UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LÍVIA PICCHI COMAR

Avaliação da interação do TiF_4 com a hidroxiapatita e
esmalte bem como o efeito sobre a des-remineralização
do esmalte dentário com lesão de cárie artificial *in situ*

BAURU
2015

LÍVIA PICCHI COMAR

Avaliação da interação do TiF_4 com a hidroxiapatita e esmalte bem como o efeito sobre a des-remineralização do esmalte dentário com lesão de cárie artificial *in situ*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Magalhães

Versão corrigida

BAURU
2015

C73a Comar, Livia Picchi
Avaliação da interação do TiF_4 com a hidroxiapatita e esmalte bem como o efeito sobre a des-remineralização do esmalte dentário com lesão de cárie artificial *in situ* / Livia Picchi Comar . – Bauru, 2015.

182 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Magalhães

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 114/2011
Data: 27/10/2011

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha família, principalmente aos meus pais **Marco e Renata**, a quem devo tudo o que sou.

Por todos esses anos de esforços e apoio incondicional, principalmente durante toda a minha trajetória acadêmica. Se eu cheguei até aqui, devo tudo isso a vocês.

Nada disso é só por mim, mas também por vocês e para vocês.

Com meu eterno amor!

Construindo a Vida

“Não precisamos realizar grandes obras afim de mostrarmos um grande amor por Deus e pelo próximo. É a intensidade do amor que colocamos em nossos gestos que os torna algo especial para Deus e para os homens.”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Pela essência da vida. Por ser minha base, meu refúgio, minha força, minha saúde e minha esperança. Agradeço a Deus por sua providência Divina e por colocar oportunidades e pessoas tão especiais e tão essenciais no meu caminho.

Obrigada Senhor, pela sua constante presença, por não me abandonar e por me dar a força necessária para nunca desistir!

Aos meus pais, Marco e Renata, e meu irmão Marco Aurélio,

Por todo o apoio, compreensão, paciência e coragem que sempre me proporcionaram. Obrigada por acreditarem em mim, na minha capacidade e principalmente por nunca medirem esforços para que eu pudesse atingir meus sonhos. Nada foi fácil em nossas vidas, mas vocês são meu maior exemplo de caráter, honestidade, força e perseverança. Obrigada por me mostrarem a cada dia que a família que construímos é o que eu tenho de mais precioso, e que nada pode ser mais forte do que isso. Só com vocês ao meu lado é que eu pude chegar até aqui.

Agradeço a Deus todos os dias por Ele ter me dado de presente exatamente vocês. Obrigada por simplesmente existirem, por fazerem de mim quem sou e por me darem a base que eu preciso para sempre seguir em frente!

Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu namorado Leonardo,

Léo, obrigada pela paciência, pela compreensão e por todo o apoio durante todos esses anos. Por compartilhar comigo cada fase dessa longa trajetória, pelo total apoio tanto nos altos como nos baixos momentos. Peço perdão por todos os momentos juntos sacrificados em prol do meu sonho. Obrigada por dividir esse ideal comigo, por se esforçar tanto por nós e por me fazer seguir em frente, independente dos obstáculos encontrados.

Agradeço também a toda sua família, por me acolherem tão bem e por fazer de Bauru minha segunda casa.

Amo vocês!

Aos meus **familiares**,

Avós, tios, tias e primos, pelo apoio e incentivo que me deram e dão até hoje. O amor e carinho de vocês foi o que me deu coragem para correr atrás dos meus ideais.

À minha amiga e companheira de trabalho **Beatriz**,

Tudo começou com uma co-orientação de pesquisa e desde então essa relação acabou se transformando em uma grande amizade e um grande companheirismo. Bia, obrigada por toda a ajuda prestada em todas as etapas desta tese. Por todas as horas de trabalho juntas ou simplesmente pela companhia nas solitárias noites no laboratório. Pela amizade, preocupação, por ser tão prestativa e mostrar que posso sempre contar com você.

Que a gente consiga perpetuar não só a parceria no trabalho, mas também a amizade construída.

Muito obrigada por tudo!

Às minhas queridas amigas: **Cristiane e Senda**,

Por todos os nossos momentos de alegrias, tristezas, preocupação, lazer, trabalho e as conversas, as nossas eternas conversas! Obrigada meninas pela grande amizade, pela parceria, pela paciência e principalmente pelo apoio. A companhia de vocês fez com que tudo parecesse mais leve. A nossa amizade foi muito importante durante esses anos, e espero que vocês consigam atingir tudo o que almejam, e independente do que aconteça, terão sempre um lugar especial no meu coração.

Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos colegas do laboratório de Bioquímica: **Priscila, Cíntia, Luiza, Mileni, Heloisa, Carina, Flávia Levy, Flávia Iano, Aline, Bruno, Vinícius, Talita, Isabela e todos os companheiros de trabalho**,

Pela companhia e amizade durante todo esse tempo. Pelas conversas e pelo convívio diário. Sem dúvida, a companhia de vocês transformaram o nosso ambiente de trabalho muito mais agradável.

Obrigada pela companhia!

Aos alunos de Iniciação Científica: **Milena, Thais, Isabelle, Mariele, Constantino e Vitor,**

Pela companhia nos dias de trabalho e pela ajuda nas pesquisas. Obrigada pela troca de conhecimento e a oportunidade de trabalhar com vocês.

Ao **Prof. Alzir de Azevedo Batista,**

Juntamente com a aluna de pós-graduação **Monize Martins**, pela atenção e disponibilidade durante as análises de espectroscopia de infravermelho, no Departamento de Química da UFSCAR- São Carlos.

Muito obrigada por abrir as portas do seu laboratório e por toda a paciência e atenção dispensada durante nossa visita!

Aos **técnicos do LCE/ UFSCAR- São Carlos,**

Por serem tão prestativos e atenciosos durante a realização das análises de MEV-EDAX e difração de raios-X do projeto.

Aos professores da banca examinadora: **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Jonas de Almeida Rodrigues, Profª Drª Daniela Rios e Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf,**

Por aceitarem tão prontamente ao convite de participar desta banca.

Obrigada pela consideração e toda atenção dispensada.

À **Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf,**

Por me abrir as portas da pesquisa científica, como minha primeira orientadora, teve essencial influência na escolha da minha carreira. Obrigada por ser tão atenciosa, por continuar a abrir as portas do departamento de Bioquímica para meus estudos e por estar sempre disposta a ajudar. Agradeço todo o conhecimento adquirido durante todo o tempo que trabalhamos juntas, tenho uma grande admiração pela sua pessoa e pelo seu trabalho. A sua dedicação e competência são inspiradoras.

Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. **Rodrigo Cardoso de Oliveira**

Pelo convívio de trabalho no departamento de Bioquímica, e por ser sempre tão atencioso e educado. Admiro muito sua competência, paciência e sua seriedade no trabalho.

À especialista de laboratório **Larissa**,

Por toda a ajuda durante as minhas pesquisas, principalmente por realizar todas as análises de fluoreto deste projeto.

Muito obrigada pela sua dedicação e atenção dispensada durante todos esses anos!

Às especialistas do laboratório de Bioquímica **Thelma e Aline**,

Por toda a atenção e esforço em ajudar quando necessário.

Obrigada!

Às secretárias: **Vera, Dalva, Fátima, Leila, Meg e Maristela**,

Por sempre estarem dispostas a ajudar no que fosse preciso em relação a documentos, prazos, relatórios, etc.

Muito obrigada pela atenção.

A todos os **amigos**, de Bauru e Matão, que fizeram parte da minha trajetória e que mesmo à distância, a amizade continua a mesma.

Obrigada pelo carinho, cada um de vocês terá sempre um lugar especial no meu coração.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru-USP**, na pessoa da senhora diretora **Profª Drª Maria Aparecida de Moreira Machado**, e do senhor presidente da **Comissão de Pós-Graduação Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**,

Pela oportunidade em realizar pós-graduação em nível de Doutorado nesta instituição, que tanto amo e da qual tanto me orgulho desde março de 2005, data em que iniciei meu curso de graduação em Odontologia.

Muito obrigada, FOB-USP, por tudo o que me proporcionou durante esses dez anos. Tenho muito orgulho de fazer parte desta família!

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),

Pelo apoio financeiro concedido durante toda a realização deste projeto. À concessão da Bolsa de Doutorado 2011/11263-7; das Bolsas de Iniciação Científica 2010/07001-4 e 2012/00662-0; e do Auxílio à Pesquisa 2012/20698-0.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Pelo apoio financeiro concedido através da Bolsa PIBIC 2012/2013 e Bolsa Produtividade.

À FGM Produtos Odontológicos, representada pela pesquisadora Vanessa Cardoso,

Por toda a atenção e disponibilidade na produção de todos os vernizes odontológicos utilizados neste projeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço em especial minha **Orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Magalhães**,

Carol, eu gostaria de poder expressar aqui com estas palavras toda a admiração que tenho por você, mas acredito que não conseguirei. São quase dez anos trabalhando juntas, então posso dizer que além de professora e orientadora você já foi amiga, irmã e até minha mãe bauruense. Depois de tanto tempo juntas, sou extremamente grata a tudo o que você me proporcionou durante todos esses anos. Todo o meu crescimento profissional, acadêmico, o meu amadurecimento e todo o conhecimento que adquiri devo a você. Obrigada pelas oportunidades que colocou no meu caminho, pelo incentivo em aproveitá-las, por acreditar em mim, na minha competência, no meu trabalho e por sempre me mostrar que eu podia mais do que eu realmente acreditava.

Obrigada por todas as vezes que colocou a mão na massa, por toda a atenção a qualquer hora do dia, por atender prontamente a qualquer ligação, a qualquer hora, por todas as longas noites de intermináveis correções. Obrigada pelas poucas chamadas de atenção devidamente merecidas e principalmente por reconhecer o meu esforço e trabalho. Com você aprendi a ter disciplina e me esforçar ao máximo em buscar aquilo que almejo. Obrigada por todo o apoio todas as vezes que precisei, pela preocupação e pelo seu esforço em fazer tudo dar certo. Ou seja, eu só tenho a agradecer!

Com todo esse meu crescimento pessoal e profissional, também foi crescendo a minha admiração. Admiro sua competência, sua paciência, seu empenho, seu esforço, sua preocupação com os alunos, sua satisfação em dar aula e em ser professora. Você com certeza é meu maior exemplo de profissional, e sempre me esforçarei para ser pelo menos um pouco do que você é. Tenho muito orgulho de representar a sua primeira aluna e de ter o privilégio de acompanhar todo o prestígio que você desfruta oriundo de tudo isso.

Carol, eu sou extremamente grata por tudo, tenho um grande carinho por você e espero que ainda possamos trabalhar juntas durante muito tempo, afinal para mim, essa parceria é eterna!

MUITO OBRIGADA POR TUDO SEMPRE!

Às alunas de Iniciação Científica **Beatriz, Luana e Jéssica**, cujas pesquisas fizeram parte deste projeto,

Meninas, muito obrigada por todo o esforço e dedicação que vocês dispenderam para a realização das pesquisas. Eu tive a sorte de ter no meu caminho, alunas tão dedicadas, competentes e esforçadas. Se não fosse pelo empenho de vocês, este projeto não teria tido o sucesso que teve em sua realização.

Muito obrigada por tudo, e contem comigo para o que precisarem sempre, vocês moram em meu coração.

Aos **voluntários** que participaram do protocolo *in situ*,

Agradeço imensamente aos voluntários: Jéssica, Isabelle, Priscila, Flávia, Talita, Cíntia S., Cíntia T., Ana, Milena, Thais, Maiara G., Maiara M., Giovanna, Marina, Isabela, Caroline, Gerson, Marcelo e Joselene, que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa. Obrigada por se dedicarem ao experimento, por atenderem às nossas instruções e por sempre estarem disponíveis e prontos a ajudar. Sem dúvida, se não fosse por vocês, este trabalho não teria acontecido.

Muito obrigada a todos, de coração!

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.”

René Descartes

“A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham, ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.”

Leonardo da Vinci

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos, é o inatingível. Para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes, a oportunidade.”

Victor Hugo

RESUMO

Este estudo teve como o objetivo avaliar *in vitro* o efeito do tratamento com vernizes de tetrafluoreto de titânio (TiF_4) e fluoreto de sódio (NaF) (ambos com 0,95%, 1,95% e 2,45% F) sobre 1) a quantidade de F^- liberada em água deionizada e saliva artificial, por período de 12h; 2) os tipos de compostos formados pela interação com a hidroxiapatita (neste caso, com soluções ao invés dos vernizes); 3) a porcentagem de elementos presentes na superfície do esmalte bovino e humano, hígidos (H) e desmineralizados (DES); 4) a quantidade de CaF_2 sobre a superfície do esmalte bovino e humano, H e DES. Adicionalmente, 5) o efeito dos vernizes de TiF_4 e NaF sobre a remineralização do esmalte bovino, em diferentes condições *in situ*, foi avaliado. Para etapa 1, a liberação de F^- foi quantificada por eletrodo de íon específico. Na etapa 2, pó de HAP produzido por precipitação foi tratado com soluções fluoretadas. Os compostos formados foram avaliados por espectroscopia de infravermelho e difração de raios-X. Nas etapas 3 e 4, as superfícies tratadas com os vernizes foram analisadas por MEV- EDAX e por biópsias básicas, respectivamente. Vinte voluntários (n final=17) participaram do ensaio *in situ* com 3 fases cruzadas, os quais utilizaram aparelhos palatinos contendo amostras de esmalte bovino desmineralizadas tratadas com vernizes de TiF_4 , NaF ou placebo. As amostras foram submetidas a diferentes condições de des-remineralização (presença ou não de tela plástica; variação da frequência de aplicação de sacarose 20%) e à exposição ao dentifrício fluoretado. O volume mineral e profundidade da lesão foram avaliados por microradiografia transversal (TMR). 1) Os vernizes de TiF_4 (1,95 e 2,45% F) liberaram mais fluoreto comparados aos vernizes de NaF tanto em água como em saliva artificial, sendo a diferença significativa nas primeiras 6h de contato ($p<0,0001$). 2) O TiF_4 causou alteração na estrutura da HAP e induziu à formação de novos compostos como TiO_2 e $\text{Ti}(\text{HPO}_4)_2$. 3) Os vernizes de TiF_4 induziram à formação de uma camada de revestimento sobre a superfície do esmalte com microfissuras em sua extensão, rica em Ti e F. 4) Adicionalmente, o TiF_4 (1,95 e 2,45% F) produziu maior deposição de fluoreto alcali-solúvel que o NaF , especialmente sobre o esmalte bovino em comparação ao humano. Maior deposição de fluoreto foi vista também para o esmalte DES em comparação ao H ($p<0,0001$). 5) O verniz de TiF_4 (2,45% F) aumentou significativamente a remineralização de lesões artificiais de cárie em relação ao NaF , independente da severidade do desafio

cariogênico *in situ*. Já o efeito remineralizante do NaF foi dependente da condição cariogênica ($p < 0,0001$). Portanto, o verniz de TiF_4 é promissor na remineralização de lesões iniciais de cárie dentária, sendo este efeito relacionado à formação de uma camada superficial protetora rica em compostos à base de Ti e à maior deposição de fluoreto no esmalte.

