio paciente poderia realizar o bochecho. Neste estudo, os géis foram aplicados apenas uma vez, antes do início da ciclagem erosiva, de forma a simular a prática usual executada nos consultórios odontológicos.

Várias formulações do gel de NaF foram usadas nesta pesquisa, de forma a equiparar a concentração de fluoreto (em ppmF) e pH àqueles apresentados pelo gel de TiF_4 testado, buscando evitar possíveis vieses a respeito dos resultados obtidos pelos produtos. Um aumento na concentração de fluoreto na composição do produto poderia promover maior deposição de compostos semelhantes à CaF_2 sobre a superfície tratada (Wiegand; Attin, 2003), enquanto um pH mais baixo poderia favorecer a penetração do F^- no tecido parcialmente desmineralizado (Laufer et al., 1981). Especula-se que este efeito seria esperado até em compostos fluoretados não-metálicos, já que o colágeno exposto aumentaria a área de superfície da dentina e os caminhos de difusão (Buchalla et al., 2007), que poderia promover a retenção de depósitos de CaF_2 , não apenas na dentina peritubular e intertubular, mas também nas regiões intratubulares (Laufer et al., 1981).

Entretanto, observando as análises de perda de superfície após a aplicação dos produtos, nota-se que nenhum dos produtos neutros apresentou qualquer alteração na perda de superfície, mesmo após a aplicação ativa em superfície previamente desmineralizada. Por outro lado, composições ácidas demonstraram um aumento nos valores de perda de superfície. Para ambas as formulações de NaF ácidas, independente da concentração de fluoreto, a perda de superfície mais que dobrou em relação aos valores obtidos após a formação das lesões iniciais, contradizendo a teoria que uma concentração mais elevada de fluoreto associada a um pH ácido poderia aumentar a proteção promovida pela aplicação do produto. Estes resultados mostram que o uso destes produtos não é apropriado para o controle da erosão e eles não deveriam ser aplicados em lesões erosivas.

As amostras do grupo G7 (4% TiF_4 gel, pH 1,5) também foram tratadas com um gel ácido, entretanto, em contraste ao que aconteceu após as aplicações de NaF ácidos, este foi capaz de proteger parcialmente a superfície da dentina da ação do seu próprio pH (Wahengbam et al., 2011), possivelmente devido ao particular mecanismo de ação do TiF_4 . Mesmo apresentando um aumento significativo na perda de superfície após a aplicação do gel, este não foi diferente do grupo controle negativo.

Após 5 dias de ciclagem erosiva, o único grupo capaz de controlar a progressão da erosão foi o G7, ainda que seus resultados não tenham diferido dos grupos tratados com outros géis. As amostras do grupo G3 (NaF a 2% neutro) foram tratadas com o único gel fluoretado que não reduziu a perda de superfície quando comparado ao grupo controle negativo. Especula-se que haja uma dependência entre o efeito do tratamento e a concentração do fluoreto. Uma relação inversamente proporcional entre concentração e perda de superfície foi observada (Wiegand; Attin, 2003).

Analisando os dados obtidos após 10 dias de ciclagem erosiva, apenas o gel de TiF_4 a 4% – em seu pH original – foi capaz de reduzir significativamente a perda de superfície em relação a todos os grupos controle (negativo, placebo e positivo). Estes resultados corroboram com os obtidos por Medeiros et al. (2016), que demonstraram que, após o tratamento da superfície dental com NaF e TiF_4 no mesmo veículo, apenas o TiF_4 foi capaz de formar uma camada que recobria completamente a superfície erodida, mantendo suas propriedades mesmo após desafios erosivos. Pode ser sugerido que, em ambos os estudos, esta proteção

tenha sido causada pela formação do *glaze*, devido a interação entre os íons titânio e o oxigênio e/ou camada orgânica presente na superfície da dentina (Mundorff et al., 1972; Tveit et al., 1988).

Esta camada foi capaz de demonstrar sua ácido-resistência, já que continuou agindo como barreira de difusão, mesmo após sua exposição a severos desafios erosivos (Schlueter et al., 2007). Optou-se por esta ciclagem de forma a simular os hábitos de ingestão de ácidos de pacientes com alto risco para o desenvolvimento de lesões de erosão. Além disso, o gel contendo apenas água e espessante não demonstrou qualquer proteção ao substrato, sugerindo que os efeitos promovidos pela aplicação dos fluoretos foi causada apenas pelo seu agente ativo, sem qualquer proteção adicional conferida pelo filme formado após adsorção do espessante na superfície tratada (Barbour et al., 2005).

Dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que diferentes géis fluoretados tem potencial para reduzir a progressão da erosão em dentina e ambos, concentração de fluoreto e pH, são fatores que influenciam a perda de superfície neste substrato.

6.6 Referências

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. An investigation of some food-approved polymers as agents to inhibit hydroxyapatite dissolution. *Eur J Oral Sci.* 2005 Dez;113(6):457-61.

Buchalla W, Lennon AM, Becker K, Lucke T, Attin T. Smear layer and surface state affect dentin fluoride uptake. *Arch Oral Biol.* 2007 Out;52(10):932-7.

Comar LP, Cardoso CAB, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. TiF_4 and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression *in vitro*. *J Appl Oral Sci.* 2015 Jan-Fev;23(1):14-18.

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 Nov-Dez;37(6):450-5.

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(3):248-52.

Ganss C, Neutard L, Von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized *in situ* trial on erosion. *J Dent Res.* 2010b Nov;89(11):1214-8.

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 Dez;25(6):351-364.

Hara AT, Lippert F, Zero DT. Interplay between experimental dental pellicles and stannous-containing toothpaste on dental erosion-abrasion. *Caries Res.* 2013;47(4):325-9.

Hjortsjö C, Jonski G, Young A, Saxegaard E. Etching effect of acidic fluorides in human tooth enamel *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 2014 Dez;59(12):1328-33.

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

Laufer B, Mayer I, Gedalia I, Deutsch D, Kaufman HW, Tal M. Fluoride-uptake and fluoride-residual of fluoride-treated human root dentine *in vitro* determined by chemical, scanning electron microscopy and x-ray diffraction analyses. *Arch Oral Biol.* 1981;26(3):159-63.

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 Jan;28(1):235-40.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SAM. *In situ* investigation of the effect of TiF₄ and CO₂ laser irradiation on the permeability of eroded enamel. *Arch Oral Biol.* 2015 Jun;60(6):941-7.

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.

Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF_4 and NaF varnishes and solutions on dentin erosion *in vitro*. J Dent. 2010 Fev;38(2):153-7.

Magalhães AC, dos Santos MG, Comar LP, Buzalaf MA, Ganss C, Schlueter N. Effect of a single application of TiF_4 varnish versus daily use of a low-concentrated TiF_4 /NaF solution on tooth erosion prevention *in vitro*. Caries Res. 2016;50(5):462-70.

Mantilla TF, Ramos-Oliveira TM, Silva CV, Cersosimo MCP, Turssi CP, Freitas PM. Effects of different concentration and excipients of titanium tetrafluoride on dentin erosion prevention. Oral Health Prev Dent. 2017;15(5):461-5.

Medeiros MID, Carlo HL, Lacerda-Santos R, Lima BAG, Sousa FB, Rodrigues JA, Carvalho FG. Thickness and nanomechanical properties of protective layer formed by TiF_4 varnish on enamel after erosion. Braz Oral Res. 2016 Ago;30(1):e75.

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

Scaramucci T, João-Souza SH, Lippert F, Eckert GJ, Aoki IV, Hara AT. Influence of toothbrushing on the antierosive effect of film-forming agents. Caries Res. 2016;50(2):104-10.

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(2):141-5.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of an experimental tin-F-containing solution in erosive tissue loss in enamel and dentine *in situ*. Caries Res. 2009;43(6):415-21.

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

Sen BH, Büyükyılmaz T. The effect of 4% titanium tetrafluoride solution on root canal walls - A preliminary investigation. J Endod. 1998 Abr;24(2):239-43.

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. 1989 Fev;47(1):25-30.

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 Jun;49(3):183-90.

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, 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 Maio;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 Dez;96(6):536-40.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion *in vitro*. *Caries Res*. 2005 Set-Out;39(5):371-9.

Wahengbam P, Tikku AP, Lee WB. Role of titanium tetrafluoride (TiF_4) in conservative dentistry: A systematic review. *J Conserv Dent*. 2011 Abr;14(2):98-102.

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

Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. *Oral Health Prev Dent*. 2003;1(4): 245-53.

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*. 2008 Jun;53(6):497-502.

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 Ago;54(8):790-5.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF_4) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. *Oral Health Prev Dent*. 2010a;8(2):159-64.

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. 2010b Mar;55(3):223-8.

7 CAPÍTULO IV

Efeitos causados pela aplicação do gel de TiF_4 sobre a dentina humana responsáveis pela sua proteção contra a erosão *in situ*

7.1 Resumo

O presente estudo avaliou *in situ* o efeito protetor do gel de TiF_4 (4%, pH original) contra a erosão em dentina e, *in vitro*, seu possível mecanismo de ação. Para tanto, 128 fragmentos de dentina radicular humana (3 x 3 x 1 mm) previamente erodidos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=16): controle negativo (C - sem tratamento); placebo (P - água + espessante); controle positivo (NaF - gel de NaF a 2%, pH 7,0) e TiF_4 (TiF_4 - gel de TiF_4 a 4%, pH 1,5). As amostras foram submetidas à ciclagem erosiva *in situ* (ácido cítrico 1%, pH 2,3, 6x/dia, 5 dias) e avaliadas em perfilometria (n=16), microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (n=3). Para avaliação do mecanismo de ação, 24 amostras extras de dentina foram divididas em 3 grupos (n=8) – controle negativo, positivo e TiF_4 – e utilizadas para determinação das concentrações de flúor solúvel em álcali ($\text{CaF}_2\text{-like}$) e ácido (FAp). O ANOVA 1-fator demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a análise de perda de superfície e, de acordo com o teste de Tukey, apenas o grupo TiF_4 foi capaz de reduzir significativamente a perda de superfície em relação aos demais, que não diferiram entre si. Considerando as análises de concentrações de flúor, o TiF_4 apresentou formação estatisticamente maior de $\text{CaF}_2\text{-like}$ que o NaF, enquanto que não houve diferença entre estes grupos para a concentração de FAp. O grupo controle negativo apresentou as menores concentrações de $\text{CaF}_2\text{-like}$ e FAp. Conclui-se que o gel de TiF_4 (4%, pH original) é eficaz em reduzir a progressão da erosão, mesmo após ciclagem erosiva *in situ* e sua proteção é conferida pela formação do *glaze*, somado à camada de CaF_2 , sobre a superfície dental.

7.2 Introdução

Há anos os produtos fluoretados são utilizados no tratamento de pacientes que apresentam a doença cárie (Rolla, 1988; Oh et al., 2017) e sua eficácia em prevenir o aparecimento de novas lesões deste tipo já foi comprovada clinicamente (Tickle et al., 2017; Wagner; Heinrich-Weltzien, 2017). Desta forma, há a manutenção prolongada dos elementos dentais que, se mantém susceptíveis a ação de ácidos presentes nas dietas atuais. Consequentemente, a união destes fatores pode impactar no aumento da prevalência da erosão dental (Jaeggi; Lussi, 2014; Salas et al., 2015).

A ação dos fluoretos convencionais no processo de demineralização/remineralização que ocorre na lesão de cárie (Rolla, 1988), não se aplica no controle da erosão, uma vez que esta envolve perda irreversível de tecido duro dental pela ação de ácidos de origem não-bacteriana (Schlueter et al., 2012). Ainda assim, estudos investigam a ação destes produtos na progressão da erosão, uma vez que a disponibilidade de F^- na cavidade bucal permite a deposição de compostos semelhantes à CaF_2 sobre a superfície dental (Gerth et al., 2007). Esta camada pode agir como uma barreira física sobre o tecido dental e impedir, momentaneamente, o contato entre os dentes e os ácidos (Wiegand et al., 2010). Entretanto, esta camada apresenta alta solubilidade (McCann, 1968; Ganss et al., 2007) e, por este motivo, sua ação protetora é limitada.

Visando a formação de camadas mais ácido-resistentes, pesquisas recentes têm testado compostos fluoretados contendo cátions metálicos polivalentes, como o tetrafluoreto de titânio (Comar et al., 2015; Magalhães et al., 2016; Medeiros et al., 2016; Mantilla et al., 2017a). O íon titânio é capaz de se unir ao tecido dental (Mundorff et al., 1972), originando uma camada tipo *glaze* sobre a superfície (Hjörtsjö et al., 2015), capaz de funcionar como uma barreira de difusão, protegendo-a contra desafios erosivos (Wiegand et al., 2010).

No entanto, a literatura atual ainda apresenta resultados controversos quanto aos seus efeitos na progressão das lesões erosivas. Possivelmente, esta variação nos resultados se deve aos diferentes protocolos aplicados nos estudos, que são influenciados por fatores como concentração, pH, veículo e tempo de aplicação. Sabe-se que produtos apresentados em veículos com maiores viscosidades, como

géis e vernizes (Levy et al., 2014; Mantilla et al., 2017a), com concentrações de fluoreto mais altas (Laufer et al., 1981; Büyükyilmaz et al., 1997; Mantilla et al., 2017a), em seu pH original (Wiegand et al., 2009) e aplicados por tempo mais longos (Skartveit et al., 1989) apresentam resultados positivos frente a desafios erosivos *in vitro*. Entretanto, faz-se necessária a comprovação destes sob a ação dos fatores modificadores presentes na cavidade bucal, antes que sua utilização clínica possa ser indicada.

Além disso, também é importante a determinação dos aspectos responsáveis pela ação causada pela aplicação do TiF_4 sobre a superfície dental, de forma a buscar a potencialização destes efeitos e alcançar a máxima proteção possível frente a desafios ácidos.

Desta forma, o presente estudo *in situ* teve como objetivos verificar a manutenção dos efeitos protetores promovidos pelo gel de TiF_4 a 4%, em seu pH original, e auxiliar na elucidação dos motivos capazes de viabilizar estes resultados.

7.3 Materiais e Métodos

7.3.1 Delineamento experimental

O presente estudo *in situ* envolveu um modelo de delineamento *crossover*, em blocos (voluntário), e foi realizado em 4 períodos de 5 dias, durante os quais 16 voluntários utilizaram dispositivos intra-bucais contendo amostras de dentina humana. Todas as amostras foram erodidas *in vitro* previamente ao início da fase *in situ* e, nesta, foram submetidas à 5 dias de ciclagens erosivas. O fator em estudo foi o tratamento superficial da dentina humana, em quatro níveis: controle negativo (sem tratamento); placebo; controle positivo (NaF 2% - pH 7,0) e TiF_4 4% (pH 1,5). A variável de resposta foi a perda de tecido mineral (em μm) mensurada em perfilometria óptica. Adicionalmente, 3 amostras foram selecionadas aleatoriamente para determinação das alterações causadas na morfologia superficial e na composição de superfície após os tratamentos, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), respectivamente.

O estudo contou ainda com uma etapa *in vitro*, na qual 24 amostras de dentina humana foram divididas aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=8): controle negativo, controle positivo (NaF 2% - pH 7,0) e TiF₄ 4% (pH 1,5). Após os tratamentos, foram realizadas as determinações indiretas dos conteúdos de flúor na superfície da dentina pela análise de íons solúveis em álcali e em ácido.

7.3.2 Preparo e seleção das amostras

Foram utilizados 85 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 (Parecer nº 1.121.871 – Anexo C).

Cento e setenta fragmentos de dentina radicular (3,0 x 3,0 x 1,0 mm) foram obtidos utilizando uma máquina de corte de alta precisão (Isomet 1000, Buehler Ltda.) e tanto a superfície interna quanto a externa de cada amostra foram polidas (Ecomet/Automet 250 grinder-polisher, Buehler Ltda.) com lixas de óxido de alumínio (Buehler Ltda.). Entre cada série de polimento e após o polimento final, as amostras foram lavadas em cuba ultrassônica com água deionizada por 3 min.

Todas as amostras foram observadas em Lupa Estereoscópica (40x) - para verificar a existência de defeitos na dentina e, então, submetidas à análise perfilométrica (PROSCAN 2100 3D, Scantron). As amostras que apresentaram valores de curvatura de superfície acima de 0,3 µm foram descartadas (Eisenburger et al., 2003). Das amostras aprovadas, 128 foram selecionadas aleatoriamente para a etapa *in situ*. Das demais, 12 foram destinadas à análise em microscopia eletrônica de varredura e 24 para o teste de reatividade de F⁻ *in vitro*.

7.3.3 Etapa *in situ*

7.3.3.1 Formação das lesões de erosão iniciais *in vitro*

Duas tiras de fita adesiva (UPVC) foram posicionadas na superfície de trabalho de cada amostra, deixando exposta uma janela central de aproximadamente 3,0 x 1,0 mm (Turssi et al., 2014). Todas as amostras foram submetidas à imersão em solução de ácido cítrico a 0,05 M (pH 2,3) (ácido cítrico mono-hidratado, Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) (Ganss et al., 2010), à temperatura ambiente, sob constante agitação (35 rpm), durante 20 min. Em seguida, as amostras foram lavadas em água deionizada por 30 s e novamente armazenadas em umidade relativa na geladeira a 4 °C. Ao final do processo de formação das lesões de erosão iniciais, foi realizada nova leitura em perfilômetro óptico para confirmação da homogeneidade das lesões formadas.

7.3.3.2 Esterilização das amostras e distribuição nos grupos experimentais

Todas as amostras desta etapa foram esterilizadas com radiação gama (Irradiador de Cobalto-60 – dose: 25 kGy) (Wegehaupt et al., 2012). Em seguida, as 128 amostras (16 voluntários x 4 grupos x duplicata), previamente erodidas (*in vitro*) foram divididas aleatoriamente em 4 grupos: C - grupo controle negativo; P - grupo placebo; NaF - grupo controle positivo e TiF₄ - grupo TiF₄ (tabela 7.1).

Tabela 7.1 – Grupos experimentais

Grupo	Agente ativo	pH	Concentração do composto fluoretado (%)	ppm F	Composição
C	-	7,0	-	0	Água destilada (AD)
P	-	6,3	-	0	Carboximetilcelulose (CMC) + AD
NaF	NaF	7,0	2,0	9051	Fluoreto de sódio (NaF) + CMC + AD
TiF₄	TiF ₄	1,5*	4,0**	24530	Tetrafluoreto de titânio (TiF ₄) + CMC + AD

* Wiegand et al. (2009)

** Büyükyılmaz et al. (1997), Mantilla et al. (2017a)

7.3.3.3 Seleção dos voluntários

O cálculo amostral foi realizado e sugeriu que, para um tamanho de efeito mínimo de 0,4 e nível de significância 0,05, seriam necessários 12 voluntários para um poder de teste de 85%. Considerando possíveis intercorrências, 16 voluntários foram selecionados para participar da fase *in situ* (n=16) seguindo os seguintes critérios:

- Inclusão: possuir boa saúde bucal (sem a presença de placa bacteriana visível, cavidades, gengivite ou doença periodontal); possuir fluxo salivar não-estimulado $\geq 0,2$ ml/min (Bardow et al., 2001) e estimulado $\geq 1,0$ ml/min (Scaramucci et al., 2012); residir na área urbana do município de São Paulo
- Exclusão: apresentar patologias sistêmicas, dispositivo ortodôntico e/ou doença do refluxo gastro-esofágico; fazer uso sistemático de tabaco e bebidas alcoólicas; estar grávida ou amamentando

7.3.3.4 Preparo do dispositivo intra-oral

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os participantes tiveram suas arcadas inferiores moldadas e sobre os modelos de gesso (Herostone®, Vigodent) obtidos foram confeccionados dispositivos intra-orais inferiores em resina acrílica. Os dispositivos foram posicionados nas regiões de pré-molares e molares (Seong et al., 2013) e continham nichos (4,0 x 4,0 x 2,0 mm) para inserção das amostras.

Duas amostras foram fixadas em cada dispositivo de cada voluntário com auxílio de cera pegajosa (Asfer Indústria Química Ltda.). 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.

Após a fixação das amostras, procedeu-se a aplicação dos tratamentos nas mesmas. A manipulação de todos os géis foi realizada pela pesquisadora responsável. Antes do início dos procedimentos *in situ*, 20 μ l do gel correspondente

a cada grupo foi aplicado sobre cada amostra com o auxílio de pincéis descartáveis. Durante 4 min, foram realizados movimentos intermitentes sobre o gel. Então, o excesso de gel fluoretado foi removido com gaze estéril e, após 1 h, procedeu-se à lavagem das amostras com água deionizada (15 s), simulando a recomendação dos fabricantes dos géis de NaF a 2% comercializados. Todas as aplicações foram realizadas de maneira cega.

7.3.3.5 Divisão dos voluntários nas fases

Para caracterizar o desenho *crossover*, a etapa *in situ* foi dividida em 4 fases. Em cada fase, os 16 voluntários foram separados aleatoriamente em quatro grupos de quatro participantes cada (A, B, C e D) e receberam amostras de diferentes grupos experimentais (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 – Divisão dos grupos experimentais por grupo de voluntários em cada fase

Fase	Grupo de voluntários A	Grupo de voluntários B	Grupo de voluntários C	Grupo de voluntários D
1	C	P	NaF	TiF ₄
2	P	NaF	TiF ₄	C
3	NaF	TiF ₄	C	P
4	TiF ₄	C	P	NaF

7.3.3.6 Procedimentos intra-bucais

Dois dias antes (Turssi et al., 2014) e durante toda a etapa *in situ*, inclusive nos períodos de 9 dias de *wash-out* entre as fases, os voluntários fizeram sua higiene dental, sem os dispositivos, com dentífrico fluoretado (Colgate Máxima

Proteção Anti-Cáries[®] com 1.500 ppm F⁻), escova de dentes e fio dental fornecidos pela pesquisadora.

Todos os dias durante as fases *in situ*, os dispositivos foram inseridos nas cavidades bucais dos participantes da pesquisa 2 h antes do 1º desafio erosivo para formação de película adquirida (Comar et al., 2015; Wiegand et al., 2008). Após este período, foram realizadas 6 imersões extra-orais ao dia (2 min cada), com intervalos de 1,5 h entre elas, em 20 ml de ácido cítrico a 1% (pH 2,3) durante 5 dias (João-Souza et al., 2017). O excesso de ácido foi vertido sobre papel absorvente e o dispositivo intraroal, reinserido na boca.

A solução desmineralizadora foi renovada após cada imersão e teve seu pH monitorado. Após as refeições, ingestão de bebidas e higiene oral, os participantes foram orientados a aguardar 15 min para reinserção do dispositivo na boca (Schlueter et al., 2014). Os dispositivos eram armazenados em gaze umedecida com água destilada (fornecida pela pesquisadora responsável) durante a noite e refeições. Os participantes foram treinados em relação aos procedimentos a serem realizados durante a ciclagem diária e também receberam o protocolo escrito.

7.3.3.7 Análise perfilométrica

Ao final das fases *in situ*, as amostras foram removidas dos dispositivos intra-orais e analisadas em perfilômetro 3D (PROSCAN 2100 3D, Scantron, Taunton, Reino Unido), para determinação da perda de superfície (em μm). Para tanto, após a remoção das fitas adesivas, o sensor do aparelho foi programado para escanear uma área central da amostra de 2,0 x 1,0 mm, correspondente à área tratada e às superfícies de referências de ambos os lados (Hara et al., 2013; Scaramucci et al., 2016). O aparelho percorreu 200 passos (de 0,01 mm) no eixo X e 10 passos (de 0,1 mm) no eixo Y (tempo de leitura = 28 s) e a perda de superfície foi calculada por um *software* específico (ProscanApplication software version 2,0,17). As amostras de dentina foram mantidas em umidade relativa até a leitura para evitar sua desidratação. Imediatamente antes da análise, o excesso de água foi removido com um papel absorvente (Magalhães et al., 2010).