Palavras-chave: Cárie dentária. Desmineralização dentária. Fluoretos tópicos. Remineralização dentária. Titânio.

ABSTRACT

Interaction of TiF₄ varnish with enamel and hydroxyapatite and its effect on the de-remineralization of pre-demineralized enamel *in situ*

This study aimed to evaluate the *in vitro* effect of titanium tetrafluoride (TiF₄) and sodium fluoride (NaF) varnishes (both with 0.95%, 1.95%, 2.45% F) treatment on the 1) F⁻ release in deionized water and artificial saliva for 12h period; 2) types of compounds formed by the interaction with hydroxyapatite (in this case, solutions were tested instead of varnishes); 3) percentage of the elements on bovine and human, sound (S) and demineralized (DE), enamel surface; 4) F⁻ uptake (CaF₂ deposition) on human and bovine, S and DE, enamel surface. Additionally, 5) the effect of TiF₄ and NaF varnishes on bovine enamel remineralization, in different *in situ* conditions, was assessed. In study 1, the F⁻ release was measured by ion specific electrode. In study 2, HAP powder, produced by precipitation, was treated with fluoride solutions. The compounds formed were evaluated by infrared spectroscopy and X-ray diffraction. In studies 3 and 4, the surfaces treated with the varnishes were analyzed by SEM-EDAX and basic biopsies, respectively. Twenty volunteers (final n=17) participated of the *in situ* study with 3 crossover phases, in which they wore palatal appliances containing bovine demineralized enamel samples treated with TiF₄, NaF or placebo varnishes. The samples were subjected to different de-remineralization conditions (presence or absence of plastic mesh and variation in frequency of application of 20% sucrose) and exposure to fluoride dentifrice. The mineral content and lesion depth were evaluated by transverse microradiography (TMR). 1) The TiF₄ varnishes (1.95 and 2.45% F) released more F⁻ compared to NaF varnishes in both water and artificial saliva, and significant difference was found in the first 6h (p<0.0001). 2) The TiF₄ caused change in the HAP structure and induced the formation of new compounds such as TiO₂ and Ti(HPO₄)₂. 3) The TiF₄ varnishes induced the formation of a coating layer rich in Ti and F, with microcracks in its extension, on the enamel surface. Additionally, TiF₄ (1.95 and 2.45% F) provided higher deposition of alkali-soluble Fluoride than NaF, especially on bovine enamel compared to human enamel. 4) Higher fluoride deposition was also seen on DE compared to S enamel (p<0.0001). 5) The TiF₄ varnish (2.45% F) significantly

increased the remineralization of artificial carious lesions compared to NaF, regardless of the severity of cariogenic challenge *in situ*. On the other hand, the remineralizing effect of NaF was dependent on the cariogenic condition ($p < 0.0001$). Therefore, the TiF_4 varnish is promising agent in the remineralization of incipient dental caries lesions, whose effect is related to the formation of a protective surface layer rich in Ti compounds and to the increase in fluoride deposition on the tooth enamel.

Key-words: Dental Caries. Titanium. Tooth Demineralization. Topical Fluorides. Tooth Remineralization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1.	Vernizes utilizados: TiF_4 a 1,55% (0,95% F^- , pH 1); TiF_4 a 3,10% (1,90% F^- , pH 1); TiF_4 a 4% (2,45 % F^- , pH 1); NaF a 2,10% (0,95% F^- , pH 5); NaF a 4,20% (1,90% F^- , pH 5); NaF a 5,42% (2,45% F^- , pH 5), respectivamente	67
Figuras 2 e 3.	Preparação das placas de acrílico fixadas às tampas dos frascos de poliestireno utilizando-se fios de nylon e cera utilidade	68
Figuras 4 a 6.	Sequência de aplicação de verniz na placa de acrílico e imersão da amostra em água deionizada ou saliva artificial no interior do frasco de poliestireno	69
Figuras 7.	Obtenção do pó de HAP pelo método de precipitação	70
Figuras 8 a 10.	Sequência da filtragem, obtenção do pó de HAP e separação dos grânulos com a peneira	71
Figuras 11 e 12.	Obtenção do precipitado após o tratamento da HAP com TiF_4 a 4% e obtenção de grãos com 75 μm de diâmetro através de peneiras granulométricas, respectivamente	72
Figuras 13 a 15.	Amostras preparadas com KBr na forma de pastilhas; pastilha em posição para análise; equipamento utilizado para a análise por espectroscopia de infravermelho, respectivamente	73
Figuras 16 a 18.	Sequência de corte das amostras de esmalte bovino. Imagens da cortadeira ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) e da amostra de esmalte bovino (4 mm x 4 mm)	75
Figuras 19 a 21.	Corte transversal à coroa do dente humano para se obter rodela de esmalte de 3 mm	75
Figuras 22 e 23.	Corte das rodela para obtenção dos blocos de esmalte de 3 mm x 3 mm	76
Figuras 24 e 25.	Planificação da dentina utilizando uma politriz metalográfica	76

Figuras 26 e 27.	Polimento de uma amostra de esmalte bovino (4 mm x 4 mm) e humano (3 mm x 3 mm), respectivamente.....	77
Figura 28.	Imagem de microradiografia de uma amostra de esmalte humano representativa do piloto de 12 dias em solução desmineralizante.....	78
Figuras 29 a 31.	Aplicação do verniz na amostra de esmalte seguida de armazenamento da mesma em saliva artificial em potes individuais	80
Figuras 32 e 33.	Remoção do verniz da amostra através de lâmina de bisturi e cotonete® embebido em solução de acetona, respectivamente.....	80
Figuras 34 e 35.	Amostras de esmalte metalizadas com ouro e MEV Inspect™ S50 (LCE- DeMa- UFSCAR), respectivamente.....	81
Figuras 36 a 39.	Sequência de preparo da amostra de esmalte para a realização da biópsia básica.....	83
Figuras 40 a 42.	Amostra imersa em 1 ml de KOH no interior de um pote J10; retirada da amostra do pote para posterior neutralização com 1 ml de TISAB II (HCl)	84
Figuras 43 e 44.	Amostra de esmalte hígido com 1/3 da superfície protegida e amostra de esmalte após indução de cárie artificial, apresentando lesão de mancha branca em 2/3 da superfície, respectivamente	86
Figuras 45 e 46.	Imagens representativas de TMR das amostras desmineralizadas <i>in vitro</i> no teste piloto	86
Figura 47.	Amostra desmineralizada <i>in vitro</i> com 2/3 da superfície de esmalte protegida (controle DES em azul).....	87
Figura 48.	Aparelho intrabucal palatino confeccionado em resina acrílica	88
Figura 49.	Aparelho palatino pronto com as 8 amostras acopladas de acordo com as diferentes condições (2 amostras/condição) de des-remineralização <i>in situ</i>	89
Figura 50.	Aparelho palatino após experimento <i>in situ</i>	91

Figuras 51 e 52. Amostras posicionadas e fixadas de forma a englobar as 3 áreas da amostra e amostras cortadas em três fatias iguais, respectivamente	91
Figuras 53 a 56. Fatia de uma amostra fixada na placa de acrílico circular; polimento manual da fatia com lixa de granulação 600; polimento final e fatia com espessura de aproximadamente 90 µm, respectivamente	91
Figuras 57 a 59. Porta-amostra completo com 36 fatias; cassete contendo porta amostra+ <i>stepwedge</i> e o conjunto envolvido em saco preto em posição para ser irradiado, respectivamente.....	93
Figuras 60 e 61. Placa de vidro revelada e microscópio (Zeiss, Alemanha) com câmera CCD (Canon, Japão) acoplada ao computador (Softwares, Inspektor Research System bv, Holanda)	94
Figura 62. Imagem representativa de uma análise completa de TMR	95
Figura 63. Média da liberação cumulativa de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em água deionizada nos diferentes períodos experimentais	99
Figura 64. Média da liberação cumulativa de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em saliva artificial nos diferentes períodos experimentais	100
Figura 65. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com TiF ₄ a 1,55%.....	103
Figura 66. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com TiF ₄ a 3,10%.....	103
Figura 67. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com TiF ₄ a 4,00%.....	104
Figura 68. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com NaF a 2,10%.....	104
Figura 69. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com NaF a 4,20%.....	105
Figura 70. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com NaF a 5,42%.....	105

Figura 71.	Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com água (controle).....	106
Figura 72.	Difratograma das amostras de HAP tratadas com TiF_4 a 1,55%.....	108
Figura 73.	Difratograma das amostras de HAP tratadas com TiF_4 a 3,10%.....	108
Figura 74.	Difratograma das amostras de HAP tratadas com TiF_4 a 4,00%.....	109
Figura 75.	Difratograma das amostras de HAP tratadas com NaF a 2,10%.....	109
Figura 76.	Difratograma das amostras de HAP tratadas com NaF a 4,20%.....	110
Figura 77.	Difratograma das amostras de HAP tratadas com NaF a 5,42%.....	110
Figura 78.	Difratograma das amostras de HAP tratada com água (controle).....	111
Figuras 79.	Imagens de MEV representativas do grupo 1 (verniz de TiF_4 a 1,55%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x.....	112
Figuras 80.	Imagens de MEV representativas do grupo 2 (verniz de TiF_4 a 3,10%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x.....	113
Figuras 81.	Imagens de MEV representativas do grupo 3 (verniz de TiF_4 a 4,00%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x.....	114
Figuras 82.	Imagens de MEV representativas do grupo 4 (verniz de NaF a 2,10%). a) esmalte hígido 10.000x. b) esmalte hígido 30.000x. c) esmalte desmineralizado 10.000x. d) esmalte desmineralizado 30.000x. Imagens com maior aumento foram inseridas, pois as com menor aumento não mostravam nenhuma alteração morfológica	115

Figuras 83.	Imagens de MEV representativas do grupo 5 (verniz de NaF a 4,20%). a) esmalte hígido 10.000x. b) esmalte hígido 40.000x. c) esmalte desmineralizado 10.000x. d) esmalte desmineralizado 40.000x. Imagens com maior aumento foram inseridas, pois as com menor aumento não mostravam nenhuma alteração morfológica 116
Figuras 84.	Imagens de MEV representativas do grupo 6 (verniz de NaF a 5,42%). a) esmalte hígido 10.000x. b) esmalte hígido 40.000x. c) esmalte desmineralizado 10.000x. d) esmalte desmineralizado 40.000x. Imagens com maior aumento foram inseridas, pois as com menor aumento não mostravam nenhuma alteração morfológica, especialmente no caso do esmalte desmineralizado 117
Figuras 85.	Imagens de MEV representativas do grupo 7 (controle). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x 118
Figura 86.	Imagens de MEV representativas do grupo 1 (verniz de TiF_4 a 1,55%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x 121
Figura 87.	Imagens de MEV representativas do grupo 2 (verniz de TiF_4 a 3,10%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x 122
Figura 88.	Imagens de MEV representativas do grupo 3 (verniz de TiF_4 a 4,00%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x 123
Figura 89.	Imagens de MEV representativas do grupo 4 (verniz de NaF a 2,10%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x 124
Figura 90.	Imagens de MEV representativas do grupo 5 (verniz de NaF a 4,20%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x 125

Figura 91.	Imagens de MEV representativas do grupo 6 (verniz de NaF a 5,42%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x.....	126
Figura 92.	Imagens de MEV representativas do grupo 7 (controle). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x	127

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADROS

- Quadro 1.** Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento, submetida à condição 1 *in situ* 138
- Quadro 2.** Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento submetida à condição 2 *in situ* 139
- Quadro 3.** Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento submetida à condição 3 *in situ* 140
- Quadro 4.** Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento submetida à condição 4 *in situ* 141

- TABELAS

- Tabela 1.** Média e d.P. da liberação pontual de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em água deionizada nos diferentes períodos avaliados..... 101
- Tabela 2.** Média e d.P. da liberação pontual de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em saliva artificial nos diferentes períodos avaliados 102
- Tabela 3.** Média e d.P. da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de esmalte **BOVINO** hígido e desmineralizado tratadas com diferentes vernizes fluoretados 120
- Tabela 4.** Média e d.P. da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de esmalte **HUMANO** hígido e desmineralizado tratadas com diferentes vernizes fluoretados 129
-
-

Tabela 5.	Média e d.P. da quantidade de fluoreto álcali-solúvel ($\mu\text{gF}/\text{mm}^2$) sobre as amostras de esmalte BOVINO hígidas e desmineralizadas	131
Tabela 6.	Média e d.P. da quantidade de fluoreto álcali-solúvel ($\mu\text{gF}/\text{mm}^2$) sobre as amostras de esmalte humano hígidas e desmineralizadas	132
Tabela 7.	Média e d.P. dos valores da diferença da perda mineral integrada ($\Delta\Delta Z$, % vol. min. x μm) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização <i>in situ</i>	134
Tabela 8.	Média e d.P. dos valores da diferença da profundidade da lesão (ΔP , μm) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização <i>in situ</i>	135
Tabela 9.	Média e d.P. dos valores da diferença da perda mineral média (ΔR , % vol.min) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização <i>in situ</i>	136
Tabela 10.	Média e d.P. dos valores da diferença da espessura e conteúdo mineral máximo da camada superficial (ΔS e ΔZ_{max} , μm e %) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização <i>in situ</i>	137

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	VERNIZES FLUORETADOS	31
2.1.1	Estudos <i>in vitro</i>	35
2.1.2	Estudos <i>in situ</i>	40
2.1.3	Estudos clínicos.....	42
2.1.4	Revisões de Literatura e Revisões Sistemáticas	48
2.2	TETRAFLUORETO DE TITÂNIO (TiF ₄)	53
3	PROPOSIÇÃO	61
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	65
5	RESULTADOS	97
6	DISCUSSÃO	143
7	CONCLUSÕES	157
	REFERÊNCIAS	161
	ANEXOS	175

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, têm-se observado ganhos nos níveis de saúde bucal na maioria dos países industrializados e em desenvolvimento, como o Brasil, com expressiva redução na prevalência e na severidade das lesões cariosas, isto é, redução de lesões cavitadas (PETERSSON; BRATHALL, 1996; NARVAI et al., 2006; BÖNECKER et al., 2010; SUNDELL; ULLBRO; KOCH, 2013). A partir da constatação da queda nos níveis de cárie dentária, muito tem sido discutido quanto aos fatores associados a esta doença, dentre eles os fatores sociais e comportamentais (PERES; BASTOS; LATORRE, 2000; SABAN et al., 2014; RONCALLI et al., 2015).

Apesar da expressiva redução na prevalência das lesões cariosas, esse declínio ocorreu acompanhado de um fenômeno conhecido como polarização da doença que consiste na concentração da maior parte das lesões cariosas ou das necessidades de tratamento odontológico em uma pequena parcela da população (WEYNE, 1997; MARTHALER, 2004; PETERSEN et al., 2005; JIANG et al., 2014). Como consequência, as necessidades de tratamento também passaram a se concentrar nesta pequena parcela da população, caracterizando significativas inequidades em saúde (PATTUSSI et al., 2001; CARDOSO et al., 2003; NARVAI et al., 2006; SARUMATHI et al., 2013), fato que requer a atenção de autoridades e adequadas intervenções de saúde pública (PATTUSSI et al., 2001; ARRUDA et al., 2012; SUNDELL; ULLBRO; KOCH, 2013).

Neste contexto, diversos tipos de agentes fluoretados têm sido pesquisados para a “prevenção” e controle da cárie dentária (PETERSSON, 1976; ARENDS; LODDING; PETERSSON, 1980; OGAARD; SEPPÄ; RÖLLA, 1994; TEN CATE, 1997; JACOBSEN; YOUNG, 2003; MARINHO et al., 2004; TEN CATE, 2004; LEE et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; WEYANT et al., 2013; CAREY, 2014).

O mecanismo de ação do fluoreto convencional, como NaF e AmF, quando utilizado em alta concentração, é atribuído a uma precipitação de fluoreto de cálcio (CaF_2) sobre a superfície dentária, que serve como uma barreira mecânica contra o ataque ácido (SAXEGAARD; RÖLLA, 1988; OGAARD; SEPPÄ; RÖLLA, 1994; VOGEL, 2011). Além do efeito mecânico, o cálcio e fluoreto liberados na interface entre biofilme e esmalte dentário, durante as quedas de pH, podem reduzir

a desmineralização e aumentar a remineralização do tecido, quando o pH retorna ao valor inicial, induzindo incorporação de fluoreto à hidroxiapatita, o que pode tornar o substrato dentário mais resistente aos desafios cariogênicos subsequentes (TEN CATE, 1997; FEATHERSTONE, 1999; TEN CATE, 2004; ROBINSON, 2009; BUZALAF et al., 2011; TEN CATE; 2013; CAREY; 2014). A formação desta camada de CaF_2 e seu efeito protetor sobre a desmineralização dependem do pH, da concentração de fluoreto e da frequência de aplicação do agente (SAXEGAARD; RÖLLA, 1988; BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008).

Os fluoretos convencionais já foram testados nas formas de dentifrícios, soluções, géis, mousses e vernizes. Em relação ao veículo, o verniz apresenta algumas vantagens, uma vez que se adere à superfície dentária, permitindo um longo tempo de contato entre o agente fluoretado e o esmalte, além de apresentar uma baixa toxicidade, ser bem tolerado e aceito pelo paciente (BELTRÁN-AGUILAR; GOLDSTEIN; LOCKWOOD, 2000; SEPPÄ, 2004; OLYMPIO et al., 2009; DU et al., 2012; DIVARIS; PREISSER; SLADE, 2013; MARINHO et al., 2013).

Outros fluoretos não convencionais (fluoretos contendo metais polivalentes) têm sido testados com o objetivo de aumentar a eficácia dos produtos fluoretados na prevenção da desmineralização dentária, como o SnF_2 que foi recentemente incorporado a um dentifrício comercial no Brasil, e o TiF_4 que ainda está indisponível no Brasil e está em processo de patente pelo nosso grupo de pesquisa.

Vários estudos *in vitro* e *in situ* têm mostrado que o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), na forma de solução em uma concentração variando entre 0,1-4%, é mais eficaz que outros sais fluoretados sobre o processo de des-remineralização erosiva e cariogênica do esmalte dentário (MUNDORFF; LITTLE; BIBBY, 1972; WEFEL, 1982; BÜYÜKYILMAZ; OGAARD; RÖLLA, 1997; CHEVITARESE et al., 2004; VIEIRA; RUBEN; HUYSMANS, 2005; EXTERKATE; TEN CATE, 2007; MAGALHÃES et al., 2008a; 2008b; WIEGAND; MAGALHÃES; ATTIN, 2010; VIEIRA et al., 2011; COMAR et al., 2012; STENHAGEN et al., 2013; AUSTIN et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

A melhor eficácia do TiF_4 pode ser devido a um possível efeito adicional do titânio. Os íons titânio têm um papel importante na prevenção da desmineralização, uma vez que hipoteticamente poderiam substituir o cálcio da estrutura da apatita, mostrando uma tendência a se complexarem com os grupos

fosfato formando uma camada tipo “glaze” sobre a superfície, a qual é ácido-resistente (MUNDORFF; LITTLE; BIBBY, 1972; BÜYÜKYILMAZ; OGAARD; RÖLLA, 1997; TEZEL; ERGÜCÜ; ONAL, 2002; RIBEIRO; GIBSON; BARBOSA, 2006; YU et al., 2010). Além disso, é sugerido que a solução de TiF_4 interage com a superfície dentária e, devido ao baixo pH do agente, induza a um aumento na deposição de fluoreto no esmalte (MUNDORFF; LITTLE; BIBBY, 1972; GU; LI; SÖREMARK, 1996; WIEGAND; MAGALHÃES; ATTIN, 2010).

Esta ação poderia ser potencializada se este composto fosse aplicado na forma de verniz ao invés de solução, devido à adesão do verniz à superfície dentária, permitindo que o TiF_4 possa interagir com o esmalte dentário por mais tempo. Além disso, a aplicação do verniz minimizaria possíveis efeitos deletérios do baixo pH sobre a mucosa (AL-AHJ et al., 2013), uma vez que a atuação deste agente é localizada no dente em comparação à solução para bochecho. Um estudo *in vitro*, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou que o verniz de TiF_4 a 4% parece ter um efeito semelhante aos outros vernizes fluoretados comerciais (NaF) na prevenção da desmineralização do esmalte dentário bovino, porém em contraste, apresentou um melhor efeito na remineralização superficial da lesão de cárie artificial em esmalte (MAGALHÃES et al., 2008a).

Mais recentemente, um estudo *in situ* mostrou que o verniz e a solução de TiF_4 parecem ser promissores na prevenção da desmineralização superficial e de subsuperfície, porém o protocolo experimental utilizado não permitiu uma adequada remineralização de subsuperfície para uma efetiva comparação entre os produtos (COMAR et al., 2012). O estudo mostrou um resultado interessante do ponto de vista clínico; o acúmulo de biofilme (14 dias *in situ*, com tela plástica sem sacarose) impede a remineralização do esmalte, mesmo com a aplicação do verniz fluoretado, o que aponta para a necessidade de associar o tratamento às medidas preventivas como o controle da higienização bucal. Dessa forma, seria interessante testar o efeito deste fluoreto em condições variando desde ausência de biofilme até o biofilme cariogênico (com sacarose), para simularmos todas as condições que podem ocorrer na clínica (desde o paciente controlado até o paciente sem controle e com alta atividade de cárie).

Adicionalmente, apesar dos estudos mostrarem resultados promissores com o uso do TiF_4 , ainda não há dados suficientes e esclarecedores, do ponto de vista químico, sobre o mecanismo de ação deste sal fluoretado. Dessa forma, as

análises da liberação de F^- pelos vernizes contendo diferentes concentrações de TiF_4 bem como a análise do efeito do TiF_4 sobre a estrutura da hidroxiapatita (HAP), por espectroscopia de infravermelho e difração de raios-X, seriam importantes para o entendimento indireto da formação da camada ácido-resistente; informações que podem ser associadas à microscopia eletrônica de varredura com detector de microanálise EDAX e à análise de deposição de CaF_2 por biopsia básica.

Outro aspecto importante que precisa ser estudado é se há diferença de efeito do verniz de TiF_4 sobre o esmalte humano em comparação ao bovino, uma vez que estudo prévio mostrou que a solução de TiF_4 tem atuação diferenciada entre os dois substratos para o controle da erosão dentária (HOVE; YOUNG; TVEIT, 2007). É importante que se teste produtos com diferentes concentrações de fluoreto em termos de liberação de F^- e reação com o esmalte, uma vez que estudo prévio mostrou que quanto menor a concentração do F^- em solução, menor foi o efeito do TiF_4 na prevenção da desmineralização erosiva (VIEIRA et al., 2011).

Com base no exposto acima e dando sequência à linha de pesquisa do nosso grupo, o objetivo desta tese foi avaliar *in vitro* (1) a quantidade de fluoreto (F^-) liberada pelos vernizes de TiF_4 e NaF, com diferentes concentrações de fluoreto, por um período de até 12h em água deionizada e saliva artificial; (2) os tipos de compostos formados pela interação das soluções de TiF_4 e NaF (com diferentes concentrações de fluoreto) com a HAP assim como (3) a qualidade e quantidade de elementos presentes na superfície do esmalte bovino e humano, hígido e desmineralizado, tratados com os vernizes contendo TiF_4 e NaF; (4) a formação de CaF_2 sobre a superfície do esmalte bovino e humano, hígido e desmineralizado, após a aplicação dos vernizes contendo TiF_4 e NaF; (5) comparar *in situ* o efeito dos vernizes de TiF_4 e NaF na remineralização do esmalte dentário bovino, alterando as condições de des-remineralização para simular pacientes com baixa e alta atividade de cárie.

2 Revisão de **Literatura**

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VERNIZES FLUORETADOS

A cárie dentária é uma lesão resultante de consecutivos ciclos de des-mineralização da estrutura dentária que ocorrem pela presença de ácidos oriundos do metabolismo microbiano na interface entre dente e biofilme (TEN CATE et al., 2003; TAKAHASHI; NYVAD, 2011; ROŠIN-GRGET et al., 2013; TEN CATE, 2013). O primeiro sinal clínico da cárie dentária é a lesão de mancha branca (TEN CATE et al., 2003; KIDD; FEJERSKOV, 2004; TEN CATE, 2013), conhecida como uma lesão de subsuperfície, que apresenta a camada superficial mais mineralizada (conhecida como “camada superficial pseudo-intacta”), sendo esta resultado da reprecipitação (remineralização) de minerais dissolvidos da subsuperfície, sendo este processo de des-remineralização dinâmico, caracterizado pelo fluxo constante de íons cálcio e fosfato para dentro e fora do esmalte (ROŠIN-GRGET et al., 2013).

A lesão de mancha branca pode apresentar-se ativa, mostrando uma superfície áspera e opaca, ou inativa, quando a superfície do esmalte se apresenta lisa e brilhante (ZERO, 1999). Se o desafio cariogênico permanecer constante, este sinal clínico inicial pode progredir para a cavitação (KIDD, 2004); portanto, a intervenção precoce é de suma importância mediante a possibilidade de transformar lesões ativas em inativas, reduzindo assim o risco de cavitação e a necessidade de intervenções mais agressivas (restaurações) (DU et al., 2012; TEN CATE, 2013). O diagnóstico precoce das lesões de mancha branca e a utilização de terapias não invasivas são estratégias importantes para o controle da progressão da lesão de cárie (STAHL; ZANDONA, 2007), além disso, reduz tempo e custo, representando um grande escoamento de recursos para os sistemas de saúde (MARINHO et al., 2013).

A utilização do fluoreto (F^-) tópico como agente coadjuvante efetivo na “prevenção” e controle das lesões cariosas já é estabelecido na literatura há décadas (TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991; TEN CATE, 2004; BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008; PESSAN; TOUMBA; BUZALAF, 2011; WEYANT et al., 2013; CAREY, 2014). De modo geral, o mecanismo de ação do fluoreto na prevenção da cárie consiste no aumento da remineralização das lesões iniciais e na

diminuição da desmineralização, inibindo o início e a progressão das lesões (BUZALAF et al., 2011; TEN CATE, 2013).

Diferentes tipos de veículos são utilizados para a aplicação do fluoreto, entre eles existem os de uso caseiro contendo baixa concentração F^- (dentifrícios e enxaguatórios bucais, até 5000 ppm F^-) e os de aplicação profissional contendo alta concentração de F^- (géis, *mousses* e vernizes, 9000 a 56000 ppm F^-) (TEN CATE, 2004; MARINHO et al., 2004; BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008; TENUTA; CURY, 2010; WEYANT et al., 2013; TEN CATE, 2013; CAREY, 2014).

Os agentes fluoretados têm a capacidade de liberar íons fluoreto, promovendo assim a captação de fluoreto pelo biofilme e tecido dentários e, então, a consequente eficácia clínica (OGAARD; SEPPÄ; RÖLLA, 1994; CURY, TENUTA, 2009; ROŠIN-GRGET et al., 2013). A eficácia dos agentes está diretamente relacionada à concentração de F^- presente, ao tempo de contato do produto com a estrutura dentária e à frequência de aplicação (BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008; CARVALHO et al., 2010).

Os vernizes fluoretados foram desenvolvidos e introduzidos na prática clínica em alguns países da Europa na década de 60, com o objetivo de prolongar o tempo de contato entre fluoreto e a superfície dentária limpa, aumentando assim a incorporação de F^- nas camadas superficiais do dente (CLARK, 1982; PETERSSON; TWETMAN; PAKHOMOV, 1997). O primeiro verniz fluoretado foi introduzido no mercado em 1964 por Schmidt, com o nome comercial de Duraphat® (Woelm Pharma Co, Eshwege, Alemanha), sendo este composto por resina natural, base de colofônia neutra, contendo 5% em peso de fluoreto de sódio (2,26% F^-) dissolvido em etanol (STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001).

Um segundo produto foi introduzido por Arends e Schuthof em 1975, com o nome comercial de Fluor Protector® (Vivadent; Schaan; Liechtenstein) (ARENDS; SCHUTHOF, 1975). O Fluor Protector® é composto por uma resina transparente à base de poliuretano e 1% de fluoreto de silano (0,1% F^-) (STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001). Alguns trabalhos mostraram que as propriedades ácidas deste verniz são capazes de aumentar a captação de fluoreto pelo esmalte (DE BRUYN; ARENDS, 1987; ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1990).

Desde então, a utilização dos vernizes fluoretados para a prevenção da cárie dentária tem sido muito estudada (CLARK, 1982; STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001; MARINHO et al., 2002; PETERSSON et al., 2004; MOBERG

SKÖLD et al., 2005; CARVALHO et al., 2010; MARINHO et al., 2013). A vantagem deste produto, além da alta concentração de fluoreto utilizada, é que ele tem a propriedade de se aderir e permanecer em contato com a estrutura dentária por um período relativamente maior (até 12 horas) em relação aos outros produtos fluoretados, atuando como um reservatório de fluoreto de liberação lenta, podendo promover uma maior incorporação de fluoreto à estrutura dentária (PETERSSON, 1993; OGAARD; SEPPÄ; RÖLLA, 1994). O fluoreto é depositado principalmente como fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície dentária, criando um reservatório de íons fluoreto que são lentamente liberados durante os processos de desmineralização, e então incorporados à apatita dentária (TEN CATE, 1997; CURY, TENUTA, 2009; CAREY, 2014).

O tratamento com vernizes fluoretados é indicado para pacientes que apresentam ou moderada ou alta atividade de cárie dentária, principalmente em programas comunitários preventivos (PETERSSON; TWETMAN; PAKHOMOV, 1997; ADA COUNCIL, 2006). O verniz também é utilizado frequentemente na clínica para a remineralização de lesões de mancha branca. Muitos trabalhos mostraram que os vernizes fluoretados podem reverter e reduzir o processo de desmineralização de lesões iniciais de cárie, quando combinados a outras medidas preventivas, como controle da dieta e do biofilme dentário (SEPPÄ; LUOMA; HAUSEN, 1982; SEPPÄ; PÖLLÄNEN, 1987; SEPPÄ, 1991; KHATTAK; CONRY; KO, 2005; WEINTRAUB et al., 2006; LAWRENCE et al., 2008; SLADE et al., 2011; DU et al., 2012; MARINHO et al., 2013).