7.3.3.8 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A fim de se observar as características de superfície da dentina após cada tratamento de superfície, 3 amostras de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente para serem analisadas por meio de MEV e EDS. Estas foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,1 M por 2 h à temperatura ambiente; desidratadas em série crescente de etanol, imersas em HMDS por 20 min e secas no ar dentro de uma capela. Foram, então, montadas em *stubs* de alumínio, recobertas por uma camada de platina (25 nm) e observadas em MEV (magnificações de 1000x, 3000x e 5000x). Adicionalmente, uma análise de composição mineral de superfície (EDS) foi realizada no mesmo equipamento em aumento de 3000x, operando a 20 kV.

7.3.4 Teste de reatividade de F⁻ - *in vitro*

7.3.4.1 Preparo e tratamento das amostras

As 24 amostras selecionadas para o teste de reatividade de F⁻ foram analisadas por meio de teste de microdureza para padronização das durezas de superfície. Foram realizadas 3 endentações em cada amostra, distantes 50 µm entre elas, com endentador Knoop e carga de 10 g por 10 s (Turssi et al., 2010) (média = 69,2 ± 2,7). As amostras foram, então, divididas aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=8): C – controle negativo; NaF – controle positivo (gel de NaF a 2% - pH 7,0) e TiF₄ – gel de TiF₄ a 4 % (pH 1,5). Em seguida, tiveram suas faces laterais e inferiores protegidas com cera utilidade, foram imersas em ácido cítrico 0,05 M (20 min) para formação da lesão de erosão inicial e então, foram tratadas como descrito para a etapa *in situ*.

7.3.4.2 Determinação das concentrações de F solúvel em álcali e em ácido

Para determinação da quantidade de flúor solúvel em álcali (CaF_2 -like) na superfície da dentina, as amostras tratadas foram armazenadas individualmente em recipientes plásticos, aos quais foram adicionados 0,25 ml de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 1,0 M sob leve agitação (120 rpm), em temperatura ambiente, por 24 h (Caslavská et al., 1975). Ao final deste período, as soluções foram neutralizadas com 0,25 ml de TISAB II acrescido de HCl a 1,0 M e avaliadas em eletrodo específico para íons flúor (Orion Star A211; Thermo Electron). As leituras foram expressas em milivolts (mV) e transformadas em $\mu\text{g F}^-/\text{cm}^2$ por meio da regressão linear da curva de calibração para determinação da concentração de flúor solúvel em álcali (Nobre-dos-Santos et al., 2007).

As amostras que haviam sido reservadas após a determinação da concentração de flúor solúvel em álcali foram utilizadas para determinação do flúor solúvel em ácido. Estas foram novamente colocadas individualmente em tubos plásticos, aos quais foram adicionados 0,25 ml de HCl a 0,5 M cada. As amostras permaneceram expostas a esta solução por 30 s sob agitação constante e então, a solução foi neutralizada pela adição de 0,25 ml de TISAB II acrescido de NaOH. A concentração de flúor solúvel em ácido (FAp) foi medida utilizando o mesmo eletrodo específico para íons flúor e expressos em $\mu\text{g F}^-/\text{cm}^2$ (Scaramucci et al., 2015).

7.3.5 Análise estatística

Os dados de perda de superfície apresentaram aderência à curva normal e homogeneidade de variância. Já os de concentrações de íons flúor solúvel em álcali e em ácido tiveram que ser transformados por $\log_{10}$ para serem avaliados por testes paramétricos. Então, todos foram submetidos a análises de variância a um critério, sendo a análise de perda feita para blocos casualizados, empregando-se o modelo linear generalizado. Para as comparações múltiplas foram aplicados testes de Tukey. Os cálculos estatísticos foram realizados nos programas SPSS 23 e SigmaPlot 12.0, adotando-se o nível de significância de 5%. As análises das eletromicrografias de varredura foram feitas de forma qualitativa.

7.4 Resultados

7.4.1 Perda de superfície

A análise de variância demonstrou presença de efeito estatisticamente significativo do fator tratamento ($p=0,004$, com poder de teste de 0,900), entretanto o fator bloco não se mostrou estatisticamente significativo ($p=0,502$). O teste de Tukey (Tabela 7.3) indicou que o grupo TiF_4 apresentou perda significativamente inferior àquela encontrada nos demais grupos, os quais não diferiram significativamente entre si.

Tabela 7.3 – Valores de perda de superfície obtidos após ciclagem erosiva *in situ* (médias e desvios padrões)

Grupos experimentais	Perda de superfície (em μm)
C	18,6 (12,3) a
P	15,8 (7,0) a
NaF	14,8 (7,3) a
TiF_4	5,3 (2,2) b

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).

7.4.2 Análise em MEV e EDS

Pelas eletromicrografias obtidas em MEV (Figura 7.1) observa-se que, após a aplicação dos tratamentos, os grupos C, P e NaF apresentaram padrões de superfície similares, com túbulos dentinários abertos. Já no grupo TiF_4 percebe-se uma redução no diâmetro das entradas dos túbulos, em diferentes graus, que variam de um aspecto achatado até a completa obliteração. Após ciclagem erosiva *in situ*, observa-se que as morfologias de superfície apresentadas após os tratamentos se mantiveram semelhantes para todos os grupos experimentais.

Quanto à composição (análise em EDS), todas as amostras apresentaram presença de cálcio na superfície analisada, nos dois momentos de avaliação. Adicionalmente, no grupo tratado com gel de TiF_4 , puderam ser identificadas concentrações de íons Ti, antes e após a realização dos desafios erosivos.

Figura 7.1 – Eletromicrografias obtidas em MEV dos grupos experimentais C (A e B), P (C e D), NaF (E e F) e TiF_4 (G e H) após a aplicação dos tratamentos e após ciclagem erosiva, respectivamente. Aumento de 3000 x

7.4.3 Determinação das concentrações de F solúvel em álcali e em ácido

Para ambas as análises de concentrações de flúor, os testes de ANOVA 1-fator demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Segundo testes de Tukey (Tabela 7.4), para o F solúvel em álcali (CaF_2), o grupo TiF_4 apresentou a maior concentração, tendo diferido estatisticamente do grupo NaF, que aumentou significativamente a concentração de CaF_2 em relação ao controle negativo. Quanto à concentração de F solúvel em ácido (FAp), os grupos TiF_4 e NaF elevaram estatisticamente os valores obtidos em relação ao grupo C, mas não apresentaram diferença entre si.

Tabela 7.4 – Resultados de concentrações de íons flúor (médias e desvios padrões)

Grupos	CaF_2 (em $\mu\text{g F/cm}^2$)	FAp (em $\mu\text{g F/cm}^2$)
C	0,42 (0,22) c	0,43 (0,14) b
NaF	44,3 (18,0) b	2,38 (1,02) a
TiF_4	237,5 (84,2) a	2,77 (1,12) a

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para cada dosagem ($p < 0,05$).

7.5 Discussão

Diversas pesquisas têm demonstrado efeitos favoráveis causados pelo TiF_4 sobre os tecidos dentais no controle da progressão da erosão (Magalhães et al., 2016; Medeiros et al., 2016; Mantilla et al., 2017a). Entretanto, a grande variedade de protocolos, tanto quanto à aplicação do produto quanto ao tipo de ciclagem empregado, retardam a possibilidade da utilização clínica deste fluoreto. No sentido de contribuir com a definição de um protocolo que possa ser testado *in vivo*, no presente estudo foi empregado um modelo *in situ*, em que um protocolo de

aplicação bem sucedido *in vitro* foi submetido à ação dos fatores modificadores presentes na cavidade bucal.

Sabe-se que a presença da saliva promove a formação da película adquirida sobre os dentes, o que pode influenciar positivamente na incorporação de fluoreto pelo tecido causada pela interação eletrostática entre o titânio e as proteínas presentes na película (Yoshida; Hayakawa, 2013). No entanto, especula-se que o fluxo salivar também possa interferir na proteção conferida por esse produto, uma vez que o *clearance* salivar seria capaz de removê-lo da superfície dental (Duckworth; Jones, 2015).

No presente estudo, foi utilizado um gel de TiF_4 com alta concentração (Büyükyilmaz et al., 1997; Mantilla et al., 2017a) e em seu pH original (Wiegand et al., 2009). Após severa ciclagem erosiva *in situ*, visando simular a ingestão de ácidos de um paciente com alto risco para o desenvolvimento de lesões de erosão, o fluoreto demonstrou eficiente proteção do substrato dental, tendo reduzido significativamente a perda de substrato quando comparado a todos os demais grupos experimentais.

Especula-se que esta proteção tenha sido conferida pela formação de uma camada ácido-resistente sobre a superfície dental, pela ligação do titânio com o oxigênio proveniente do fosfato/água do tecido dental ou diretamente com a sua porção orgânica (Mundorff et al., 1972). O resultado obtido demonstra que a formação do *glaze* não foi comprometida pela presença da saliva e que sua utilização clínica, associada à modificação de hábitos deletérios, poderia beneficiar pacientes que apresentam erosão dental e não podem fazer uso, ou não tem acesso, aos produtos disponíveis no mercado para o controle destas lesões.

O efeito protetor do TiF_4 pode ser observado nas eletromicrografias pela deposição de uma camada capaz de obliterar parcialmente a entrada dos túbulos dentinários, corroborando com os resultados de um estudo anterior (Mantilla et al., 2017b). Consequentemente, haveria a formação de uma barreira de difusão sobre a superfície dental, capaz de impedir o contato direto entre ácidos e a dentina. Uma vez que este aspecto diferenciado da superfície se mantém após os 5 dias de desafios erosivos *in situ*, especula-se que o *glaze* formado sobre a superfície possa ser considerado duradouro e eficiente na proteção do substrato exposto à ação de ácidos.

Adicionalmente, as análises de concentrações de F^- solúvel em álcali demonstraram maior formação de CaF_2 para o grupo TiF_4 . Estes resultados são suportados pela literatura que prevê que produtos fluoretados ácidos sejam capazes de deslocar a reação de reatividade do flúor com os tecidos dentais no sentido da formação de compostos *CaF₂-like* (Guimarães et al., 2000). Além disso, a maior concentração de F presente no gel de TiF_4 também contribuiu para o aumento significativo na concentração de F^- solúvel em álcali em relação ao grupo NaF.

Sabe-se que esta camada de CaF_2 é bastante solúvel e é degradada até pelos fluidos presentes na cavidade bucal (McCann, 1968). Entretanto, Ganss et al. (2007) demonstram que a manutenção desta camada é prolongada *in situ*, quando comparada a estudos *in vitro*. Enquanto presente na superfície dental, esta camada pode agir com uma barreira física contra a ação de soluções erosivas. Consequentemente, sugere-se que uma maior concentração de CaF_2 tenha originado uma camada mais espessa e duradoura que possa ter contribuído com o *glaze* na proteção dos tecidos dentais submetidos à erosão.

Ainda que um efeito adicional de proteção possa ser atribuído à formação de uma camada de CaF_2 mais espessa, baseado em estudo *in vitro* prévio (dados não publicados – capítulo III), sabe-se que ele não é o principal responsável pela redução na perda de superfície obtido pelo grupo TiF_4 . Isto porque, mesmo equiparando o ppmF do TiF_4 a 4% em um gel de NaF (5,42%), os valores de proteção não diferiram do NaF a 2% e do gel placebo.

Em relação ao gel placebo, este não apresentou qualquer redução da perda de tecido em relação ao controle negativo, sugerindo que os efeitos causados pela aplicação dos géis fluoretados foram causados exclusivamente pelos agentes ativos. Ainda que já tenha sido sugerido na literatura que o espessante carboximetilcelulose seja capaz de adsorver sobre a superfície dental (Barbour et al., 2005), esta ação não foi suficiente para controlar a progressão da erosão.

7.6 Conclusões

Dentro dos limites deste estudo *in situ*, conclui-se que o gel de TiF_4 a 4%, em seu pH original, é eficaz em reduzir a progressão da erosão, mesmo sob a ação dos

fatores modificadores presentes na cavidade bucal, tendo sido capaz de se manter sobre a superfície mesmo após 5 dias de ciclagem erosiva.

7.7 Referências

Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. An investigation of some food-approved polymers as agents to inhibit hydroxyapatite dissolution. *Eur J Oral Sci.* 2005 Dez;113(6):457-61.

Bardow A, Nyvard B, Nauntofte B. Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization *in situ*. *Arch Oral Biol.* 2001 Maio;46(5):413-23.

Büyükyılmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci.* 1997 Out;105(5 Pt 2):473-7.