Além disso, alguns estudos mostraram que o verniz fluoretado apresenta uma técnica de aplicação simples e é um veículo seguro, pois após sua aplicação, foram encontradas baixas concentrações de fluoreto no plasma e urina. Além disto, é bem tolerado pelos pacientes, o que ainda favorece a sua aplicação em crianças e pacientes jovens (BAWDEN, 1998; OLYMPIO et al., 2009; DU et al., 2012; DIVARIS; PREISSER; SLADE, 2013; MILGROM et al., 2014).

Abaixo descreveremos trabalhos em que foram utilizados vernizes fluoretados, principalmente os que são à base de fluoreto de sódio (NaF), para a prevenção/controle de lesões de cárie dentária bem como para o tratamento das lesões iniciais. Os trabalhos serão divididos em estudos *in vitro*, *in situ*, clínicos e revisões sistemáticas. Logo após, para finalizar esta revisão bibliográfica, serão descritos trabalhos em que foram testados o agente fluoretado de interesse desta

pesquisa, o tetrafluoreto de titânio (TiF₄), na prevenção da desmineralização relacionada à cárie dentária. A busca dos artigos foi realizada pelo site do pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) utilizando como palavras-chaves: *topical fluorides, dental caries, fluoride varnishes, sodium fluoride, in vitro, in situ, in vivo, clinical trial, review, titanium, titanium tetrafluoride, tooth remineralization*.

2.1.1 Estudos *in vitro*

Um dos primeiros estudos *in vitro* foi realizado por Seppä (1988) em que foi avaliada a eficácia de um verniz de NaF e de uma solução de NaF na remineralização do esmalte dentário. Foram utilizadas fatias de dentes humanos não cariados que foram pré-desmineralizadas e aleatoriamente divididas em 6 grupos: 1- controle (nenhum tratamento), 2- aplicação de verniz Duraphat® - 2,26% F⁻ no primeiro dia; 3- aplicação de Duraphat® - 2,26% F⁻ no primeiro, quarto e sétimo dia; 4- aplicação de Duraphat® - 1,13% F⁻ no primeiro dia; 5- aplicação de Duraphat® - 1,13% F⁻ no primeiro, quarto e sétimo dia; 6- tratamento diário com solução de NaF 0,1% (0,045% F⁻) por 1 minuto. As amostras permaneceram imersas em saliva artificial (pH 7,0) durante 9 dias e foram expostas à uma solução tampão de ácido láctico 0,1 M (pH 5,0) durante 30 minutos diários. Utilizando a análise da microdureza superficial, o autor observou que todos os tratamentos com os agentes fluoretados reduziram a desmineralização do esmalte e que o tratamento com verniz Duraphat® 2,26% F⁻ realizado por três dias foi ligeiramente mais efetivo que os outros tratamentos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. As amostras de esmalte tratadas com os vernizes fluoretados (2,26% ou 1,13% F⁻), por três dias, mostraram a melhor resistência ácida, apontando para a importância da frequência de uso do produto em relação à concentração.

O verniz fluoretado também tem sido testado na ortodontia. Neste sentido, um estudo foi realizado com o objetivo de determinar se o verniz Fluor Protector® (0,1% F⁻) aplicado em molares, anteriormente à bandagem ortodôntica, poderia prevenir a formação de lesões de mancha branca. Neste estudo, foram utilizados pré-molares humanos, sendo que metade da amostra serviu como controle e a outra metade como teste. Foram induzidas lesões artificiais de mancha branca em todas as amostras e, após avaliação dos resultados, foi concluído que o verniz fluoretado Fluor Protector® é altamente eficaz na prevenção de lesões de mancha branca artificiais, formadas abaixo de bandas ortodônticas em comparação ao controle (ADRIAENS; DERMAUT; VERBEECK, 1990).

Todd e colaboradores (1999) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar o potencial do verniz Duraflor® (5% NaF) em inibir a desmineralização do esmalte ao redor de braquetes ortodônticos. Para isto, braquetes foram colados em caninos e pré-molares humanos extraídos, e estas amostras foram distribuídas entre

3 grupos: 1- controle (nenhum tratamento); 2- aplicação do verniz placebo (não fluoretado) e 3- aplicação do verniz fluoretado Duraflor[®]. Os vernizes foram aplicados sobre as superfícies das amostras e estas submetidas a ciclagens de pH, duas vezes ao dia, durante uma hora, por um período de 37 dias. Além disso, também foi realizada a escovação das amostras para simular o desgaste mecânico do verniz. Através da análise por microscopia de luz polarizada, os autores observaram que o grupo de tratamento com verniz Duraflor[®] apresentou uma desmineralização 50% menor em comparação aos outros grupos (controle e verniz placebo). Portanto, os autores indicaram o tratamento com vernizes fluoretados para pacientes ortodônticos com alto risco à cárie.

Demito e colaboradores (2004) realizaram um estudo, em que braquetes ortodônticos foram fixados a incisivos bovinos e estas amostras foram divididas em dois grupos: experimental- tratamento com verniz fluoretado (Duraflor[®]) e controle (sem tratamento). O verniz foi aplicado nas amostras do grupo experimental no primeiro e no décimo quinto dia de experimento. Todas as amostras foram submetidas à desmineralização (pH 4,4; 1h) duas vezes ao dia, intercaladas por remineralização em saliva artificial (pH 7,0; 6h), por um período de 35 dias. A profundidade das lesões de mancha branca foi avaliada por microscopia de luz polarizada. Os autores observaram que as amostras tratadas com verniz fluoretado apresentaram uma redução de aproximadamente 38% nos valores de profundidade da lesão em comparação às amostras que não receberam tratamento.

Hayacibara e colaboradores (2004) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar *in vitro* a deposição de CaF₂ na superfície do esmalte bovino após a aplicação de fluoreto profissional através de gel, mousse e verniz. Amostras de esmalte bovino foram divididas nos 4 grupos de tratamento: gel de FFA (Nupro, Dentsply, F 1,23%), mousse de FFA (Laclede, 1,23%), verniz NaF (Duraphat, F 2,26%) e controle (sem tratamento). O tratamento com o gel e o mousse foi realizado durante 4 minutos e o do verniz durante 24 horas. A análise do fluoreto fracamente ligado (CaF₂) na superfície do esmalte foi avaliada através de extração com KOH 1 M, neutralização com TISAB II (HCl 1M) e análise da quantidade de F⁻ por eletrodo íon sensível. Foi encontrada uma média da quantidade de CaF₂ depositada pelo gel, mousse, verniz e controle de 31,72, 44,57, 19,39 e 0,17 mg F/cm², respectivamente. Portanto, foi observado que todos os produtos fluoretados depositaram quantidades significativamente maiores de fluoreto fracamente ligado

na superfície do esmalte em comparação ao controle, porém não houve diferença estatística entre eles. Os autores concluíram que a formação de CaF_2 na superfície do esmalte não é proporcional a quantidade de F^- total no produto, sugerindo que o pH e a base do veículo são fatores mais importantes.

A maioria dos trabalhos até o momento foi realizada com esmalte humano permanente. Santos e colaboradores (2009) realizaram um estudo em que utilizaram dentes decíduos extraídos, os quais foram divididos entre os grupos de tratamento: 1- controle (tratamento com dentifrício sem flúor); 2- tratamento com gel fluoretado acidulado (1,23% F^- , FFA); 3- tratamento com verniz fluoretado Duraflur[®] (2,26% F^- , NaF); 4- verniz fluoretado Duraphat[®] (2,26% F^- , NaF); 5- verniz fluoretado Fluorniz[®] (2,26% F, NaF); 6- verniz fluoretado Fluorphat[®] (2,26% F^- , NaF); 7- verniz fluoretado Duoflurid[®] (2,71% F^- , NaF, CaF_2); 8- Cariestop[®] (12% diamino fluoreto de prata); 9- dentifrício fluoretado para crianças (500 ppm F^-). Os produtos foram aplicados nas respectivas amostras de acordo com as recomendações de cada fabricante, e então as amostras foram submetidas a 10 ciclos de alternância de pH, com imersão em solução desmineralizante (pH 4,3, 3h) e solução remineralizante (pH 7,0, 21h), durante 14 dias. Ao final do experimento, a microscopia de luz polarizada foi utilizada para avaliação da profundidade da lesão cáries. Os autores concluíram que todos os produtos testados promoveram uma redução na profundidade das lesões (entre 28% a 58%), porém nenhum dos produtos foi eficaz em prevenir completamente a formação das lesões cáries artificiais. O melhor efeito foi observado para o tratamento com o verniz fluoretado Duraphat[®] e o pior efeito, para o dentifrício fluoretado.

Para comparar a eficácia anticárie de cinco vernizes comerciais, Lippert e colaboradores (2013), avaliaram *in vitro* a capacidade destes vernizes em remineralizar e depositar fluoreto sobre lesões iniciais de cárie, variando a forma de aplicação: direta ou nas proximidades da lesão. Foram utilizadas amostras de esmalte bovino com lesões artificiais de cárie alocadas em 5 grupos de tratamento (vernizes de NaF 5%): CavityShield; Enamel Pro; MI Varnish; Prevident e Vanish. Os vernizes foram aplicados diretamente em metade das amostras por grupo, já na outra metade a aplicação foi indireta, ou seja, os vernizes não foram aplicados nestas amostras, porém elas foram expostas à liberação de fluoreto das amostras que tiveram aplicação direta, a 37°C em saliva artificial. Após 27h, os vernizes foram removidos das amostras, e logo após estas foram expostas novamente a uma nova

saliva artificial (67h, a 37°C). Foram analisadas a variação da microdureza superficial e a captação de fluoreto pelo esmalte. Todos os vernizes fluoretados foram capazes de remineralizar e depositar fluoreto nas lesões cariosas, porém em diferentes níveis. Foram encontradas diferenças significativas para ambas variáveis entre as aplicações diretas e indiretas. MI Varnish e Enamel Pro exibiram melhor eficácia quando aplicados indiretamente, enquanto que para os vernizes CavityShield e Vanish, não houve diferença entre a forma de aplicação. O verniz Prevident exibiu uma maior incorporação de fluoreto quando foi aplicado diretamente, porém um baixo efeito na remineralização. Portanto, a composição do verniz tem influencia na capacidade de liberar fluoreto e interagir com o esmalte.

Bichu e colaboradores (2013) compararam *in vitro* a efetividade de quatro diferentes produtos disponíveis comercialmente para inibição da desmineralização do esmalte dentário. Foram utilizados pré-molares humanos extraídos por razões ortodônticas, os quais foram divididos entre os cinco grupos de tratamento: 1- controle (sem tratamento); 2- tratamento com verniz fluoretado (Fluor Protector-0,1% F⁻); 3- pasta contendo CPP-ACP (GC Tooth Mousse); 4- pasta contendo fosfosilicato de sódio e cálcio (SHY-NM); 5- pasta contendo CPP-ACP e fluoreto (GC Tooth Mousse Plus). Após tratamento, todas as amostras foram submetidas à desmineralização artificial (96h) e, na sequência, foram avaliadas por microscopia de luz polarizada, para a obtenção dos valores das profundidades do esmalte desmineralizado. Os autores observaram que todos os produtos promoveram redução da profundidade do esmalte desmineralizado em comparação ao placebo, sendo que o tratamento com verniz fluoretado foi o que promoveu a melhor proteção da superfície do esmalte em termos de redução da profundidade da lesão.

Mais recentemente, Nalbantgil e colaboradores (2013) realizaram um estudo em que alocaram pré-molares humanos extraídos em três grupos: 1- controle (nenhuma aplicação tópica de fluoreto); 2- verniz fluoretado Enamel Pro[®] (NaF 5% + ACP); 3- verniz Duraflor[®] (NaF 5%). Os vernizes foram aplicados nas respectivas amostras, após bandagem. As amostras foram então imersas em solução desmineralizante por 96h, a 37°C, sendo esta solução renovada a cada 4h. A fim de simular o desgaste mecânico do verniz aplicado, as amostras foram escovadas manualmente por 5 segundos, após cada desafio cariogênico. A desmineralização do esmalte foi avaliada quantitativamente por microdureza longitudinal (em três sequências de 5 endentações nas distâncias de 0, 100 e 200 µm da base do

braquete e a 10, 20, 40, 70 e 90 μm da superfície externa do esmalte). Para os grupos do Enamel Pro[®] e Duraflor[®], os valores apresentaram-se estatisticamente mais altos em comparação aos valores do grupo controle para todas as profundidades analisadas. Os autores concluíram que os dois vernizes fluoretados em questão podem ser considerados de uso clínico para reduzir a desmineralização do esmalte durante tratamento ortodôntico.

Um trabalho mais recente, realizado por Rirattanapong e colaboradores (2014), avaliou o efeito três de vernizes fluoretados na remineralização de lesões iniciais em esmalte. Foram utilizados incisivos decíduos, que foram protegidos de forma a permanecerem expostas duas janelas de 1x1 mm na superfície do esmalte. Logo após foram imersos em solução desmineralizante por 4 dias e, em seguida, uma das duas janelas foi adicionalmente protegida. As amostras foram então aleatoriamente alocadas nos grupos: A- água deionizada; B- verniz Duraphat; C- verniz Clinpro White; D- verniz fluoretado contendo fosfato tri-cálcico. Após o tratamento, as amostras foram submetidas à ciclagem de pH. Microscopia de luz polarizada foi utilizada para avaliar a profundidade das lesões iniciais das amostras e após 7 dias de ciclagem de pH. O grupo referente ao tratamento com água deionizada apresentou um significativo aumento na profundidade das lesões em comparação aos outros grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos vernizes fluoretados. Os autores concluíram que os três vernizes fluoretados testados são capazes de reduzir a progressão de lesões iniciais em esmalte.

De uma forma geral, os estudos *in vitro* têm mostrado que os vernizes fluoretados são capazes de reduzir igualmente a desmineralização da estrutura dentária, pela análise da profundidade das lesões iniciais de cárie em esmalte bovino e humano, hígidos ou previamente desmineralizados, em comparação ao controle e a outros tipos de agentes utilizados para a mesma finalidade.

2.1.2 Estudos *in situ*

Attin e colaboradores (2005) realizaram um estudo *in situ* com o objetivo de avaliar a retenção de fluoreto em esmalte hígido e desmineralizado, após a aplicação de um verniz fluoretado à base de água (Mirafluorid[®], 0,12% F⁻) comparado a um verniz fluoretado à base de resina (Duraphat[®], 2,26% F⁻). Os autores utilizaram amostras de esmalte bovino, sendo que em metade delas foi induzida lesão de cárie artificial (gel ácido; pH 4,8; 72h). As amostras foram aleatoriamente divididas nos seguintes grupos: A- verniz Mirafluorid[®]; B- verniz Duraphat[®] e C- controle. Os vernizes foram aplicados e, então, três amostras de cada esmalte (hígido e desmineralizado) foram fixadas em um aparelho intra-oral mandibular. Dez voluntários participaram do estudo e utilizaram o aparelho mandibular durante 5 dias, por 3 fases distintas (tratamentos A, B e C). As amostras deveriam ser escovadas duas vezes ao dia com dentifrício fluoretado (Elmex[®]) e o aparelho removido da boca apenas para as principais refeições diárias. Foi avaliada a captação de fluoreto fracamente e fortemente ligado. Após 1, 3 e 5 dias, foram encontradas maiores quantidades significativas de fluoreto fracamente e fortemente ligado para as amostras tratadas com Duraphat[®], já para o Mirafluorid[®], os valores não diferiram significativamente do controle. Os autores discutem que o conceito por trás do Mirafluorid[®] é ter um verniz fluoretado em um polímero à base de água, que facilitaria a uma maior liberação de F⁻ para a cavidade oral, apesar da sua baixa concentração de F⁻, porém os resultados do presente estudo não confirmaram esta hipótese. Os autores concluíram que aplicações com o verniz Duraphat[®] promovem uma considerável maior captação de fluoreto que aplicações de verniz à base de água Mirafluorid[®] sob condições *in situ*.

Attin e colaboradores (2007) continuaram o trabalho, mas avaliando se o fluoreto aplicado na forma de verniz em um dente poderia migrar para dentes adjacentes a diferentes distâncias. Eles realizaram um estudo em que utilizaram amostras de esmalte previamente desmineralizadas (gel ácido; pH 4,8; 3 dias). Dez voluntários participaram do estudo e utilizaram aparelhos mandibulares em 3 diferentes fases de tratamento: 1- verniz Mirafluorid[®] 0,12% F⁻ (Hager & Werken); 2- verniz Duraphat[®] 2,26% F⁻ (Colgate-Palmolive) e 3- controle (sem tratamento). Cada fase teve duração de 6 dias cada. Os aparelhos intra-orais foram constituídos de uma amostra controle e uma amostra tratada de acordo com sua respectiva fase.

Adicionalmente às amostras tratadas, 3 amostras foram colocadas nos aparelhos em 3 sítios diferentes: a- próximo; b- 1 cm e c- lado oposto, em relação à tratadas. Estas amostras testes (não tratadas) foram colocadas no primeiro, terceiro e quinto dia de cada fase, e permaneceram no aparelho por um dia. Após o tratamento, os aparelhos foram imediatamente inseridos na boca e os voluntários foram instruídos a escovarem os dentes e as amostras, com dentifrício fluoretado (0,125% F⁻, AmF) 2 vezes ao dia. A captação de fluoreto fracamente ligado foi avaliada. Observou-se que ocorreu incorporação de fluoreto (liberado pelo verniz Duraphat[®]) apenas nas amostras localizadas próximas às amostras tratadas. Portanto, os autores concluíram que o tratamento com verniz fluoretado deve ser realizado diretamente na superfície do dente que necessita, pois foi observado que o fluoreto liberado de um dente não consegue migrar para outro dente.

Lee e colaboradores (2010) compararam o efeito de três diferentes produtos fluoretados tópicos na microdureza de superfície, captação de fluoreto e na área de lesão do esmalte dentário por fluorescência. Foram utilizados dentes bovinos previamente desmineralizados (solução 0,2% de carbopol e 0,1 mol/L de ácido láctico; pH 5,0; 71h) submetidos a um dos seguintes tratamentos: 1- controle (sem tratamento); 2- iontoforese (200 μ A) com solução de 2% NaF durante 4 minutos; 3- aplicação de 2 mm de gel de FFA (1,23% F⁻) durante 4 minutos; 4- aplicação de 2 mm de verniz Cavity Shield (5% NaF; 3M Espe Co.) por 12h. Ao final do tratamento tópico, todas as amostras foram acopladas em aparelhos mandibulares removíveis, sendo que em cada aparelho foram fixadas 4 amostras de esmalte. Seis voluntários participaram do estudo e utilizaram o aparelho intra-oral durante 4 semanas, removendo-o durante as refeições, escovação dentária e para dormir. A análise por microdureza de superfície das amostras não revelou diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, o gel de FFA mostrou melhores efeitos em relação à captação de F⁻ e à diminuição da área da lesão, os quais não diferiram significativamente do verniz fluoretado.

Há poucos estudos *in situ* sobre o uso do verniz fluoretado (NaF) na prevenção ou tratamento da cárie dentária, sendo que os dois primeiros foram focados na incorporação e deposição de fluoreto sobre amostras hígidas e desmineralizadas; e o último estudo avaliou a remineralização *in situ*, mostrando que o gel FFA foi similar ao verniz NaF.

2.1.3 Estudos clínicos

Seppä, Tuutti e Luoma (1982) realizaram o primeiro estudo clínico em que foi comparado o efeito do tratamento com os vernizes Duraphat® e Fluor Protector®. Os vernizes foram aplicados duas vezes ao ano, através da técnica da boca dividida, em crianças de 11 a 13 anos de idade com alta atividade de cárie, residentes em uma região com água de abastecimento fluoretada. Após um acompanhamento de 3 anos de estudo pela análise do índice CPOS (superfícies cariadas, perdidas e obturadas), os autores observaram que o tratamento com o verniz Duraphat® apresentou uma redução de 30% na incidência de lesões de cárie, enquanto que para o verniz Fluor Protector®, essa redução foi de apenas 10%.

Seppä e colaboradores (1983) avaliaram o efeito da aplicação do verniz Duraphat® na progressão de lesões iniciais de cárie. Participaram do estudo crianças de 11 a 13 anos de idade que apresentaram elevado índice CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados), selecionadas pelo sistema de saúde pública. As crianças apresentavam alto risco à cárie e residiam em local com água de abastecimento fluoretada. O tratamento com o verniz foi realizado bianualmente através da técnica da boca dividida, sendo que as lesões iniciais e as novas lesões encontradas durante o estudo foram observadas separadamente. Após 3 anos, a progressão das lesões cariosas formadas durante o estudo foi inibida mais distintamente pelo tratamento com o verniz fluoretado, sendo a diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que o uso do verniz fluoretado parece auxiliar na prevenção do aparecimento de novas lesões cariosas iniciais.

Em um ensaio clínico controlado de 3 anos de duração, Petersson e colaboradores (1991) avaliaram o efeito de aplicações intensivas de Duraphat® na prevenção de cáries proximais comparadas a uma aplicação de rotina a cada 6 meses. Participaram 154 crianças de 11 anos de idade, distribuídas em dois grupos: 1- aplicação 2x/ano mais 3 aplicações adicionais de verniz Duraphat® (2,26% F⁻), em intervalos de 2 dias por semana (repetido anualmente) e 2- tratamento com uma aplicação de Duraphat®, em intervalos de 6 meses (apenas 2x/ano). Foram realizadas radiografias interproximais no início do estudo e anualmente, durante os 3 anos de estudo, com o objetivo de avaliar a incidência e progressão de lesões cariosas proximais. O tratamento intensivo com verniz Duraphat® apresentou redução na progressão e desenvolvimento de cáries proximais, enquanto que o

tratamento de rotina (apenas 2x/ano) não mostrou efeito na prevenção e progressão das lesões cariosas proximais.

Seppä, Leppänen e Hausen (1995) realizaram um estudo clínico em que compararam o efeito preventivo de um verniz de fluoreto de sódio e um gel de flúor fosfato acidulado na prevenção de cárie dentária. Foram incluídas 254 crianças de 12 a 13 anos de idade com histórico de alta atividade de cárie. As crianças foram divididas em 2 grupos: 1- tratamento verniz de NaF (Duraphat®; 2,26% F⁻) e 2- tratamento gel de FFA (Nupro®; 1,23% F⁻). As aplicações foram realizadas 2x/ano durante 3 anos de estudo. A análise foi realizada pelo índice CPOS e mediante os resultados encontrados, os autores concluíram que tanto o verniz de NaF quanto o gel de FFA são efetivos na prevenção de cáries proximais.

Em um estudo clínico que avaliou o efeito de um verniz fluoretado na progressão de lesões cariosas em esmalte na dentição decídua (AUTIO-GOLD; COURTS, 2001), os autores selecionaram crianças de 3-5 anos de idade divididas em dois grupos: verniz fluoretado e controle. Para o grupo verniz fluoretado, o tratamento foi realizado com Duraphat® (Colgate-Palmolive) no início do estudo e após 4 meses; já no grupo controle, as crianças não receberam nenhum tratamento fluoretado. Ao final de 9 meses de estudo, os autores observaram que no grupo controle 37,8% das lesões ativas tornaram-se inativas, 3,6% progrediram e 36,9% não apresentaram mudanças. Já no grupo verniz fluoretado, 81,2% das lesões ativas tornaram-se inativas, 2,4% progrediram e 8,2% não apresentaram mudanças. Os resultados sugeriram que o tratamento com aplicações periódicas de verniz fluoretado pode ser uma medida efetiva para reverter lesões de cárie ativas em esmalte na dentição decídua.

Com o objetivo de comparar o efeito de um tratamento intensivo (3 aplicações/2 semanas) em relação ao tratamento padrão (aplicação bianual) com verniz de NaF a 5%, Weinstein, Spiekerman e Milgrom (2009) realizaram um estudo em que selecionaram 600 crianças hispânicas de 3 a 4 anos de idade, residentes em Washington-EUA, e as distribuíram em dois grupos de tratamento: Intensivo e Padrão. Todas as crianças receberam aplicações de verniz fluoretado (Cavity Shield, NaF 5%, Omni Oral Pharmaveuticals) ou placebo (verniz similar sem F⁻), bianualmente, durante 3 anos. Uma vez ao ano, o grupo Intensivo recebia adicionalmente 3 aplicações de verniz fluoretado e verniz placebo (boca dividida), sendo as aplicações realizadas dentro de 2 semanas. O grupo Padrão recebia

apenas uma aplicação do verniz fluoretado e do verniz placebo, a cada 6 meses (boca-dividida). Após 3 anos, os resultados mostraram que não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos de tratamento. Portanto, os autores concluíram que o estudo falhou em mostrar uma evidência clara na diferença de eficácia entre a aplicação padrão e a intensiva de verniz fluoretado.

Almeida e colaboradores (2011) realizaram um estudo clínico randomizado e controlado em 36 crianças com 7-13 anos de idade, residentes na cidade de Caruaru-PE, Brasil, com o objetivo de avaliar o efeito terapêutico de três vernizes fluoretados disponíveis no mercado brasileiro em lesões de mancha branca. Foram selecionadas 67 lesões de mancha branca ativas em dentes permanentes anteriores. As crianças foram aleatoriamente divididas nos três grupos de tratamento: 1- verniz Fluorniz (NaF 5%, SS White); 2- verniz Duofluorid XII (CaF₂ 6% + NaF 6%, FGM); 3- Durafluor (NaF 5,5%, Dentsply). Como método de análise, foram mensuradas as dimensões máximas da lesão (mésio-distal e cérvico-incisal) e características clínicas de textura e brilho a fim de verificar a atividade das lesões (ativas ou inativas). Os vernizes foram aplicados uma vez por semana durante 4 semanas, em conjunto à instrução de escovação a cada visita e utilização de dentifrício fluoretado (Colgate, 1500 ppm F⁻) durante todo o experimento. Ao final da quinta semana do estudo, os autores observaram, de modo geral, uma redução de 46% na dimensão das manchas brancas, sendo que não houve diferença estatística entre os grupos de vernizes testados.

Slade e colaboradores (2011) realizaram um estudo clínico em que testaram um programa de saúde dentária em comunidades indígenas do Norte da Austrália, com a hipótese de redução de cárie dentária em crianças pré-escolares. O estudo foi prospectivo, aleatorizado por grupos, controlado, com duração de dois anos, em que foram selecionadas 30 comunidades alocadas nos grupos teste e controle, totalizando 660 crianças com idade entre 18-47 meses incluídas no estudo. O verniz Duraphat foi aplicado (máximo de 0,25 ml verniz/participante) em todas as crianças das 15 comunidades teste, uma vez a cada 6 meses durante dois anos (5 aplicações/participante). Além disso, todos os participantes e responsáveis foram instruídos em relação ao consumo de água potável, limitação de açúcar na dieta, escovação dentária e utilização de dentifrício fluoretado (My First Colgate, 450 ppm F⁻). Foi analisado o incremento de cárie pelo índice CPOS (superfícies cariadas, perdidas e obturadas), o qual foi avaliado no início e ao final do experimento (543

crianças). No início do estudo, a média do número de superfícies com experiência de cárie (índice CPOS) por criança foi de 4,6 e 4,9, para os grupos controle e teste, respectivamente. Foi observado um incremento de CPOS ajustado significativamente menor para o grupo teste em comparação ao controle, sendo a fração preventiva de 31%. Portanto, os autores concluíram que o verniz fluoretado testado é eficaz em prevenir a cárie dentária em crianças pré-escolares.

Para avaliar a eficácia do verniz Duraphat® em reverter lesões de mancha branca após tratamento ortodôntico, Du e colaboradores (2012) realizaram um ensaio clínico randomizado, paralelo e controlado, utilizando solução salina como controle. Foram selecionados 110 participantes com 12-22 anos de idade, os quais foram aleatoriamente alocados em dois grupos de tratamento: 1- teste (verniz Duraphat®) e 2- controle (solução salina). Os produtos foram aplicados na superfície das lesões de mancha branca, uma vez ao mês, durante os primeiros 6 meses após retirada do aparelho. As superfícies foram avaliadas pelas leituras a laser fluorescente DIAGNOdent (DD) no início e após 3 e 6 meses de estudo. Para o grupo teste, os valores das leituras reduziram em 5,78 DD em 3 meses e 7,56 DD em 6 meses de tratamento, já para o grupo controle a redução foi de 2,44 DD em 3 meses e 3,09 DD em 6 meses de tratamento, sendo a diferença entre os grupos estatisticamente significativa. Mediante os resultados, os autores concluíram que as aplicações de vernizes fluoretados são efetivas em reverter lesões de mancha branca após tratamento ortodôntico.

Em um estudo clínico randomizado, duplo-cego, controlado, Arruda e colaboradores (2012) avaliaram a eficácia de uma ou duas aplicações anuais de um verniz de NaF 5% (Cavity Shield®, OMNII) na redução de incrementos de cárie em dentição permanente de crianças de escolas rurais no Brasil. Participaram do estudo 379 crianças com idade de 7-14 anos, que foram alocadas entre os dois grupos de tratamento: 1- verniz Cavity Shield® e 2- verniz placebo (controle). A detecção inicial de cárie dentária foi conduzida utilizando o sistema ICDAS e o tratamento com os vernizes foi realizado uma vez a cada 6 meses (2 aplicações/ano) em metade dos participantes de cada grupo, e apenas uma vez ao ano na outra metade, durante um período de 12 meses. Foram comparados os incrementos de cárie pelo índice COS entre os dois grupos de tratamento. A eficácia do tratamento com o verniz fluoretado na prevenção da cárie em relação ao controle foi reportada como fração de prevenção. Após 12 meses de estudo (210 crianças), o grupo verniz fluoretado

apresentou incrementos (novas lesões) significativamente menores em comparação ao grupo controle, com uma fração de prevenção geral de 40%. Quando duas aplicações anuais foram comparadas à apenas uma, as frações de prevenção encontradas foram de 49% e 31%, respectivamente, porém esses valores não foram estatisticamente significantes. Os autores concluíram que uma ou duas aplicações anuais com verniz de NaF a 5% podem ser recomendadas como medida de saúde pública para a redução da incidência de cárie em uma população de alto risco.