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

Comar LP, Cardoso CAB, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. TiF₄ and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression *in vitro*. *J Appl Oral Sci.* 2015 Jan-Fev;23(1):14-18.

Duckworth RM, Jones S. On the relationship between the rate of salivary flow and salivary fluoride clearance. *Caries Res.* 2015;49(2):141-6.

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 Nov-Dez;37(6):450-5.

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

Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res.* 2010;44(3):248-52.

Gerth HU, Dammaschke T, Schäfer E, Züchner H. A three layer structure model of fluoridated enamel containing CaF_2 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and FAp. *Dent Mater.* 2007 Dez;23(12):1521-8.

Guimarães AR, Modesto A, Vieira AR. Formation of alkali-soluble on the surface of human dental enamel after treatment with fluoridated gels: influence of the pH variation and of the treatment time. *J Clin Pediatr Dent.* 2000 Summer;24(4):303-7.

Hara AT, Lippert F, Zero DT. Interplay between experimental dental pellicles and stannous-containing toothpaste on dental erosion-abrasion. *Caries Res.* 2013;47(4):325-9.

Hjörtsjö C, Young A, Kiesow A, Cismak A, Berthold L, Petzold M. A descriptive in vitro electron microscopic study of acidic fluoride-treated enamel: potential anti-erosion effects. *Caries Res.* 2015;49(6):618-25.

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:55-73.

João-Souza SH, Bezerra SJ, Freitas PM, Lima NB, Aranha ACC, Hara AT, Scaramucci T. *In situ* evaluation of fluoride-, stannous- and polyphosphate-containing solutions against enamel erosion. *J Dent.* 2017 Ago;63:30-5.

Laufer B, Mayer I, Gedalia I, Deutsch D, Kaufman HW, Tal M. Fluoride-uptake and fluoride-residual of fluoride-treated human root dentine in vitro determined by chemical, scanning electron microscopy and x-ray diffraction analyses. *Arch Oral Biol.* 1981;26(3):159-63.

Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Efficacy of TiF_4 and NaF varnish and solution: a randomized *in situ* study on enamel erosive-abrasive wear. *Clin Oral Invest.* 2014 Maio;18(4):1097-102.

Magalhães AC, Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF_4 and NaF varnishes and solutions on dentin erosion *in vitro*. *J Dent.* 2010 Fev;38(2):153-7.

Magalhães AC, dos Santos MG, Comar LP, Buzalaf MA, Ganss C, Schlueter N. Effect of a single application of TiF_4 varnish versus daily use of a low-concentrated TiF_4/NaF solution on tooth erosion prevention *in vitro*. Caries Res. 2016;50(5):462-70.

Mantilla TF, Ramos-Oliveira T, Silva C, Cersosimo M, Turssi CP, Freitas PM. Effects of different concentrations and excipients of titanium tetrafluoride on dentin erosion prevention. Oral Health Prev Dent. 2017a;15(5):461-5.

Mantilla TF, Silva CV, Ramos-Oliveira TM, Turssi CP, Ribeiro MS, Freitas PM. TiF_4 gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. Microsc Res Tech. 2017 Nov;80(11):1182-8.

McCann HG. The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride. Arch Oral Biol. 1968 Ago;13(8):987-1001.

Medeiros MID, Carlo HL, Lacerda-Santos R, Lima BAG, Sousa FB, Rodrigues JA, Carvalho FG. Thickness and nanomechanical properties of protective layer formed by TiF_4 varnish on enamel after erosion. Braz Oral Res. 2016 Ago;30(1):e75.

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

Nobre-dos-Santos M, Rodrigues LKA, Del-Bel-Cury AA, Cury JA. In situ effect of a dentifrice with low fluoride concentration and low pH on enamel remineralization and fluoride uptake. J Oral Sci 2007 Jun;49(2):147-54.

Oh HJ, Oh HW, Kim CH, Ahn JY, Kim Y, Schin HB, Kim CY, Jeon JG. Chronologic trends in studies on fluoride mechanisms of action. J Dent Res. 2017 Nov;96(12):1353-60.

Rolla G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. Acta Odontol Scand. 1988 Dez;46(6):341-5.

Salas MM, Nascimento GG, Vargas-Ferreira F, Tarquinio SB, Huysmans MC, Demarco FF. Diet influenced tooth erosion prevalence in children and adolescents: Results of a meta-analysis and meta-regression. J Dent. 2015 Ago;43(8):865-75.

Scaramucci T, Sobral MAP, Eckert GJ, Zero DT, Hara AT. In situ evaluation of the erosive potential of Orange juice modified by food additives. Caries Res. 2012;46(1):55-61.

Scaramucci T, Borges AB, Lippert F, Zero DT, Hara AT. In vitro effect of calcium-containing prescription-strength fluoride toothpastes on bovine enamel erosion under hyposalivation-simulating conditions. *Am J Dent* 2015 Feb;28(1):18-22.

Scaramucci T, João-Souza SH, Lippert F, Eckert GJ, Aoki IV, Hara AT. Influence of toothbrushing on the antierosive effect of film-forming agents. *Caries Res*. 2016;50(2):104-10.

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

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn²⁺-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy - a controlled randomized *in situ* trial. *Clin Oral Invest*. 2014 Jan;18(1):107-15.

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 Jan;17(1):195-203.

Skartveit L, Tveit B, Totdal B, Selvig KA. Effects of TiF₄ solutions on root surfaces *in vitro* after different application periods. *Acta Odont Scand*. 1989 Feb; 47(1):25-30.

Tickle M, O'Neill C, Donaldson M, Birch S, Noble S, Killough S, Murphy L, Greer M, Brodison J, Verghis R, Worthington HV. A randomized controlled trial of caries prevention in dental practice. *J Dent Res*. 2017 Jul;96(7):741-6.

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, 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 Maio;42(5):534-9.

Wagner Y, Heinrich-Weltzien R. Risk factors for dental problems: recommendations for oral health in infancy. *Early Hum Dev*. 2017 Nov;114:16-21.

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 Maio;70(3):177-83.

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.* 2008;42(4):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 Ago;54(8):790-5.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF_4) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8(2):159-64.

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

8 CAPÍTULO V

Os efeitos do gel de TiF_4 na oclusão tubular em dentina humana erodida/abrasionada.

8.1 Resumo

O presente estudo *in situ* avaliou a oclusão tubular causada pelo gel de TiF_4 na superfície da dentina erodida/abrasionada. Sessenta amostras de dentina humana foram erodidas *in vitro* e divididas aleatoriamente em seis grupos ($n=10$) de acordo com o tratamento de superfície *in situ* e quantidade de dias de ciclagem: uma (TiF_41), duas (TiF_42) ou três (TiF_43) aplicações de gel de TiF_4 a 4% seguidas de 2, 4 e 6 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, respectivamente. Os grupos controle (sem tratamento) foram submetidos a 2 (C1), 4 (C2) e 6 (C3) dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ* apenas. Um sétimo grupo ($n = 10$) compreendeu amostras não erodidas *in vitro* (NE), submetidas a 6 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*. Cada dia de ciclagem consistiu em seis desafios erosivos (ácido cítrico a 0,5%, pH 2,6) e um abrasivo. Imagens em microscopia eletrônica de varredura ambiental foram obtidas. Para todos os grupos, examinadores cegos avaliaram a oclusão dos túbulos dentinários usando uma escala visual (0 – não ocluído, 1 – parcialmente ocluído por depósitos granulares, 2 – parcialmente ocluídos por redução da luz do túbulo por achatamento, 3 – completamente ocluídos) em imagens capturadas antes e depois da etapa *in situ*. O teste de Scheirer-Ray-Hare demonstrou que os tratamentos afetaram significativamente a oclusão tubular ($p < 0,001$). Segundo teste de Dunn, a oclusão tubular obtida para o grupo TiF_43 foi significativamente maior que C1. As oclusões tubulares observadas para os demais grupos não diferiram de TiF_43 e C1. A oclusão tubular foi significativamente maior após a etapa *in situ*. Desta forma, pode ser sugerido que o TiF_4 , quando aplicado três vezes, foi capaz de alterar positivamente a oclusão tubular nas amostras de dentina.

8.2 Introdução

A erosão é uma condição multifatorial, que leva a uma perda de tecido dental progressiva causada pela ação de ácidos de origem não-bacteriana (Imfeld, 1996; Lussi et al., 2011; Schlueter et al., 2012). O tecido dissolvido não pode ser recuperado, permitindo a exposição da dentina (Lussi et al., 2011) e, conseqüentemente, problemas funcionais e/ou estéticos para os pacientes (Schlueter et al., 2012). Além disso, é comum a associação entre erosão e hipersensibilidade dentinária (West, 2008), uma vez que, com túbulos dentinários expostos, estímulos de variadas naturezas podem causar movimentações no fluido dentinário e levar ao aparecimento de sintomatologia dolorosa (West, 2008).

Métodos para prevenir e controlar a erosão têm sido estudados (Sundaram et al., 2007; Bartlett et al., 2011; Mathews et al., 2012; Turssi et al., 2012; Lepri et al., 2015), já que é alta a prevalência deste tipo de lesão entre a população (Jaeggi; Lussi, 2006; El Aidi et al., 2010; Bartlett et al., 2013). Um dos tratamentos propostos é a aplicação de fluoretos. O principal mecanismo de ação dos fluoretos é a formação de uma camada de compostos semelhantes à CaF_2 , que promove uma proteção parcial a este substrato, já que pode agir como uma barreira física de proteção (Wiegand et al., 2010; Magalhães et al., 2011). Entretanto, quando exposta a desafios ácidos, esta camada é dissolvida, o que limita sua ação contra a erosão (Ganss et al., 2012).

A fim de formar camadas mais ácido-resistentes sobre a superfície dental, a possível proteção conferida por compostos contendo cátions metálicos polivalentes associados a fluoretos vem sendo testada sob a ação de ácidos (Schlueter et al., 2014; Basting et al., 2015; Comar et al., 2015). O tetrafluoreto de titânio (TiF_4), particularmente, tem características singulares, uma vez que o íon Ti é capaz de formar complexos simultaneamente tanto com o fluoreto quanto com a estrutura dental (Skartveit et al., 1991), criando uma camada conhecida como *glaze* (Sen; Büyükyilmaz, 1998; Wiegand et al., 2009). Esta camada age como uma barreira de difusão, além de ser um reservatório de fluoreto (Wiegand et al., 2010).

Estudos mostram resultados positivos em relação ao controle das lesões de erosão promovido pela formação do *glaze* (Vieira et al., 2005; Magalhães et al., 2012; Comar et al., 2015; Lepri et al., 2015), o qual apresenta alta estabilidade de

retenção sobre a dentina humana (Tveit et al., 1988) e sua manutenção pode ser observada mesmo após desafios ácidos (Büyükyilmaz et al., 1997). Entretanto, ainda não se sabe se esta proteção pode adicionalmente ser capaz de ocluir a entrada dos túbulos dentinários, já que o *glaze* formado após a aplicação do TiF_4 se deposita na camada de dentina exposta. Além disso, caso a oclusão promovida pela aplicação de TiF_4 seja estável o suficiente para resistir a desafios erosivos e abrasivos, isto poderia levar a uma ação dessensibilizante, uma vez que a hipersensibilidade dentinária requer túbulos patentes para ocorrer (West, 2008).

Considerando que a cavidade bucal pode modular sua ação final, o presente estudo visou avaliar os efeitos do gel de TiF_4 a 4% na oclusão tubular da dentina submetida a erosão/abrasão *in situ*.

8.3 Materiais e Métodos

8.3.1 Aspectos éticos e seleção dos voluntários

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética local (CEP/FOUSP – Protocolo #544.566 – Anexo D) e conduzido de acordo com as diretrizes do CONSORT adaptado para estudos *in situ*. Doze voluntárias (mulheres, 20-35 anos) participaram da etapa *in situ* do estudo após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: possuir boa saúde geral e bucal; residir em São Paulo (SP/Brasil) e possuir fluxo salivar estimulado $> 0,7$ ml/min. Voluntários que apresentaram qualquer sinal de patologia sistêmica; doença do refluxo gastro-esofágico; presença de biofilme visível, lesões ativas de cárie, lesões de erosão, gengivite, ou doença periodontal; aparelhos ortodônticos; hábito de fumar e/ou estivessem grávidas ou amamentando não foram incluídos (adaptado de Turssi et al., 2014).