Alguns ensaios clínicos mais recentes reportaram resultados diferentes dos observados na maioria dos estudos apresentados acima. Agouropoulos e colaboradores (2014) avaliaram em um ensaio clínico de 2 anos de duração, o efeito de aplicações bianuais de um verniz fluoretado em crianças pré-escolares de alto risco à cárie, como agente coadjuvante em um programa de saúde bucal e escovação supervisionada com dentifrício fluoretado contendo 1000 ppm F⁻. Participaram do estudo 328 crianças de 2-5 anos de idade de 10 diferentes escolas em Atenas. As crianças recebiam instrução de higiene bucal duas vezes ao ano e eram supervisionadas durante a escovação uma vez ao dia. As crianças foram alocadas em dois grupos de tratamento: 1- verniz Fluor Protector[®] (0,9% difluorsilano, 1000 ppm F⁻, Ivoclar Vivadent) e 2- verniz placebo (sem fluoreto). As aplicações foram realizadas duas vezes ao ano em intervalos de 6 meses, durante um período de 2 anos. Foram avaliados: incremento (índice ceo-s) e prevalência de cárie; saúde gengival (índice de sangramento); crescimento de *Streptococcus mutans* e capacidade tampão da saliva. A média dos valores de ceo-s no início do estudo foi de 3,1(±7,1) para o grupo teste e 2,5(±5,6) para o grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas no incremento e na prevalência de cárie entre os grupos após 1 e 2 anos de estudo. Segundo os autores, houve uma tendência na redução da incidência de cárie e lesões iniciais em esmalte para o tratamento com verniz fluoretado, mas esta diferença não foi significativa. As outras características avaliadas não foram afetadas pelo tratamento com os vernizes. Portanto, os autores puderam concluir que aplicações bianuais com o verniz Fluor Protector[®] em crianças pré-escolares, não mostraram benefícios significativos na prevenção da cárie em conjunto com escovação supervisionada com dentifrício fluoretado. No entanto, deve-se considerar que o verniz testado apresentava baixa concentração de fluoreto.

Jiang e colaboradores (2014) conduziram um ensaio clínico em Hong Kong, onde há fluoretação da água de abastecimento (0,5 ppm). Inicialmente, 450 crianças, com idade entre 8 e 23 meses, foram recrutadas e aleatoriamente divididas em três grupos: 1- controle: instrução verbal de higiene bucal aos pais apenas no início do estudo; 2- instrução verbal de higiene bucal e treinamento manual de escovação aos pais a cada 6 meses; 3- instrução verbal de higiene bucal, treinamento manual de escovação aos pais e adição de aplicações bianuais do verniz Clinpro White (NaF 5%, 3M ESPE). As crianças foram avaliadas no início e após 24 meses de estudo, em relação à condição clínica, utilizando como critério de diagnóstico de cárie o sistema ICDAS (códigos 2 a 6) e índice ceo-d. Também foi avaliado durante período, o comportamento dos pais e das crianças em relação à escovação dentária. No início do estudo, a média geral do ceo-d das crianças foi de $0,03 \pm 0,24$, e não houve diferença estatística entre os grupos. Após 24 meses de estudo, foi observado uma incidência de cárie precoce nas crianças, incluindo tanto lesões cavitadas como não-cavitadas, de 11,9%, 11,8% e 17,5%, respectivamente para os grupos 1, 2 e 3. A média dos valores de novos ceo-d para os grupos 1, 2 e 3, foi de 0,3, 0,2 e 0,3, respectivamente. A proporção de pais que praticaram a escovação duas vezes ao dia em suas crianças foi de 62,7%, 60,4% e 65,7%, respectivamente para os grupos 1 a 3. Não foram encontradas diferenças estatísticas no incremento de cárie e na escovação parental entre os três grupos ao longo dos dois anos de estudo. Portanto, os autores concluíram que em região de otimização da água fluoretada, aplicações de verniz fluoretado de NaF a 5% em conjunto a instrução e treinamento parental de escovação, não apresentaram efeito preventivo adicional em crianças de até 3 anos com baixo risco à cárie dentária.

Oliveira e colaboradores (2014) avaliaram em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, paralelo e placebo-controlado, se aplicações bianuais de um verniz fluoretado em crianças pré-escolares poderiam reduzir a incidência de cárie ou produzir algum tipo de efeito adverso, durante um período de 2 anos de estudo, conduzido na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Foram alocadas 200 crianças com 1-4 anos de idade em dois grupos de tratamento: 1- verniz Duraphat® (NaF 5%, Colgate) e 2- verniz placebo (sem fluoreto, Colgate). Os vernizes foram aplicados em todas as superfícies dentárias, de acordo com seu grupo de tratamento, no início e em intervalos de 6 meses. Os métodos de análise e diagnóstico de cárie utilizados foram o sistema ICDAS e ceo-s. No início do estudo, a média do índice ceo-s foi de

0,6±1,6 para o grupo fluoretado, e 1,0±2,1, para o grupo placebo, sendo a média geral de 0,8±1,0. Após os 24 meses de estudo, foram avaliados o incremento e a incidência de cárie (aparecimento de novas lesões em dentina). O número de crianças que apresentaram novas lesões cáriosas em dentina ao final do estudo foi maior para o grupo controle (46,7%) que para o grupo teste (35,9%), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. A fração de prevenção para o tratamento com verniz fluoretado em comparação ao controle foi de aproximadamente 28,3%. Portanto, os autores concluíram que, apesar de serem consideradas seguras e bem aceitas, aplicações bianuais de verniz fluoretado não resultaram em uma redução significativa na incidência de cárie em crianças pré-escolares com baixo risco à cárie, durante um período de 2 anos.

Em geral, os estudos clínicos mais antigos mostram evidência de que a aplicação bianual de verniz fluoretado é efetiva em reduzir a incidência de lesões cáriosas em pacientes de alto risco à cárie dentária em comparação ao controle. Adicionalmente, o verniz fluoretado é capaz de acelerar a remineralização de lesões cáriosas não cavitadas pré-existentes. Não há diferença entre marcas comerciais bem como entre verniz fluoretado e gel FFA, assim como não é clara a diferença entre a aplicação padrão e a intensiva. Por outro lado, alguns estudos mais recentes mostraram que a aplicação dos vernizes em conjunto com instrução de escovação, utilização de dentifício fluoretado, em local de exposição à água de abastecimento fluoretada, não produziu efeito preventivo adicional. Alguns autores justificam estes resultados, pelo fato de alguns trabalhos mais atuais terem sido realizados em crianças de baixo risco à cárie e em uma população com nível considerável de instrução; outros ao mascaramento do efeito devido à utilização contínua de dentifício fluoretado na atualidade e também à necessidade de períodos mais longos de estudo para se conseguir analisar um real efeito preventivo.

2.1.4 Revisões de Literatura e Revisões Sistemáticas

Beltrán-Aguilar, Goldstein e Lockwood (2000) observaram que os ensaios clínicos e estudos *in vitro* têm mostrado que os vernizes fluoretados são tão eficazes quanto a outros agentes fluoretados em relação à prevenção da cárie. Os autores relataram no estudo que os vernizes fluoretados ainda não haviam sido autorizados para comércio nos EUA como agentes de prevenção da cárie dentária, sendo

utilizados apenas como material de forramento, e que apenas os vernizes Duraphat® (NaF 5%; 2,26% F⁻; Colgate Oral Pharmaceuticals), Duraflor® (NaF 5%; 2,26% F⁻; Pharmascience Inc.) e Flúor Protector® (1% difluoreto de silano; 0,1% F⁻; Ivoclar-Vivadent) eram comercialmente disponíveis. Em relação às implicações clínicas da utilização dos vernizes fluoretados, os autores relataram ainda que os vernizes endurecem em contato com a saliva, são seguros e de fácil aplicação.

Strohmenger e Brambilla (2001) coletaram informação de estudos disponíveis *in vitro*, estudos com animais e ensaios clínicos a respeito da eficácia dos vernizes fluoretados na prevenção da cárie. A eficácia do verniz fluoretado é demonstrada em muitos estudos experimentais, e que estudos clínicos mostraram uma variação de 18% a 70% na redução da incidência de cárie. Os autores concluíram que os vernizes fluoretados são ferramentas úteis para a prevenção da cárie, e que podem mostrar boas propriedades preventivas quando aplicados regularmente.

Marinho e colaboradores (2002) realizaram uma revisão sistemática coletando dados de ensaios clínicos aleatorizados, cegos, em que se comparou o efeito do verniz fluoretado e verniz placebo (ou controle) em crianças de até 16 anos de idade, com acompanhamento de pelo menos 12 meses. O objetivo foi determinar a eficácia e a segurança de vernizes fluoretados na prevenção de lesões cariosas em crianças e de examinar fatores que poderiam modificar este efeito. Foram incluídos na revisão nove estudos, envolvendo 2.709 crianças. Após análise, os autores observaram uma estimativa de aproximadamente 46% de redução na incidência de lesões de cárie, pelo índice CPOS (superfícies cariadas, perdidas e obturadas). Os resultados mostraram que houve um efeito preventivo significativo do verniz fluoretado sobre a dentição permanente e decídua. No entanto, foi encontrada pouca informação disponível em relação à aceitabilidade do tratamento e possíveis efeitos adversos durante os ensaios clínicos selecionados, e sugeriram que mais estudos de melhor qualidade fossem realizados.

O mesmo grupo (MARINHO et al., 2004) realizou uma nova revisão sistemática com o objetivo de comparar a efetividade das formas de aplicação tópica de fluoretos, quando utilizadas para prevenção de cárie dentária em crianças. Foram selecionados ensaios clínicos aleatorizados e cegos em crianças acima de 16 anos, com duração de pelo menos 12 meses, em que foram comparados vernizes, géis, enxaguatórios e dentifrícios fluoretados. O método de análise empregado foi o índice

CPOS e dados de quinze estudos foram utilizados para a revisão. Como resultados, os autores observaram que os dentifrícios fluoretados não foram estatisticamente diferentes dos géis e enxaguatórios, e que os resultados apresentados por único ensaio, em que se comparou dentifrício com verniz, verniz com gel e gel com enxaguatório, foram inconclusivos. Os autores concluíram que os dentifrícios fluoretados parecem ter efeitos similares aos dos enxaguatórios em relação à prevenção da cárie dentária. Evidências em relação à diferença de efetividade entre os vernizes e géis, e enxaguatórios e géis, quando comparados entre si, foram consideradas inconclusivas.

Em uma revisão sistemática, Petersson e colaboradores (2004) avaliaram o efeito de tratamentos com vernizes fluoretados na prevenção da cárie, através da análise de dados publicados na literatura entre o período de 1966 e agosto de 2003. Foram selecionados 24 ensaios clínicos em que o verniz fluoretado foi comparado a um verniz placebo, a um controle ou a outro produto fluoretado, com duração de pelo menos 24 meses. Através da análise das frações de prevenção (%), os autores encontraram evidências limitadas em relação ao efeito preventivo das aplicações dos vernizes fluoretados em dentes permanentes, na prevenção da cárie em crianças e adolescentes (30%). Em relação ao uso do verniz fluoretado para tratamento em dentes decíduos e permanentes (adultos), as evidências apresentaram-se inconclusivas. Mais uma vez foi reforçada a necessidade de mais estudos clínicos de alta qualidade, nos quais devem ser incorporados conceitos clínicos mais modernos.

Carvalho e colaboradores (2010), com o objetivo de avaliar se existem evidências conclusivas de que aplicações profissionais de vernizes fluoretados reduzem a incidência de cárie dentária em crianças pré-escolares, realizaram uma revisão sistemática em que foram analisados estudos clínicos que avaliaram o desenvolvimento de lesões cariosas cavitadas em crianças acima de 6 anos de idade. Foram encontrados 513 artigos e apenas 8 preencheram os critérios de inclusão, porém os estudos apresentaram-se heterogêneos quanto à experiência prévia de cárie dos participantes, ao tipo de intervenção no grupo controle, à exposição das crianças a outras fontes de F^- e ao intervalo entre os tratamentos. As diferenças absolutas entre as incidências de cárie nos grupos controle e teste e as frações prevenidas variaram de 0,30 a 1,64 e de 5 a 63%, respectivamente. Os autores puderam concluir que o verniz fluoretado parece ser efetivo na redução da

incidência de cárie em pré-escolares, porém ensaios clínicos com metodologia mais padronizada devem ser realizados para obtenção de evidências mais conclusivas.

Em uma revisão sistemática, Weyant e colaboradores (2013) atualizaram recomendações estipuladas pela *American Dental Association* (ADA) em 2006 (ADA CSA, 2006), baseadas em evidências clínicas, em relação às aplicações profissionais de fluoreto tópico. Para isso, os autores selecionaram ensaios clínicos em que foram testadas aplicações profissionais de fluoreto tópico incluindo vernizes, géis, enxaguatórios, mousses e pastas, publicados até outubro de 2012, em que foram avaliadas as mudanças nos incrementos de cárie após o tratamento com fluoreto tópico. Foram incluídos 71 ensaios clínicos para a revisão e, além disso, também foram incluídas opiniões de um conselho de doutores no assunto, quando as evidências eram escassas, contraditórias ou com alto risco de viés. O conselho recomendou a aplicação de fluoretos tópicos (alta concentração F^-) apenas para indivíduos com alto risco à cárie dentária. Para a aplicação tópica profissional destes agentes, o conselho recomenda: aplicação de verniz fluoretado a 2,26% F^- ou aplicação de gel de FFA a 1,23% F^- , sendo que para crianças menores de 6 anos de idade, apenas os vernizes fluoretados a 2,26% F^- são recomendados. Os autores afirmam que estas recomendações devem ser integradas ao julgamento da prática clínica e às necessidades dos pacientes.

Marinho e colaboradores (2013) atualizaram a revisão sistemática publicada em 2002, em que avaliaram a eficácia de vernizes fluoretados na prevenção de cárie em crianças e adolescentes (já descrita acima). O objetivo desta revisão foi avaliar a eficácia e a segurança dos vernizes fluoretados na prevenção da cárie em crianças e adolescentes, além de examinar fatores que poderiam modificar o seu efeito. A busca foi realizada através da base de dados Cochrane e evidências publicadas até maio de 2013 foram analisadas. Foram selecionados 22 ensaios clínicos randomizados, cegos, controlados em que foram comparadas aplicações de vernizes fluoretados ao placebo ou controle, em crianças de até 16 anos de idade, com duração de pelo menos um ano de estudo. O principal resultado avaliado foi o incremento de cárie através da análise das superfícies cariadas, perdidas/extraídas e obturadas, tanto nos dentes permanentes (CPOS) como nos dentes decíduos (ceo-s). A eficácia do verniz fluoretado foi medida através da fração de prevenção (%) do tratamento em relação ao controle, calculada pela diferença entre a média de incremento do grupo teste e grupo controle. A meta-análise das superfícies dos

dentos permanentes mostrou uma média de fração de prevenção estimada de 43% do verniz fluoretado em relação ao controle (placebo ou não tratamento), já para a dentição decídua, a média de fração de prevenção estimada foi de 37%. As aplicações de vernizes fluoretados realizadas duas ou quatro vezes ao ano, tanto na dentição permanente como na decídua, foram associadas com uma redução substancial no incremento da cárie. Os dados mostraram-se heterogêneos, porém a qualidade da evidência foi considerada moderada. Não foram encontradas associações significativas entre as frações de prevenção estimadas e fatores específicos como: severidade da cárie no início do estudo, exposição prévia ao fluoreto, profilaxia anterior à aplicação do verniz, concentração de fluoreto, frequência de aplicação e período de acompanhamento. Foram encontradas poucas informações a respeito de possíveis efeitos adversos ou aceitabilidade do tratamento.

Com base nas revisões sistemáticas, sugere-se que o tratamento profissional com verniz fluoretado tenha um efeito preventivo e inibidor sobre a cárie dentária, com uma fração preventiva variando entre 30-46%. Entretanto, mediante aos dados encontrados, pôde-se observar que a maioria dos ensaios clínicos realizados apresenta heterogeneidade nos resultados e baixa qualidade metodológica, além de escassez de dados relevantes e alta probabilidade de viés. Mediante a isso, em geral, os estudos remetem a resultados inconclusivos e evidência moderada. Novas pesquisas devem ser realizadas com metodologias mais padronizadas e controladas, além de serem incluídas análises de outros fatores relevantes ao estudo, como efeitos adversos e aceitabilidade do tratamento, para obtenção de evidências fortes em relação ao efeito do verniz fluoretado na prevenção da cárie dentária.

2.2 TETRAFLUORETO DE TITÂNIO (TiF₄)

Desde a década de 40 muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de testar os efeitos de uma grande variedade de sais fluoretados não convencionais na dissolução do esmalte dentário, com o propósito de encontrar agentes que possam controlar lesões cariosas mais efetivamente que o fluoreto de sódio (BIBBY, 1945; MUHLER; VAN HUYSSEN, 1947; MANLY; BIBBY, 1949).

Shrestha, Mundorff e Bibby (1972) realizaram o primeiro estudo *in vitro* que deu origem aos estudos posteriores em que foi avaliado o efeito do tetrafluoreto de titânio (TiF₄) no esmalte dentário como agente preventivo para a cárie e erosão dentária. O objetivo deste estudo foi comparar os efeitos de vários elementos incomuns (Boro-B, Cério-Ce, Disprósio-Dy, Molibdênio-Mo, Selênio-Se, Estrôncio-Sr, Titânio-Ti, Vanádio-V, Itérbio-Yb, Zircônio-Zr), de sais fluoretados (TiF₄, ZrF₄, HfF₄, Sn₃BrF₅, SnF₂.3ZrF₄, SnZrF₆, FFA, Li₂TiF₆, K₂ZrF₆, SnF₂, NaF, AlF₃) e não fluoretados (DyCl₃, YbCl₃) na dissolução do esmalte bovino. Para isso, amostras de esmalte bovino foram protegidas de forma a permanecer exposta uma “janela” na superfície do esmalte, para avaliar a quantidade de fosfato dissolvida em 20 ml solução tampão de ácido acético 0,01M (pH 4,0) por 15 minutos. Os tratamentos foram realizados pela aplicação de soluções contendo 100ppm dos respectivos elementos sem ajuste do pH das soluções. Os autores observaram que a dissolução do esmalte em ácido acético foi reduzida pelo tratamento com fluoretos e outros sais de uma variedade rara de elementos. Os tetrafluoretos de titânio, zircônio e háfnio foram mais efetivos que os outros sais fluoretados em relação à proteção contra a desmineralização do esmalte.

Estes resultados desencadearam a realização de mais estudos, a fim de entender o mecanismo de ação dos tetrafluoretos com especial ênfase ao TiF₄. Um desses estudos foi realizado por Mundorff, Little e Bibby (1972), com o objetivo de investigar *in vitro* por quais mecanismos o TiF₄ reduzia a solubilidade do esmalte. Os autores avaliaram o conteúdo de fluoreto no esmalte e a redução da solubilidade. Foi sugerido que o TiF₄ pode reagir com o esmalte dentário através de duas maneiras distintas: quimicamente, diminuindo a solubilidade do esmalte e aumentando o conteúdo de fluoreto; e fisicamente, através da formação de uma camada protetora do tipo “glaze” na superfície do esmalte, podendo esta ser

formada por óxido de titânio ou fosfato de titânio. Segundo os autores, estudos clínicos poderiam ser realizados para avaliar os efeitos do TiF_4 na cárie dentária.

Em um estudo clínico, Reed e Bibby (1976) avaliaram o efeito de aplicações de solução de TiF_4 e solução de FFA na prevenção da cárie pelo método boca-dividida. Participaram do estudo crianças de 11 a 13 anos de idade, sendo que 110 crianças receberam tratamento com as respectivas soluções e, como controle, 60 crianças não receberam nenhum tratamento. Foi observado, após 3 anos de estudo, que a aplicação anual de uma solução de TiF_4 a 1% (0,61% F^-), por um minuto em dentes de um lado da boca, oferecia melhor proteção contra o aparecimento de lesões cariosas em comparação ao outro lado da boca, o qual foi tratado com uma aplicação de quatro minutos de solução FFA (1,25% F^-). Portanto, o TiF_4 teve um melhor efeito preventivo em comparação ao FFA. Os autores mencionaram que era desconhecido o exato mecanismo pelo qual o TiF_4 provocou uma redução da incidência de cárie dentária.

Wefel (1982) comparou em um estudo *in vitro* aplicações tópicas de soluções de FFA (1,23% e 1% F^-) e TiF_4 (1,23% e 1% F^-) em relação à captação de fluoreto pelo esmalte, penetração e formação da lesão de cárie artificial. Foram utilizados molares humanos extraídos, os quais foram imersos em 2 ml de solução (FFA ou TiF_4), durante 4 minutos, de acordo com os grupos de comparação: A- FFA e TiF_4 1,23% F^- ; B- FFA e TiF_4 1% F^- ; C- FFA 1,23% F^- e TiF_4 1% F^- e D- FFA 1% F^- e TiF_4 1,23% F^- . Foram avaliadas a concentração de F^- aderido, através de exposições a HClO_4 e análise por eletrodo íon- específico, e a formação das lesões, através de avaliações histológicas de secções do esmalte. Foram observadas maiores concentrações de fluoreto nas amostras tratadas com FFA, porém este agente não preveniu tão bem a formação de lesão cariosa quanto o TiF_4 . O autor concluiu que o mecanismo de ação do TiF_4 em prevenir lesões iniciais de esmalte parece não estar envolvido com a concentração de fluoreto incorporada ao esmalte, mas à formação de uma camada superficial protetora que não foi facilmente removida pelos desafios.

Com o objetivo de avaliar o efeito de um novo derivado de tetrafluoreto de titânio na prevenção da cárie dentária, Exterkate e ten Cate (2007) realizaram um estudo *in vitro* em um modelo de ciclagem de pH, em que foram comparados tratamentos diários com soluções de TiF (100, 250 e 500 ppm F, pH 3,0) em relação ao tratamento com NaF, com similares concentrações de fluoreto e pH. Amostras de

esmalte bovino foram pré desmineralizadas (ácido láctico/ metilcelulose; pH 4,6; 1 semana) e logo após, submetidas à ciclagem de pH (14 a 21 dias). Foram analisados três grupos de tratamento: 1- amostras pré desmineralizadas tratadas diariamente, durante 21 dias, com soluções de TiF ou NaF com 100, 250 e 500 ppm F⁻ (1,5 ml; 5 min; pH 3,0), durante ciclos de pH (0,5h DES, pH 4,8/ 2,5h RE, pH 7,0) seguidos de um período de 6 horas de remineralização; 2- amostras pré desmineralizadas tratadas uma vez por semana, durante 21 dias, com soluções de TiF ou NaF com 500 ppm F⁻ (1,5 ml; 5 min; pH 3,0), durante ciclos de pH (0,5h DES, pH 4,8/ 2,5h RE, pH 7,0) seguidos de um período de 6 horas de remineralização; e 3- amostras hígidas pré-tratadas com solução de TiF (100 e 500 ppm F⁻) ou NaF (500 ppm F⁻) através de incubação em 1,5 ml de solução (pH 3,0; 5 min) com posterior imersão em 3 ml de solução remineralizante por 24h. Na sequência, as amostras foram submetidas a uma desmineralização contínua (5 ml solução; pH 4,6 ou 4,4) durante 14 dias. Foi observado que os tratamentos com NaF remineralizaram todas as lesões, reduziram a perda de cálcio e aumentaram a sua captação. Os tratamentos com derivado de TiF gradualmente causaram quase a completa inibição da perda de cálcio, independentemente da concentração. Os autores concluíram que o derivado de TiF é um agente promissor na prevenção e controle da cárie dentária.

A maioria dos estudos presentes na literatura até então avaliou o efeito de soluções de TiF₄. O primeiro estudo *in vitro* em que um verniz de TiF₄ 4% foi avaliado em relação à desmineralização e remineralização do esmalte hígido e do esmalte com lesão artificial de cárie, foi realizado por Magalhães e colaboradores (2008a). Neste estudo, amostras de esmalte bovino foram aleatoriamente divididas entre os grupos de tratamento: D- verniz Duraphat® (NaF; 2,26% F⁻; pH 4,5; Colgate); F- verniz Duofluorid® (NaF, 2,71% F⁻; CaF₂, 2,92% F⁻; pH 8,0; FGM); T- verniz TiF₄ 4% (2,45% F⁻; pH 1,0; FGM) e P- verniz placebo (sem fluoreto). Em metade das amostras foi induzida a formação de lesões de cárie artificial (solução tampão acetato, 16h), enquanto a outra metade permaneceu hígida. Os vernizes foram aplicados na superfície do esmalte e após 6h de contato foram retirados. As amostras foram submetidas a uma ciclagem de pH (6h DES/ 18h RE) durante 7 dias. Pela análise da microdureza superficial e longitudinal, os autores concluíram que o verniz de TiF₄ foi efetivo em diminuir a desmineralização e aumentar a remineralização do esmalte. Os vernizes de TiF₄ e NaF foram igualmente efetivos na

redução da desmineralização de subsuperfície, porém o verniz de TiF_4 mostrou melhor efeito no aumento da remineralização da superfície e subsuperfície que o verniz de NaF .

Em uma revisão de literatura, Wiegand, Magalhães e Attin (2010) avaliaram os efeitos do TiF_4 na progressão e desenvolvimento de lesões cariosas e erosivas. Os autores afirmaram que o modo de ação do TiF_4 está relacionado à formação de uma camada superficial estável e ácido-resistente que pode fornecer proteção mecânica à superfície do esmalte, e também a um aumento na captação de fluoreto, que provavelmente reduz a desmineralização dos tecidos dentários duros. Na maioria dos estudos *in vitro*, o TiF_4 mostrou ser efetivo na redução da formação de lesões cariosas e erosivas em esmalte e dentina, assim como foi igualmente ou mais efetivo que outros agentes fluoretados (NaF , AmF ou SnF_2). Segundo os autores, os resultados de estudos *in vitro* e *in situ*, disponíveis na literatura, sugerem que o TiF_4 é um agente efetivo para prevenção da cárie e erosão dentária. No entanto, há poucos estudos em relação ao efeito preventivo do TiF_4 *in vivo*. Portanto, mais pesquisas são necessárias para confirmar os resultados promissores até então encontrados para lesões artificiais.

Wahengbam, Tikku e Lee (2011) tentaram organizar, em uma revisão sistemática, vários estudos relacionados à utilização do TiF_4 na prática odontológica. Foi discutido o papel deste agente na prevenção à cárie, como selante de fissuras, dessensibilizante dentário, na prevenção da erosão e para irrigação de canais radiculares. A grande maioria dos estudos descreveu a utilização do agente na forma de solução. Mais especificamente em relação ao seu papel na cárie dentária, de modo geral, os autores observaram que quando comparado a outros fluoretos tópicos, o TiF_4 parece ter grandes vantagens. Uma delas seria o fato do agente apresentar pH baixo (1,0), o que pode favorecer a penetração de fluoreto na superfície dos tecidos duros dentários. Além disso, estudos mostraram que a aplicação deste agente pode modificar a superfície do esmalte, resultando na formação de uma camada protetora contra a desmineralização, identificada como *glaze*. Portanto, a interação entre o TiF_4 e a estrutura dentária parece ser diferente dos outros tipos de fluoretos, e o seu efeito protetor pode ser atribuído quimicamente, à diminuição da solubilidade do esmalte pelo aumento do teor de fluoreto e, fisicamente, à formação de uma camada protetora (*glaze*) resistente à penetração de ácidos. Apesar dos diversos estudos incluídos na revisão mostrarem

os bons efeitos e benefícios deste agente, os autores afirmam que o mecanismo de ação do TiF_4 ainda não está claro. Além disso, os autores concluíram que ainda são necessários mais estudos, principalmente ensaios clínicos, em que devem ser testados não apenas o efeito preventivo, mas também a citotoxicidade, a estabilidade das soluções e o real mecanismo de ação do TiF_4 .

Mais um estudo foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa com o objetivo de comparar o efeito de vernizes e soluções de TiF_4 e NaF na desmineralização cariiosa do esmalte, porém agora *in situ* (COMAR et al., 2012). Participaram do estudo 11 voluntários que utilizaram aparelhos palatinos de acordo com 3 fases de tratamento, contendo 4 amostras de esmalte bovino (2 hígidas e 2 previamente desmineralizadas *in vitro*) protegidas com tela plástica para indução do acúmulo de biofilme. Os voluntários participaram de 3 fases cruzadas de 14 dias cada uma, em que uma amostra hígida e uma amostra desmineralizada, de cada voluntário, era tratada em aplicação única no início do experimento por vernizes ou soluções, de acordo com sua respectiva fase: Fase A: verniz de NaF ou solução de NaF (2,45% F^- , pH 5,0); Fase B: verniz de TiF_4 ou solução de TiF_4 (2,45% F^- , pH 1,0); Fase C: verniz placebo (sem F^- , pH 5,0) ou não tratamento (controle). Durante o experimento, apenas as amostras inicialmente hígidas foram expostas a um desafio cariogênico severo (solução de sacarose 20%, por 5 minutos, 8 vezes/dia); nada foi realizado sobre as amostras previamente desmineralizadas, com objetivo de induzir a remineralização. As alterações no esmalte foram quantificadas através de microdureza de superfície e microradiografia transversal. Foi observado que a desmineralização do esmalte foi reduzida por todas as formulações testadas, exceto pela solução de NaF, sendo que tanto o verniz quanto solução de TiF_4 foram tão efetivos quanto o verniz de NaF. Para as amostras previamente desmineralizadas, apenas as formulações de TiF_4 aumentaram a microdureza de superfície, enquanto que a remineralização de subsuperfície não pode ser vista em nenhum grupo. Os autores concluíram que o TiF_4 foi capaz de diminuir a desmineralização do esmalte submetido a desafios cariogênicos severos em um nível similar ao verniz de NaF, enquanto que apenas as formulações de TiF_4 foram capazes de remineralizar a superfície do esmalte.