8.3.2 Delineamento experimental

O presente estudo *in situ* foi realizado em um único centro de pesquisa, cego (apenas para os examinadores), delineado em duas fases com dois fatores independentes, “voluntário” e “tratamento de superfície”, em sete níveis: três grupos controle, que incluíram amostras previamente erodidas (*in vitro*) submetidas à 2 (C1), 4 (C2) e 6 (C3) dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*; um grupo controle adicional com amostras não erodidas *in vitro* (NE) submetidas a 6 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*; e três grupos experimentais, que compreendiam amostras previamente erodidas *in vitro* que foram submetidas à 1 (TiF₄1), 2 (TiF₄2) ou 3 (TiF₄3) aplicações de TiF₄ seguidas de 2, 4 ou 6 dias de ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, respectivamente.

A variável resposta foi o grau de obliteração tubular promovida pelos tratamentos, que foi determinado por 2 examinadores cegos seguindo uma escala visual de scores (0 – não ocluído, 1 – parcialmente ocluído por depósitos granulares, 2 – parcialmente ocluído por redução na luz do túbulo por achatamento, 3 – completamente ocluído). Para tanto, imagens representativas de todas as amostras de cada grupo foram utilizadas. Estas foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura ambiental (MEVa) (Hitachi Analytical Microscope TM3000 Table Top, Hitachi, Tóquio, Japão), antes e após a etapa *in situ*.

8.3.3 Preparação e seleção das amostras

Fragmentos de dentina radicular (3 x 3 x 1 mm) foram obtidos a partir de 70 terceiros molares recém-extraídos – previamente armazenados em solução de cloramina-T – com o auxílio de disco de corte diamantado em baixa rotação (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA). As amostras foram então polidas utilizando lixas de carbetto de silício (#1200, #2400 e #4000) e suspensão de alumina 0,3 µm (Alfa Micropolish, Buehler Ltda.) em máquina de polimento (Buehler Ltda.). Entre e após cada etapa do polimento, as amostras foram lavadas em ultrassom em água deionizada (10 min) e armazenadas em umidade relativa a 4 °C.

As amostras tiveram suas superfícies checadas para identificar possíveis defeitos em lupa estereoscópica (magnificação de 40x) e sua microdureza de superfície mensurada (Microdurômetro HMS-2000, Shimadzu, Kyoto, Japão), a fim de padronizar as amostras selecionadas para o estudo (tabela 8.1). Três endentações (10 g por 10 s (Turssi et al., 2010)) foram realizadas em cada amostra, com 50 μm de distância entre elas utilizando um endentador Knoop. Setenta amostras foram divididas aleatoriamente em sete grupos ($n = 10$).

Tabela 8.1 – Resultados de microdureza

Grupos experimentais	Média (DP)
NE	80,3 (7,4)
C1	78,8 (9,7)
C2	76,3 (7,1)
C3	81,5 (10,2)
TiF₄1	74,5 (4,8)
TiF₄2	76,8 (5,9)
TiF₄3	82,2 (8,4)
	$p = 0,1726$

8.3.4 Grupos experimentais

Os grupos experimentais e procedimentos realizados em cada um deles estão descritos na tabela 8.2.

Tabela 8.2 – Tratamentos de superfície e número de ciclos erosivos/abrasivos realizados durante a etapa *in situ* em cada grupo experimental

Grupos experimentais	Formação de lesão de erosão (<i>in vitro</i>)	Tratamento de superfície	Aplicações de TiF₄	Dias de ciclagem erosiva/abrasiva <i>in situ</i>
C1	SIM	Controle (sem fluoreto)	0	2
C2	SIM	Controle (sem fluoreto)	0	4
C3	SIM	Controle (sem fluoreto)	0	6
NE	NÃO	Controle (sem fluoreto)	0	6
TiF₄1	SIM	Experimental (gel de TiF ₄ a 4%)	1	2
TiF₄2	SIM	Experimental (gel de TiF ₄ a 4%)	2	4
TiF₄3	SIM	Experimental (gel de TiF ₄ a 4%)	3	6

8.3.5 Formação das lesões de erosão

Antes do início da etapa *in situ*, todas as amostras, exceto às do grupo NE, foram submetidas a uma imersão em solução de ácido cítrico (0,05 M, pH 2,3, 20 min) (ácido cítrico monohidratado, Sigma Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) (Ganss et al., 2010), à temperatura ambiente e sob constante agitação (35 rpm) para formação das lesões de erosão.

8.3.6 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental (MEVa)

Todas as amostras, incluindo as do grupo NE, foram examinadas em MEVa (Hitachi Analytical Microscope TM3000 Table Top, Hitachi) duas vezes: após a formação das lesões de erosão *in vitro* (antes da etapa *in situ*) e após a etapa *in situ*. As amostras foram fixadas com adesivo a base de cianoacrilado em *stubs* de alumínio e toda a área da amostra foi escaneada em pequena magnificação para permitir a seleção da região que mais caracterizava as amostras de cada grupo. Neste ponto, o escaneamento era realizado e eletromicrografias foram obtidas em uma maior magnificação (x1000).

8.3.5 Preparação dos dispositivos intraorais

Dois dispositivos de acrílico customizados contendo 2 nichos cada (4 x 4 x 2 mm) foram confeccionados para cada participante. Os fragmentos de dentina foram posicionados nos nichos e fixados com cera aproximadamente 0,5 mm abaixo da superfície do dispositivo, de forma a protegê-los da abrasão promovida pela língua e mucosa da bochecha (Hara et al., 2009). Os dispositivos foram, então, posicionados nas vestibulares da região de pré-molares dos participantes da pesquisa.

Os grupos foram separados em duas fases – Controle e Experimental (Figura 8.1) – para prevenir a possível influência do fluoreto nas amostras dos grupos controle. Durante ambas as fases, as amostras foram esterilizadas em radiação gama (Wegehaupt et al., 2012) e posicionadas aleatoriamente nos nichos, seguindo os princípios de permutação, de forma que a posição das amostras não influenciasse os resultados.

Figura 8.1 – Delineamento experimental (etapas *in vitro* e *in situ*)

8.3.6 Tratamento com TiF₄ e experimento *in situ*

Dois dias antes (período de *run-in*) e durante toda etapa *in situ*, os participantes foram orientados a escovar seus dentes sem o dispositivo intraoral, utilizando um dentífrico fluoretado (Colgate Máxima Proteção Anti-Cáries, 1500 ppmF⁻, Colgate-Palmolive, Osasco, SP, Brasil), associado a escova e fio dental fornecidos pela pesquisadora. Durante a etapa *in situ*, os dispositivos foram inseridos nas bocas dos participantes 2 h antes da aplicação do TiF₄ (grupos experimentais) ou antes do início da ciclagem erosiva/abrasiva (grupos controle) (Hara et al., 2006; Levy et al., 2014).

Nos grupos experimentais, as aplicações do gel de TiF₄ foram realizadas até três vezes (grupo TiF₄3). Antes do tratamento com o fluoreto, as amostras foram secas com papel absorvente. Vinte microlitros do gel de TiF₄ a 4% (24.530 ppm F, pH 1,5) (Vieira et al., 2005) foram aplicados em cada amostra (aplicação ativa com auxílio de pincel descartável, 4 min). O excesso de gel foi removido cuidadosamente com o auxílio de um algodão. O gel foi manipulado pela pesquisadora e produzido pela adição de carboximetilcelulose (Sigma Aldrich Ltda.) à solução de TiF₄ (Sigma

Aldrich Ltda.). Após a aplicação do gel, o primeiro desafio ácido foi realizado imediatamente. Os dispositivos foram, então, reinseridos nas cavidades bucais dos participantes e a ciclagem erosiva/abrasiva prosseguia normalmente, como descrito adiante.

As aplicações foram realizadas no 1º (grupos TiF₄1, TiF₄2 e TiF₄3), 3º (grupos TiF₄2 e TiF₄3) e 5º (apenas o grupo TiF₄3) dias na fase experimental (figura 8.1), antes do reinício da ciclagem erosiva/abrasiva. Além disso, antes da próxima aplicação (2ª e 3ª), uma amostra foi removida para evitar a possível influência da presença de fluoretos na cavidade bucal sobre esta, devido às aplicações subsequentes (Figura 8.1). As amostras removidas foram mantidas em umidade relativa e armazenadas a 4 °C.

Em ambas as fases, Controle e Experimental, as ciclagens erosivas/abrasivas foram realizadas da mesma forma. Os desafios ácidos consistiram em imersões das amostras em 20 ml de ácido cítrico a 0,5% (pH 2,6) (Schlueter et al., 2014). Este processo foi repetido seis vezes ao dia (2 min cada – *ex vivo*) com intervalos de 1,5 h entre eles. O excesso de ácido foi vertido em papel absorvente e o dispositivo intraoral foi reinserido nas cavidades bucais dos participantes. As soluções desmineralizadoras foram renovadas todos os dias antes do primeiro desafio erosivo e seu pH foi monitorado diariamente (Schlueter et al., 2011). Os dispositivos foram armazenados em gaze úmida a 4 °C durante a noite e refeições. Depois de comer, beber e realizar a higiene oral, os participantes foram instruídos a aguardar 15 min antes de reinserir o dispositivo (Schlueter et al., 2011).

Os desafios abrasivos foram realizados 60 min após o último desafio erosivo de cada dia. Seguindo protocolo usado por Schlueter et al. (2014), os participantes receberam uma escova elétrica, a qual possuía sensor de pressão que era ativado em 2,5 N (Oral B Professional Care 3000, Oral B, Schwalbacham Taunus, Alemanha). Os participantes foram instruídos a iniciar o processo de escovação pelas superfícies oclusais de seus próprios dentes inferiores (15 s) para permitir a formação de *slurry* dentifrício/saliva. O dentifrício utilizado para os desafios abrasivos foi o mesmo fornecido para a higiene oral. Os desafios erosivos foram realizados intraoralmente (10 s em cada amostra), seguidos do enxágue da cavidade bucal com água corrente (3 s) e remoção dos dispositivos (Schlueter et al., 2014). Adicionalmente, os dispositivos eram lavados em água (1 min), para remover resquícios de dentifrício, reinseridos na cavidade bucal e utilizados por mais 30 min.

8.3.7 Determinação do grau de obliteração tubular

Dois examinadores independentes, cegos para o estudo, foram treinados para avaliar o score das eletromicrografias de MEVa obtidas antes (figura 8.2) e após a etapa *in situ* (figura 8.3). O grau de obliteração tubular foi determinada baseado em uma escala visual de scores, que considerou: 0 – amostras com túbulos totalmente não ocluídos; 1 – túbulos parcialmente ocluídos por depósitos granulares; 2 – oclusão parcial por redução da luz tubular por achatamento e 3 – túbulos completamente ocluídos.

Figura 8.2 – Imagens representativas da dentina hígida (1) e erodida *in vitro* (2) antes da etapa *in situ*. Imagem extraída de Mantilla et al. TiF_4 gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. Microsc Res Tech. 2017 Nov;80(11):1182-1188 (Anexo F)

Figura 8.3 – Imagens representativas dos grupos experimentais após a etapa *in situ*. Setas brancas indicam as alterações causadas pela aplicação do TiF_4 sobre os túbulos dentinários. Imagem extraída de Mantilla et al. TiF_4 gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. Microsc Res Tech 2017;80(11):1182-1188 (Anexo F)

8.3.8 Análise estatística

A concordância entre examinadores antes e após a etapa *in situ* foi acessada por meio do teste de kappa Cohen. Um ANOVA 2-fatores não-paramétrico (teste de Scheirer-Ray-Hare) foi usado para avaliar os efeitos da interação entre as variáveis independentes “tratamento” e “tempo” e para seus efeitos na variável dependente “oclusão tubular”. O teste de Dunn foi utilizado para análise *post-hoc*. O nível de significância foi estabelecido em 5% e o cálculo estatístico foi realizado pelos *softwares* SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL) e BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá, Tefé, AM, Brasil).

8.4 Resultados

O teste Kappa demonstrou que a concordância entre examinadores foi excelente (0,85). Segundo teste de Scheirer-Ray-Hare mostrou que a interação entre as variáveis independentes (“tratamento” e “tempo”) não foi significativa ($p = 0,129$). Para o fator “tratamento” foi observada efeito significativo sobre a oclusão tubular ($p < 0,001$). Como demonstrado pelo teste de Dunn, a oclusão tubular promovida pelo grupo TiF_4 foi significativamente maior que em C1 (Tabela 8.3). A oclusão tubular nos grupos remanescentes não diferiram da apresentada pelos grupos TiF_4 e C1. O teste de Scheirer-Ray-Hare também revelou que a oclusão tubular foi significativamente mais alta após as amostras serem submetidas à etapa *in situ* ($p < 0,001$).

Morfologicamente, após a etapa *in situ*, as microscopias eletrônicas de varredura das amostras do grupo C1 apresentaram túbulos abertos e limpos, enquanto que os padrões de oclusão tubular para os grupos C2 e C3 foram similares, com luzes reduzidas (Figura 8.3). Amostras tratadas com TiF_4 , independente da quantidade de aplicações, apresentaram uma superfície diferente da controle, com uma aparência mais lisa e túbulos mais achatados, e com formato semelhante a um losango (Figura 8.3).

Tabela 8.3 – Mediana e média dos rankings de acordo com tratamento e tempo

Tratamento	Antes da etapa <i>in situ</i>		Após a etapa <i>in situ</i>		Resultados finais	
	Mediana	Ranking	Mediana	Ranking	Mediana	Ranking
		médio		médio		médio
NE	1	38	2,5	113	1,5	75 AB
C1	1	22	1	77	1	49 B
C2	1	30	1	81	1	56 AB
C3	1	38	2	112	1	75 AB
TiF₄1	1	52	1	89	1	70 AB
TiF₄2	1	62	2	93	1	77 AB
TiF₄3	1	64	2	119	1	92 A
Resultados finais	1	44b	1	97a	-	-

Ranking médios seguidos de letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos. Ranking médios seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos.

8.5 Discussão

Clinicamente, a erosão dental, além de apresentar perda progressiva do tecido dental, pode acarretar a hipersensibilidade dentinária (Schlueter et al., 2012), já que a exposição da dentina permite a propagação de estímulos de diferentes naturezas pelos túbulos dentinários patentes (West, 2008). Para estes casos, o tratamento ideal deveria envolver a aplicação de um produto, que pudesse simultaneamente produzir depósitos sobre a superfície da dentina e controlar a erosão, ocluindo a entrada dos túbulos e prevenindo o movimento do fluido dentinário, além de ser resistente a desafios erosivos.

No presente estudo, os scores propostos para medir a oclusão tubular visaram avaliar as possíveis diferenças causadas pelos tratamentos e tempos de avaliação.

Quando comparados os valores obtidos antes e após a etapa *in situ*, foi observado um aumento na oclusão tubular para todos os grupos. Estes resultados podem ter sido causados pelos tratamentos, para grupos que receberam aplicações de fluoreto, ou pela formação da camada de *smear* sobre a superfície causada pela abrasão e dentifrício remanescente.

Pela metodologia usada, pode ser observado nas imagens de microscopia eletrônica de varredura diferentes padrões de oclusão tubular quando comparados os grupos controle. O grupo C1 apresenta túbulos abertos, enquanto as amostras que foram submetidas a mais dias de ciclagem *in situ* (grupos C2 e C3) apresentaram redução nas luzes dos túbulos. Pode-se especular que este aspecto pode ter sido gerado pela compressão das fibras colágenas devido à força de abrasão, entretanto apenas microscopias transversais poderiam confirmar esta hipótese.

Deve ser pontuado também que, como as amostras foram posicionadas abaixo do nível da superfície dos dispositivos intraorais, a fim de evitar o contato com a mucosa bucal, talvez a abrasão gerada pela escovação não tenha alcançado a superfície dental completamente. Além disso, a força aplicada pela escova elétrica (2,5 N) pode não ter sido suficiente para remover completamente a matriz orgânica desmineralizada e ter causado apenas a compressão desta camada (Ganss et al., 2007; Ganss et al., 2009), originando um aspecto mais compacto na superfície da dentina exposta aos desafios erosivos.

Para os grupos tratados com fluoreto, o tetrafluoreto de titânio foi escolhido, uma vez que a sua capacidade de proteger o substrato dental dos desafios erosivos é gerada pela formação de uma camada ácido-resistente sobre ele, conhecida como *glaze* (Mundorff et al., 1972; Büyükyilmaz et al., 1997). Esta, além de agir como um reservatório de íons F^- (Magalhães et al., 2010), pode também funcionar como barreira física de proteção contra desafios ácidos (Wiegand et al., 2010), que consequentemente poderia reduzir a sintomatologia dolorosa dos pacientes.

A formação da camada de *glaze*, com aproximadamente 200-300 nm de espessura, já foi comprovada para superfícies submetidas à aplicação de TiF_4 (Hjortsjö et al., 2015). Com os resultados do presente estudo, a manutenção deste filme pode ser especulada para grupos tratados com TiF_4 , mesmo após ciclagem erosiva/abrasiva *in situ*, uma vez que pode ser observada nestas amostras uma superfície mais lisa, com uma aparência mais homogênea que as dos grupos

controle. Também pode ser observado que, ao longo das aplicações, essa característica de superfície é intensificada, e o grupo TiF_4 3 foi capaz de aumentar significativamente a oclusão tubular comparado com C1. Extrapolando os resultados, pode ser sugerido que a aparente permanência desta camada ácido-resistente pode justificar a proteção dos tecidos dentais responsável pelos resultados positivos para o controle da erosão apresentados em trabalhos recentes na literatura (Wiegand et al., 2014; Basting et al., 2015; Castilho et al., 2015).

Adicionalmente, quando comparados aos grupos controle, amostras tratadas com TiF_4 , independente do número de aplicações, apresentaram um padrão diferente de oclusão tubular, já que estes se tornaram achatados e em forma de losango. Autores levantam a hipótese de que a afinidade entre os íons Ti pelo oxigênio das moléculas de fosfato (Tveit et al., 1988) poderia levar a uma deposição mais pronunciada nas regiões mineralizadas da dentina, a porção peritubular. Ainda assim, estudos adicionais são necessários para elucidar se esta redução na área de entrada dos túbulos seria suficiente para controlar os sintomas da hipersensibilidade dentinária.

Excluindo o fato de que todos os procedimentos foram padronizados e que os participantes foram treinados intensamente de forma a realizá-los corretamente, diversos fatores podem interferir na variação entre os indivíduos quando consideramos modelos *in situ*. Contudo, dentro das limitações deste estudo, pode ser concluído que, mesmo que o tratamento com gel de TiF_4 não tenha sido capaz de gerar uma completa oclusão dos túbulos dentinários, ele reduziu o diâmetro das luzes dos túbulos.

8.6 Referências

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(1):26-9.

Bartlett DW, Lussi A, West NX, Bouchard P, Sanz M, Bourgeois D. Prevalence of tooth wear on buccal and lingual surfaces and possible risk factors in young European adults. J Dent. 2013 Nov; 41(11):1007-13.

Basting RT, Leme AA, Bridi EC, Amaral FLB, França FMG, Turssi CP, Bedran-Russo AK. Nanomechanical properties, SEM, and EDS microanalysis of dentin treated with 2.5% titanium tetrafluoride, before and after an erosive challenge. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*. 2015 Maio;103(4):783-9.

Büyükyilmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci*. 1997 Out;105(5 Pt 2):473-7.

Castilho AR, Salomão PM, Buzalaf MA, Magalhães AC. Protective effect of experimental mouthrinses containing NaF and TiF₄ on dentin erosive loss *in vitro*. *J Appl Oral Sci*. 2015 Out;23(5):486-90.

Comar LP, Cardoso CAB, Charone S, Grizzo LT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. TiF₄ and NaF varnishes as anti-erosive agents on enamel and dentin erosion progression *in vitro*. *J Appl Oral Sci*. 2015 Jan-Fev;23(1):14-18.

El Aidi H, Bronkhorst EM, Huymans MCDNJM, Truin GJ. Dynamics of tooth erosion in adolescents: A 3-year longitudinal study. *J Dent*. 2010 Fev;38(2):131-7.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, von Hinckeldey J, Klimek J. Effects of toothbrushing on eroded dentine. *Eur J Oral Sci*. 2007 Out;115(5):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*. 2009 Jun;117(3):255-60.

Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res*. 2010;44(3):248-52.

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 Dez;25(6):351-64.

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 Jul;85(7):612-6.

Hara AT, Kelly SA, Gonzalez-Cabezas C, Eckert GJ, Barlow AP, Mason SC, Zero DT. Influence of fluoride availability of dentifrices on eroded enamel remineralization *in situ*. Caries Res. 2009;43(1):57-63.

Hjortsjö C, Young A, Kiesow A, Cismak A, Berthold L, Petzold M. A descriptive *in vitro* electron microscopic study of acidic fluoride-treated enamel: potential anti-erosive effects. Caries Res. 2015;49(6):618-25.

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

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

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SAM. *In situ* investigation of the effect of TiF₄ and CO₂ laser irradiation on the permeability of eroded enamel. Arch Oral Biol. 2015 Jun;60(6):941-7.

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 Maio;18(4):1097-102.

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.

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

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

Magalhães AC, Levy FM, Rizzante FA, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of NaF and TiF₄ varnish and solution on bovine dentin erosion plus abrasion *in vitro*. Acta Odontol Scand. 2012 Mar;70(2):160-4.

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 Maio;57(5):525-30.

Mundorff SA, Bibby BG, Little MF. Enamel dissolution. 2. Action of titanium tetrafluoride. J Dent Res. 1972 Nov-Dec;51(6):1567-71.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine *in situ*. Clin Oral Invest. 2011 Jun;15(3):361-7.

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

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Effect of a chitosan additive to a Sn²⁺-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy - a controlled randomized *in situ* trial. Clin Oral Invest. 2014 Jan;18(1):107-15.

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

Skartveit L, Selvig KA, Tveit AB. Root surface reactions to TiF₄ and SnF₂ solutions *in vitro*. An ultrastructural study. Acta Odontol Scand. 1991 Jun;49(3):183-90.

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

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 Ago;120(4):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 Maio;42(5):534-9.

Tveit AB, Klinge B, Totdal B, Selvig KA. Longterm retention of TiF₄ and SnF₂ after topical application to dentin in dogs. Scand J Dent Res. 1988 Dez;96(6):536-40.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion *in vitro*. Caries Res. 2005 Set-Out;39(5):371-9.

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 Maio;70(3):177-83.

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

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 Ago;54(8):790-5.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF_4) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. Oral Health Prev Dent. 2010;8(2):159-64.

Wiegand A, Schneider S, Sener B, Roos M, Attin T. Stability against brushing abrasion and the erosion-protective effect of different fluoride compounds. Caries Res. 2014;48(2):154-62.

9 DISCUSSÃO

É consenso na literatura que o tetrafluoreto de titânio possui propriedades singulares quando aplicado sobre a superfície dental. Pela afinidade entre os íons Ti e o tecido dental, além da formação de compostos *CaF₂-like* comum a todos os fluoretos (Gerth et al., 2007), o TiF₄ é capaz de formar uma camada adicional sobre a superfície, conhecida como *glaze* (Mundorff et al., 1972; Comar et al., 2017). Esta é ácido-resistente e pode proteger a estrutura recoberta do contato direto com os desafios erosivos, sejam de origem intrínseca ou extrínseca (Hove et al., 2008; Magalhães et al., 2016; Mantilla et al., 2017b).

A utilização clínica deste produto poderia beneficiar pacientes de diversas faixas etárias que possuem elementos dentais acometidos por lesões de erosão (Jaeggi; Lussi, 2014; Salas et al., 2015). No entanto, a realização de estudos clínicos que permitam a comprovação de seus efeitos protetores ainda não foi possível pela falta de definição de um protocolo capaz de extrair a máxima eficiência desse fluoreto.

A grande variedade de protocolos presentes na literatura gera graus de proteção variados tanto para esmalte quanto para dentina (Hove et al., 2008; Levy et al., 2014; Lepri et al., 2015; Magalhães et al., 2016; Mantilla et al., 2017b). Os principais fatores capazes de influenciar no potencial efeito protetor conferido pelo TiF₄ à estrutura dental são a concentração, o veículo e o pH. Quanto à concentração, estudos prévios já indicavam que compostos contendo 4% de TiF₄ eram capazes de formar camadas de *glaze* mais espessas e tenazes sobre a superfície dental se comparado a produtos menos concentrados (Büyükyilmaz et al., 1997). A alta concentração também promove maior eficiência do tratamento em reduzir o amolecimento superficial (Magalhães et al., 2009) e a perda de substrato (Mantilla et al., capítulo II).

Entretanto, estes resultados favoráveis foram obtidos com produtos aplicados em formas de apresentação com alta substantividade, como géis e vernizes. Para o veículo solução, mesmo mantendo-se a concentração em 4%, os resultados não foram satisfatórios quanto à redução da perda de superfície (Mantilla et al., capítulo II). Especula-se que a maior viscosidade promove uma mais longa manutenção do

produto sobre a superfície dental, favorecendo a formação de uma barreira de difusão mais eficiente.

Até quando comparado à solução de AmF/NaF/SnCl_2 , que atualmente é considerado o tratamento “padrão-ouro” para a erosão dental (Ganss et al., 2008; Schlueter et al., 2009; Ganss et al., 2010; Rakhmatullina et al., 2013), o gel de TiF_4 a 4% apresentou valores de perda similares após 10 dias de severa ciclagem erosiva *in vitro*, simulando os hábitos de ingestão de bebidas ácidas por pessoas com alto risco para o desenvolvimento de lesões erosivas. Estes resultados poderiam beneficiar pacientes que não podem fazer uso de produtos na forma de colutório ou não são cooperativos, uma vez que o fabricante da solução de AmF/NaF/SnCl_2 recomenda aplicações diárias. Além disso, muitos pacientes não tem acesso a este produto uma vez que ele é aprovado e, conseqüentemente comercializado, apenas no continente europeu.

Pelos resultados apresentados em outro estudo *in vitro* (Mantilla et al., capítulo III) observa-se que, para o veículo gel, o TiF_4 em seu pH original (pH 1,5) apresentou mais eficaz redução da perda de superfície, quando comparado a um gel, na mesma concentração, porém com pH ajustado. Efeito semelhante já havia sido reportado anteriormente também para a forma de apresentação solução (Wiegand et al., 2009). Desta forma, evidencia-se a necessidade da realização da aplicação do TiF_4 em pH ácido, independente do veículo empregado. Considerando a execução do tratamento com este fluoreto pelo profissional, formas de apresentação com maiores viscosidades permitiriam um maior controle da área a ser tratada, uma vez que seu menor escoamento evitaria o contato direto accidental entre o produto e os tecidos moles e, conseqüentemente, possíveis danos que poderiam ser causados pelo seu pH.

Na mesma pesquisa (capítulo III) foram comparados os efeitos protetores promovidos pelo TiF_4 e o NaF, equiparando-se os fatores pH e ppm F. Apesar dos resultados insatisfatórios apresentados pelo tratamento com fluoretos convencionais na literatura (Lepri et al., 2013), optou-se pela inclusão de grupo controle de NaF com concentração de 2%, pois esta é a formulação disponível no mercado brasileiro de produtos odontológicos. Adicionalmente, formulações manipuladas em pH mais baixo e maiores concentrações foram testadas, uma vez que a combinação destes fatores poderia promover uma desmineralização superficial do tecido dental e uma maior penetração de fluoreto (Laufer et al., 1981). Além disso, a acidez de produtos

fluoretados também favorece o deslocamento da reação de reatividade de F com a superfície tratada, aumentando a formação de compostos *CaF₂-like* sobre a superfície (Guimarães et al., 2000; Wiegand; Attin, 2003), que poderia agir como uma barreira física de proteção (Wiegand et al., 2010).

Ao contrário do esperado, o NaF ácido elevou consideravelmente a perda de superfície em dentina logo após a aplicação do tratamento, o que contraindica sua utilização clínica. Já para o grupo tratado com gel de NaF a 5,42% neutro não houve aumento significativo na proteção ao substrato em relação ao grupo NaF a 2%. Sabe-se que o CaF_2 é altamente solúvel (McCann, 1968) e estes resultados sugerem que mesmo com a formação de camadas mais espessas, a proteção conferida não é suficiente para controlar a progressão da erosão.

A aplicação do TiF_4 a 4% ácido também promove, pelos mesmos motivos citados, elevada produção de compostos *CaF₂-like* (Laufer et al., 1981; Mantilla et al., capítulo IV). Entretanto, as comparações feitas no estudo *in vitro* indicam que o principal responsável pela desaceleração do processo erosivo é o próprio *glaze*.

No sentido de confirmar a manutenção destes efeitos sob ação dos fatores modificadores presentes na cavidade bucal, um estudo *in situ* foi conduzido. A presença da saliva pode modular o desenvolvimento da erosão pela formação da película adquirida sobre os tecidos dentais (Hara et al., 2006; Vukosavljevic et al., 2014). Por outro lado, o fluxo salivar poderia promover o *clearance* do gel aplicado sobre as lesões, reduzindo o tempo de contato entre o tratamento e a superfície e, consequentemente, sua eficiência (Duckworth; Jones, 2015).

Ainda assim, o gel de TiF_4 a 4% apresentou os menores valores de perda, tendo reduzido a perda de superfície quando comparado a todos os grupos controle testados. Inclusive em relação ao gel placebo, composto apenas por água deionizada e carboximetilcelulose, os resultados do grupo TiF_4 evidenciam que a proteção não tenha sido causada pela adsorção das moléculas do espessante sobre a superfície dental (Barbour et al., 2005), mas sim pela formação do *glaze*.

Esta camada se manteve aderida à dentina mesmo após 5 dias de ciclagem erosiva *in situ*, sugerindo que este seja um tratamento eficaz e duradouro. Mesmo após os desafios ácidos, observou-se, pelas avaliações morfológicas de superfície, uma característica diferente das demais amostras, que apresentaram padrão de tecido dentinário erodido, com as entradas dos túbulos abertas e evidentes. Já as amostras tratadas com TiF_4 , tanto antes quanto após a ciclagem, apresentaram

redução no diâmetro das entradas dos túbulos.

Acessando os graus de obliteração tubular obtidos após tratamento com gel de TiF_4 , foi possível verificar que repetidas aplicações podem favorecer a diminuição das luzes dos túbulos dentinários (Mantilla et al., capítulo V). Extrapolando estes resultados, especula-se que este efeito poderia reduzir a hipersensibilidade dentinária, causada pela movimentação do fluido no interior de túbulos patentes (West, 2008). A capacidade desse tratamento de resistir à ciclagem erosiva/abrasiva *in situ* sugere que um efeito dessensibilizante adicional possa ser somado ao já comprovado efeito protetor contra desafios erosivos promovido pelo TiF_4 .

Pelos benefícios demonstrados pelo compilados dos estudos *in vitro* e *in situ* aqui presentes, somados aos relatos da literatura, deve ser considerada a realização de pesquisas clínicas que possam levar à aprovação de um protocolo clínico que favoreceria os pacientes com lesões de erosão.

10 CONCLUSÕES

Ainda que nenhum dos tratamentos testados tenha sido eficiente em interromper o processo da erosão, os estudos presentes nesta compilação demonstraram que alguns produtos fluoretados são capazes de reduzir a perda de superfície após ciclagem erosiva *in vitro*. Dentre os géis testados, tanto para compostos contendo NaF quanto TiF_4 , os fatores concentração de fluoreto e pH influenciaram a proteção conferida pelos tratamentos.

Após estudos *in situ*, conclui-se que o gel de TiF_4 a 4%, em seu pH original, é eficaz em reduzir a progressão da erosão, mesmo sob a ação dos fatores modificadores presentes na cavidade bucal. Ainda que não tenha sido capaz de gerar uma completa oclusão dos túbulos dentinários, foi capaz de promover uma redução significativa do diâmetro de suas luzes.

REFERÊNCIAS

- Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M. An investigation of some food-approved polymers as agents to inhibit hydroxyapatite dissolution. *Eur J Oral Sci.* 2005 Dez;113(6):457-61.
- 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 Jan;18(1):26-35.
- Büyükyılmaz T, Ogaard B, Rolla G. The resistance of titanium tetrafluoride-treated human enamel to strong hydrochloric acid. *Eur J Oral Sci.* 1997 Out;105(5 Pt 2):473-7.
- Comar LP, Souza BM, Al-Ahj LP, Martins J, Grizzo LT, Piasentim IS, Rios D, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Mechanism of action of TiF_4 on dental enamel surface: SEM/EDX, KOH-soluble F, and x-ray diffraction analysis. *Caries Res.* 2017 Out;51(6):554-67.
- Duckworth RM, Jones S. On the relationship between the rate of salivary flow and salivary fluoride clearance. *Caries Res.* 2015;49(2):141-6.
- Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion in vitro: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. *Caries Res.* 2008;42(1):2-7.
- Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized *in situ* trial on erosion. *J Dent Res.* 2010 Nov;89(11):1214-8.
- 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 Dez;25(6):351-64.
- Gerth HU, Dammaschke T, Schäfer E, Züchner H. A three layer structure model of fluoridated enamel containing CaF_2 , Ca(OH)_2 and FAp. *Dent Mater.* 2007 Dez;23(12):1521-8.

Guimarães AR, Modesto A, Vieira AR. Formation of alkali-soluble on the surface of human dental enamel after treatment with fluoridated gels: influence of the pH variation and of the treatment time. *J Clin Pediatr Dent*. 2000 Summer;24(4):303-7.

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 Jul;85(7):612-6.

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(1):68-72.

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

Jaeggi T, Lussi A. Prevalence, incidence and distribution of erosion. *Monogr Oral Sci*. 2014;25:55-73.

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 Maio;74(5):1179-84.

Laufer B, Mayer I, Gedalia I, Deutsch D, Kaufman HW, Tal M. Fluoride-uptake and fluoride-residual of fluoride-treated human root dentine *in vitro* determined by chemical, scanning electron microscopy and x-ray diffraction analyses. *Arch Oral Biol*. 1981;26(3):159-63.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SAM. Permeability of eroded enamel following application of different fluoride gels and CO_2 laser. *Laser Med Sci*. 2013 Jan;28(1):235-40.

Lepri TP, Colucci V, Turssi CP, Corona SA. *In situ* investigation of the effect of TiF_4 and CO_2 laser irradiation on the permeability of eroded enamel. *Arch Oral Biol*. 2015 Jun;60(6):941-7.

Levy FM, Rios D, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Efficacy of TiF_4 and NaF varnish and solution: a randomized *in situ* study on enamel erosive-abrasive wear. *Clin Oral Invest*. 2014 Maio;18(4):1097-1102.

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.

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 Jan-Feb;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 Feb;38(2):153–7.

Magalhães AC, dos Santos MG, Comar LP, Buzalaf MA, Ganss C, Schlueter N. Effect of a single application of TiF₄ varnish versus daily use of a low-concentrated TiF₄/NaF solution on tooth erosion prevention *in vitro*. *Caries Res.* 2016;50(5):462-70.

Mantilla T, Ramos-Oliveira T, Silva C, Cersosimo M, Turssi C, Freitas P. Effects of different concentrations and excipients of titanium tetrafluoride on dentin erosion prevention. *Oral Health Prev Dent.* 2017a;15(5):461-5.

Mantilla TF, Turssi CP, Ramos-Oliveira TM, Silva CV, Sasaki LC, Freitas PM. The *in situ* effect of titanium tetrafluoride gel on erosion/abrasion progression in human dentin. *Braz Dent J.* 2017b Maio-Jun;28(3):337-45.

Mantilla TF, Silva CV, Ramos-Oliveira TM, Turssi CP, Ribeiro MS, Freitas PM. TiF₄ gel effects on tubular occlusion of eroded/abraded human dentin. *Microsc Res Tech.* 2017c Nov;80(11):1182-8.

McCann HG. The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride. *Arch Oral Biol.* 1968 Ago;13(8):987-1001.

Meurman JH, Drysdale T, Frank RM. Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent.* 1991 Dez;99(6):457-62.

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

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous and fluoride containing rinsing solutions. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2013;123(3):192-8.

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

Salas MM, Nascimento GG, Vargas-Ferreira F, Tarquinio SB, Huysmans MC, Demarco FF. Diet influenced tooth erosion prevalence in children and adolescents: Results of a meta-analysis and meta-regression. *J Dent*. 2015 Ago;43(8):865-75.

Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C. Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel *in vitro*. *Caries Res*. 2009;43(1):10-6.

Schlueter N, Klimek J, Ganss C. Efficacy of tin-containing solutions on erosive mineral loss in enamel and dentine *in situ*. *Clin Oral Invest*. 2011 Jun;15(3):361-7.

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

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

Tveit AB, Klinge B, Tötdal B, Selvig KA. Long-term retention of TiF₄ and SnF₂ after topical application to dentin in dogs. *Scand J Dent Res*. 1988 Dez;96(6):536-40.

Vieira A, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion *in vitro*. *Caries Res*. 2005 Set-Out;39(5):371-9.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol*. 2014 Jun;59(6):631-8.

Wahengbam P, Tikku AP, Lee WB. Role of titanium tetrafluoride (TiF₄) in conservative dentistry: A systematic review. *J Conserv Dent*. 2011 Abr;14(2):98-102.

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

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

Wiegand A, Attin T. Influence of fluoride on the prevention of erosive lesions – a review. Oral Health Prev Dent. 2003;1(4): 245-53.

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 Ago;54(8):790-5.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF_4) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. Oral Health Prev Dent. 2010;8(2):159-64.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (capítulo II).

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

Título da Pesquisa: Avaliação dos efeitos do TiF4 sobre a prevenção da erosão em dentina humana.

Pesquisador: Patricia Moreira de Freitas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 37243014.4.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 919.043

Data da Relatoria: 16/12/2014

Apresentação do Projeto:

Este estudo in vitro tem como objetivo avaliar o efeito do Fluoreto de Titânio (TiF4), em diferentes concentrações e formas de apresentação, na prevenção da lesão de erosão em dentina radicular humana. Setenta fragmentos de dentina radicular humana serão selecionados e divididos aleatoriamente em 07 grupos experimentais (n=10): G1 – nenhum tratamento (controle negativo); G2 - solução de fluoreto estanhoso (controle positivo, pH 4,5); G3 - gel placebo (sem adição de fluoreto); G4 - solução de TiF4 a 1% (pH 1,5); G5 – gel de TiF4 1% (pH 1,5); G6 - solução de TiF4 4% (pH 1,5); e G7 - gel de TiF4 4% (pH 1,5). As amostras serão submetidas a 10 dias de ciclagem erosiva através de imersões alternadas em soluções de ácido cítrico (0,05 M, pH 2,3, 2 minutos, 6x/dia) e remineralizadora. No 5º e 10º dias da ciclagem erosiva, serão realizadas a determinação do desgaste de superfície por meio de perfilometria óptica (em micrometros). Os resultados obtidos serão submetidos a testes de homogeneidade e normalidade para determinação do teste estatístico mais adequado (=5%).

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo in vitro tem como objetivo avaliar o efeito do Fluoreto de Titânio (TiF4), em diferentes concentrações e formas de apresentação, na prevenção da lesão de erosão em dentina radicular humana.

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: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 919.043

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos vinculados ao projeto, pois não é um estudo in vivo ou in situ, mas sim um estudo com dentes extraídos. O estudo contribuirá para o conhecimento dos efeitos do TiF4, em diferentes formas de apresentação e concentrações, sobre a superfície da dentina submetida à erosão, a fim de se determinar a abordagem mais eficaz para a prevenção deste tipo de lesão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa encontra-se bem estruturada, com objetivos bem definidos e metodologia pertinente. Os resultados obtidos serão submetidos a testes de homogeneidade e normalidade para determinação do teste estatístico mais adequado ($\alpha=5\%$) e as conclusões deverão trazer real contribuição para a área de conhecimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

É apresentado a Declaração do Banco de Dentes Humanos da FOUSP (Divisão Dentes Permanentes) se comprometendo a fornecer 50 terceiros molares para o desenvolvimento da pesquisa. Folha de rosto e Projeto Detalhado. O número de sujeitos da pesquisa e da amostras estão devidamente indicados.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não são observadas pendências ou Inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 919.043

SAO PAULO, 17 de Dezembro de 2014

Assinado 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:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (capítulo III).

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

Título da Pesquisa: Efeito do pH do gel de TiF4 a 4% na biocompatibilidade da dentina erodida e no controle da progressão da lesão

Pesquisador: Taís Fonseca Mantilla

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44621515.3.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.121.852

Data da Relatoria: 24/06/2015

Apresentação do Projeto:

Este estudo visa avaliar os efeitos do gel de tetrafluoreto de titânio (TiF4) 4% sobre a dentina erodida e verificar as possíveis implicações do tratamento com o mesmo na adesão celular sobre este substrato. Para tanto, será dividido em duas etapas. Durante a etapa I, 50 amostras de dentina radicular humana previamente erodidas in vitro serão divididas aleatoriamente em 5 grupos experimentais (n=10): C - grupo controle negativo (sem tratamento); P – grupo placebo (01 aplicação de gel sem adição de fluoreto); NaF - grupo NaF com pH original (01 aplicação de gel de NaF a 2% com pH neutro); TiF4 (1,5) – grupo TiF4 com pH 1,5 (01 aplicação de gel de TiF4 a 4% em seu pH original (1,5) e TiF4 (3,5) – grupo TiF4 com pH 3,5 (01 aplicação de gel de TiF4 a 4% com pH ajustado para 3,5). As amostras serão submetidas a 10 dias de ciclagem erosiva pela alternância de imersões em soluções de ácido cítrico (0,05 M, pH 2,3, 2 min, 6x/dia) e remineralizadora. Ao fim da ciclagem, será realizada a perfilometria para acessar os valores de perda de superfície e alterações na rugosidade superficial. Na etapa II, 12 fragmentos de dentina radicular humana (4x4x1 mm) serão divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=3), que serão formados a partir dos resultados da etapa I. O grupo TiF4 que

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: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.121.852

apresentar o melhor resultado quanto à perda de superfície será selecionado. Além deste, serão mantidos os grupos controle (sem tratamento), placebo e NaF. Para o teste de adesão celular, serão plaqueadas 1000 células sobre cada fragmento e após 24 horas, as amostras serão preparadas para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Sobre as eletromicrografias obtidas em MEV será sobreposta uma grade quadriculada (35 quadrados completos) a fim de orientar a contagem das células aderidas sobre as superfícies e, conseqüentemente, permitir a análise de adesão celular. Os resultados de ambas as etapas serão submetidos a testes de homogeneidade e normalidade para determinação do teste estatístico a ser utilizado (nível de significância = 5%).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o possível efeito protetor do gel de TiF4, com e sem o ajuste do pH, na progressão da lesão de erosão em dentina humana previamente erodida;- Determinar a alteração na rugosidade superficial da dentina após o tratamento com os géis fluoretados;- Verificar possíveis implicações dos tratamentos com os géis na adesão celular sobre a dentina radicular humana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos vinculados ao projeto, pois não é um estudo in vivo ou in situ, mas sim um estudo com dentes extraídos.

Benefícios: Este estudo contribuirá para o conhecimento dos efeitos do TiF4, em diferentes pHs, sobre a superfície da dentina submetida à erosão, a fim de se determinar a abordagem mais eficaz para o controle da progressão deste tipo de lesão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está desenhada de forma apropriada e completa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Projeto. Folha de rosto.Cronograma.Termo de doação do Banco de Dentes da FOU SP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais

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: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.121.852

anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" 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, 24 de Junho de 2015

Assinado por:
Décio dos Santos Pinto Junior
(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:** cepfo@usp.br

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (capítulo IV).

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

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito protetor do gel de TiF4 sobre a dentina humana erodida e abrasionada - estudo in situ

Pesquisador: Taís Fonseca Mantilla

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44495515.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.121.871

Data da Relatoria: 24/06/2015

Apresentação do Projeto:

Tendo em vista que não há um consenso quanto à melhor opção de tratamento para inibição da progressão da erosão, os pesquisadores pretendem avaliar se o TiF4 pode ser uma boa alternativa de escolha, devido ao seu efeito na redução da perda mineral, entretanto, ainda não há dados conclusivos sobre seu protocolo ideal de uso, principalmente em função da falta de informação sobre seu tempo de permanência na superfície dental e consequentemente, a longevidade do efeito protetor conferido pelo tratamento. Para subsidiar a elaboração de protocolo de uso do TiF4, o presente 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.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto visa avaliar os efeitos do gel de TiF4 4% sobre a dentina erodida e abrasionada. Para

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:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.121.871

tanto, será
dividido em duas etapas – I (in vitro com componentes in situ) e II (in situ).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O texto do TLE esclarece quanto aos riscos da pesquisa e possíveis benefícios da pesquisa. a linguagem foi adequada e está acessível ao participante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está muito bem descrita. Os autores atenderam as solicitações do parecerista.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados. Foram apresentados TCLE, Projeto de pesquisa, autorização do banco de dentes, folha de rosto assinada pela vice-chefe do departamento e autorização para uso da clínica do LELO.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.121.871

SAO PAULO, 24 de Junho de 2015

Assinado por:
Décio dos Santos Pinto Junior
(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:** cepfo@usp.br

ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (capítulo V).

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: Taís 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:** cepfo@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: cepfo@usp.br

ANEXO E – Autorização para uso de imagem (Figura 4.1).

Credenciada pelo Decreto Federal de 03/07/97 - D. O. U. Nº 126, de 04/07/97

OFÍCIO UNOPAR ED – 021/17

Londrina, 19 de dezembro de 2017.

Prezados autores

Informamos que o Conselho Editorial da Journal of Health Science (e-ISSN 2447-89383) autoriza o uso de imagem à Taís Fonseca Mantilla, autora do artigo: Titanium Tetrafluoride (TiF₄) in the Treatment of Dental Erosion", aceito para publicação no referido periódico (v.19, n.4, 2017).

Trata-se da Figura 1, intitulada: "Hydrolysis of TiF₄ molecules and mechanism of glaze layer formation".

Atenciosamente,

Selma Ellwein
Equipe Técnica

ANEXO F – Autorização para uso de imagem (Figuras 8.2 e 8.3).

26/12/2017

Universidade de São Paulo Mail - Article ID MRT-17-093.R1 - Permission to use figures in thesis

Taís Fonseca Mantilla <tais.mantilla@usp.br>

Article ID MRT-17-093.R1 - Permission to use figures in thesis

4 messages

Taís Fonseca Mantilla <tais.mantilla@usp.br>

Tue, Dec 19, 2017 at 10:26 AM

To: mrt.diaspro@iit.it, alberto.diaspro@iit.it

Cc: pfreitas <pfreitas@usp.br>

Dear Editor-in-Chief,

I, Taís Fonseca Mantilla, author of article ID MRT-17-093.R1, would like to request permission to use figures 2 and 3, previously published in the aforementioned article, in my PhD thesis that will be presented in Portuguese at School of Dentistry of University of São Paulo.

Thank you in advance for your attention.

Sincerely,
Taís Mantilla.

MRT <MRT.diaspro@iit.it>

Tue, Dec 19, 2017 at 11:35 AM

To: Taís Fonseca Mantilla <tais.mantilla@usp.br>

Cc: Alberto Diaspro <Alberto.Diaspro@iit.it>, pfreitas <pfreitas@usp.br>, "pagenest@wiley.com" <pagenest@wiley.com>

Dear

Thank you for your email.

I transfer this info to our offices. From my side it is ok with the clear and correct citation of the journal.

Best wishes also for Xmas

Alberto iPad

[Quoted text hidden]

Genest, Paul-Andre - Hoboken <pagenest@wiley.com>

Tue, Dec 19, 2017 at 1:45 PM

To: MRT <MRT.diaspro@iit.it>, Taís Fonseca Mantilla <tais.mantilla@usp.br>

Cc: Alberto Diaspro <Alberto.Diaspro@iit.it>, pfreitas <pfreitas@usp.br>

Dear Taís,

I am happy to confirm that this is fine. Thank you for properly referring to the source of the figures (i.e. your MRT article) in your thesis.

All the best,

Paul-André

Paul-André Genest, Ph.D.

Senior Editor, Research Publishing, North America

Wiley

111 River Street

Hoboken