Nassur e colaboradores (2013) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de preparar e caracterizar um complexo de nano-inclusão ao agente TiF_4 , a fim de minimizar os seus problemas de instabilidade, e também avaliar o seu

potencial na inibição da desmineralização do esmalte submetido à ciclagem de pH. Os nano-sistemas de TiF_4 foram preparados utilizando β -ciclodextrina (βCD), sendo o $\text{TiF}_4:\beta\text{CD}$ o único complexo considerado estável pelos autores. Amostras de esmalte bovino foram divididas em 4 grupos de tratamento: 1- água deionizada (controle negativo); 2- solução de 1% βCD ; 3- solução 1% TiF_4 ; 3- solução $\text{TiF}_4:\beta\text{CD}$. As soluções foram aplicadas na superfície das amostras durante 1 minuto anteriormente à ciclagem de pH (8 dias, 37°C, 4h DES e 20h RE). As amostras foram analisadas por microdureza de superfície, % perda de microdureza, microdureza longitudinal, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de energia dispersiva (EDS). Os autores observaram que a inclusão do complexo $\text{TiF}_4:\beta\text{CD}$ ofereceu uma melhor proteção contra a desmineralização de subsuperfície das amostras. A análise por MEV mostrou que as amostras tratadas com TiF_4 e $\text{TiF}_4:\beta\text{CD}$ foram as que apresentaram o esmalte mais intacto comparado ao controle, e a análise por EDS mostrou presença do elemento Ti nestes dois grupos de tratamento. Os autores concluíram que o complexo $\text{TiF}_4:\beta\text{CD}$ demonstrou-se estável em solução e foi capaz de reduzir a desmineralização de subsuperfície do esmalte. Novos estudos devem ser realizados para determinar as condições ótimas de formação do complexo e protocolos de aplicação devem ser desenvolvidos, incluindo estudos *in situ*, antes da implementação do produto na prática clínica.

Mais recentemente, em um estudo *in situ*, Alcântara e colaboradores (2014) compararam o efeito de aplicações de uma solução de TiF_4 4% e um gel de NaF 2% em lesões de mancha branca artificiais em esmalte humano. Foi um estudo cruzado, duplo-cego, em que 11 voluntários utilizaram um aparelho intrabucal contendo 5 blocos de esmalte humano previamente desmineralizados. Os blocos foram divididos entre os 3 grupos de tratamento: 1- solução de TiF_4 4% (pH 1,2) (n=55); 2- gel neutro de NaF 2% (Topgel, Dentsply) (n=55) e 3- controle (sem aplicações de fluoreto) (n=55). Ao final de cada fase, as amostras foram analisadas por microdureza longitudinal, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de energia dispersiva (EDS), em que foram quantificados os elementos Ti, Ca, P e O. As análises da microdureza longitudinal para as diferentes profundidades do esmalte, não mostraram diferenças significativas entre os 3 grupos de tratamento. No entanto, as amostras dos 3 grupos apresentaram valores de microdureza estatisticamente maiores comparados ao controle desmineralizado (sem exposição *in situ*). A análise por EDS não forneceu resultados conclusivos em

relação à penetração de Ti nas amostras, pois os dados apresentaram-se bem heterogêneos. Os autores concluíram que a solução de TiF_4 4% e o gel de NaF 2% não foram capazes de potencializar a remineralização *in situ* em comparação à saliva. No entanto, deve-se considerar que os produtos apresentam diferenças na base e na concentração de fluoreto e o tempo de uso do aparelho foi de 30 minutos, insuficiente para provocar a remineralização do esmalte.

Com base nesta revisão da literatura pode-se observar que em relação ao verniz à base de NaF há evidência científica que suporta sua eficácia na prevenção das lesões cariosas em especial em pacientes de alto risco à cárie dentária bem como no tratamento das lesões iniciais. Os resultados são oriundos de estudos *in vitro*, *in situ* e principalmente ensaios clínicos. Várias revisões sistemáticas foram publicadas em relação ao assunto dando respaldo científico para o uso clínico deste produto pelo menos 2 x/ano, para o controle da cárie dentária em pacientes de alto risco.

Em relação ao agente tetrafluoreto de titânio, ainda há poucos estudos disponíveis sobre seu efeito na prevenção da cárie, sendo a maioria deles *in vitro*, os quais têm mostrado um bom efeito deste agente na prevenção da desmineralização do esmalte, inclusive superior ao efeito do NaF. No caso específico do verniz de TiF_4 , há somente os estudos publicados pelo nosso grupo de pesquisa, mostrando efeitos iguais ou superiores do verniz de TiF_4 em relação ao NaF *in vitro* e *in situ*. Estes resultados deram embasamento para a realização da presente pesquisa, delineada em continuidade a esta linha desenvolvida pelo grupo. Os resultados de novos estudos *in situ* e futuramente de ensaios clínicos, são de suma importância, pois poderão gerar resultados científicos e tecnológicos de grande aplicabilidade nas diferentes especialidades da Odontologia.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A proposta desta tese foi testar as seguintes hipóteses nulas:

- (1) Não há diferença significativa entre a quantidade de fluoreto liberada pelos vernizes de TiF_4 e NaF em água e saliva artificial, considerando concentrações similares de fluoreto incorporadas ao verniz e os diferentes tempos de liberação;
 - (2) Não há diferenças nos tipos de compostos formados pela interação da HAP e TiF_4 ou NaF , considerando as diferentes concentrações de fluoreto testadas em solução as quais são similares aos vernizes testados no item 1, avaliados por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e difração de raios-X;
 - (3) Não há diferenças significativas nas imagens microscópicas (MEV- detector de microanálise EDAX) e na quantidade de elementos presentes no esmalte bovino e humano hígido e desmineralizado tratados com os vernizes de TiF_4 e NaF ;
 - (4) Não há diferenças significativas na quantidade de CaF_2 depositada (biópsia básica) na superfície do esmalte bovino e humano hígido ou desmineralizado tratados com os vernizes TiF_4 e NaF ;
 - (5) Não há diferenças significativas no ganho ou perda mineral (TMR) do esmalte dentário bovino previamente desmineralizado *in vitro*, após o tratamento com os vernizes de TiF_4 e NaF e das diferentes condições de atividade de cárie *in situ*.
-
-

4 Material e **Métodos**

4 MATERIAL E MÉTODOS

Etapa 1. Avaliação da quantidade de fluoreto liberada pelos vernizes de TiF_4 e NaF na água deionizada e saliva artificial

Tratamento

Para a realização deste protocolo, inicialmente foram obtidas 130 placas de acrílico de tamanhos padronizados (10x10x2mm), sendo 65 placas utilizadas para a análise em água deionizada e 65 para a análise em saliva artificial. As placas foram distribuídas entre os grupos de vernizes experimentais (n=10, Figura 1):

1. Grupo verniz TiF_4 a 1,55% (0,95% F^- , pH 1);
2. Grupo verniz TiF_4 a 3,10% (1,90% F^- , pH 1);
3. Grupo verniz TiF_4 a 4,00% (2,45 % F^- , pH 1)
4. Grupo verniz NaF a 2,10% (0,95% F^- , pH 5);
5. Grupo verniz NaF a 4,20% (1,90% F^- , pH 5);
6. Grupo verniz NaF a 5,42% (2,45% F^- , pH 5).
7. Grupo controle (sem tratamento, n=5)

Figura 1. Vernizes utilizados: TiF_4 a 1,55% (0,95% F^- , pH 1); TiF_4 a 3,10% (1,90% F^- , pH 1); TiF_4 a 4% (2,45 % F^- , pH 1); NaF a 2,10% (0,95% F^- , pH 5); NaF a 4,20% (1,90% F^- , pH 5); NaF a 5,42% (2,45% F^- , pH 5), respectivamente

Preparo das amostras e ensaio de liberação

Para esta etapa, foram adquiridos 780 frascos de poliestireno com tampas flexíveis com volume de 15 mL. Metade dos frascos (390) foi utilizada para a análise com água e a outra metade para a análise com saliva. As placas de acrílico foram fixadas às tampas dos frascos através de um fio de nylon, sendo este fio fixado a uma das faces das placas com cera utilidade, e em seguida, à tampa do frasco também com cera utilidade. Dessa forma, as placas permaneceram suspensas, sem tocar nas bordas dos frascos, durante todo o experimento (Figuras 2 e 3).

Figuras 2 e 3. Preparação das placas de acrílico fixadas às tampas dos frascos de poliestireno utilizando-se fios de nylon e cera utilidade

Com o auxílio de um *microbrush* e uma balança analítica, 30 mg de cada verniz foi pincelado sobre a face livre de cada placa de acrílico, de acordo com seu respectivo grupo descrito acima (Grupos 1 a 6). Após a aplicação dos vernizes, as placas foram imersas em 65 frascos de poliestireno contendo 10 ml de água deionizada e em outros 65 frascos contendo 10 ml de saliva artificial (Figuras 4 a 6). A saliva artificial utilizada para o experimento foi baseada na fórmula de Klimek, Hellwig, Ahrends (1982): glicose 0,2 mM, NaCl 9,9 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM, NH_4Cl 3 mM, KCl 17 mM, NaSCN 2 mM, K_2HPO_4 2,4 mM, uréia 3,3 mM, NaH_2PO_4 2,4 mM e ácido ascórbico 11 μM (pH 6,8).

Figuras 4 a 6. Sequência de aplicação de verniz na placa de acrílico e imersão da amostra em água deionizada ou saliva artificial no interior do frasco de poliestireno

Durante o decorrer do experimento, as tampas dos frascos contendo as placas de acrílico fixadas foram transferidas para um novo frasco com quantidade igual de água ou saliva (10 ml), de acordo com a análise, sendo que esta troca foi realizada aos 30 minutos, 1, 3, 6, 9 e 12h do início do experimento, a temperatura ambiente. Após o experimento, os frascos contendo os líquidos amostrais foram mantidos a uma temperatura de 4°C para a análise do conteúdo de fluoreto.

Análise da concentração de fluoreto

A liberação de fluoreto foi avaliada por meio de eletrodo sensível ao F^- (Thermo ORION 9609, EUA) acoplado a um potenciômetro (Thermo ORION 720A+, EUA). O eletrodo foi lavado com água deionizada corrente e calibrado com padrões de concentrações crescentes de fluoreto. Os padrões foram preparados com diluições seriadas a partir de uma concentração padrão de 100 ppm F^- , variando entre 0,10 e 12,80 ppm F^- para a análise em água deionizada e entre 0,05 e 6,40 ppm F^- para a análise em saliva artificial. Todas os padrões e frascos do experimento foram tamponados com volume equivalente de tampão de ajuste de força iônica total (TISAB II) e as leituras foram realizadas utilizando-se 1 ml de líquido de cada amostra em duplicata.

Cada uma das 780 amostras foi avaliada e a concentração de fluoreto para cada amostra foi determinada através da média entre as duas leituras (mV transformados para μg , e este dividido por ml, considerando a curva-padrão obtida,

$r^2=0,99$). A média para as dez amostras foi calculada para se obter a concentração de fluoreto liberado pelo verniz correspondente para cada grupo, em um determinado intervalo de tempo (liberação pontual e cumulativa).

Os dados foram tabulados em planilhas do Excel e as médias e desvios-padrão foram calculados para cada amostra e grupo experimental. Tanto a liberação de F^- pontual como a cumulativa foi considerada na análise estatística.

Os dados passaram no teste de normalidade e homogeneidade (Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente) e então foram analisados utilizando-se ANOVA a 2 critérios seguido pelo *post-hoc* Bonferroni, considerando como fatores de variação: os tratamentos e períodos experimentais, separadamente para água deionizada e saliva artificial. O software utilizado foi o GraphPad Prism (EUA) e o nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

Etapla 2. Avaliação da ação do TiF_4 e NaF sobre a HAP: análise por FTIR e Difração de raios-X

A síntese da hidroxiapatita (HAP) foi realizada pelo método de precipitação utilizando nitrato de cálcio 1 mol/L ($v=450$ mL, 40° C), ao qual foi adicionada solução de fosfato de amônio dibásico 0,3 mol/L ($v=350$ mL), sob agitação vigorosa em um velocidade de 2-5 mL/min (QU; WEI, 2005; RINTOUL et al., 2007). A solução foi ajustada para pH 10 pela adição de amônia concentrada (20 mL, 28–30%) (Figura 7).

Figuras 7. Obtenção do pó de HAP pelo método de precipitação

Aguardou-se um período de 7 dias para a maturação do pó de HAP a 37° C, checando-se o valor de pH 10 diariamente. Na sequência, a solução foi filtrada utilizando-se funil de Buchner e filtro de papel sob pressão a vácuo 600 mm Hg (Figura 8). O pó obtido foi seco por mais 24h a 70°C (Figura 9). Na sequência, o precipitado foi triturado utilizando-se um almofariz de ágata separando-se os grãos de HAP com até 75 µm de diâmetro por peneiras granulométricas (Figura 10).

Figuras 8 a 10. Sequência da filtragem, obtenção do pó de HAP e separação dos grânulos com a peneira

Soluções de TiF_4 e NaF foram preparadas nas mesmas concentrações dos vernizes utilizados na etapa 1 (TiF_4 1,55%; 3,10%; 4,00% e NaF 2,10%; 4,20%; 5,42%, respectivamente) e uma quantidade de 0,5 g de pó de HAP produzido foi suspenso nas soluções experimentais ($v=10$ mL) durante 1 min, em duplicata. Após

este período, ajustou-se o pH para 7,0 com NaOH 1 M e as amostras permaneceram em estufa por 30 min (37° C). As soluções à base de TiF_4 apresentaram pH inicial em torno de 1,0; já as soluções de NaF tiveram o pH ajustado inicialmente com ácido fosfórico para 5,0. Pó de HAP também foi suspenso em água deionizada, sendo considerado como controle negativo. Este procedimento foi realizado em duplicata. Após filtragem e secagem por 24h a 70°C, o precipitado foi peneirado obtendo-se grãos com até 75 μm de diâmetro através de peneiras granulométricas (Figuras 11 e 12).

Figuras 11 e 12. Obtenção do precipitado após o tratamento da HAP com TiF_4 a 4% e obtenção de grãos com 75 μm de diâmetro através de peneiras granulométricas, respectivamente

Análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Utilizou-se o equipamento da BOMEM (Canada), modelo MB 102, software Bgrams (Win Bomem Easy), disponível no Departamento de Química da UFSCAR-São Carlos, sob supervisão do Prof. Dr. Alzir de Azevedo Batista.

A espectroscopia de infravermelho por transformação de Fourier (FTIR) é uma técnica não destrutiva que é utilizada na identificação dos grupos funcionais de fosfato, carbonato e hidroxila através das suas ligações químicas, onde é gerado um espectro do infravermelho com bandas de absorção características de cada tipo de ligação (TROMMER; SANTOS; BERGMANN, 2007). Para a análise por FTIR, as amostras de HAP tratadas foram preparadas misturando-as com KBr. Na sequência, as amostras foram prensadas na forma de pastilhas.

Os comprimentos de onda que o espectro abrange variam de 4000 a 200 cm^{-1}

e a resolução do aparelho é de 4 cm^{-1} . As intensidades dos modos vibracionais das ligações hidroxila, carboxila, fosfato, C-O-C, entre outras foram avaliadas e comparadas através de um software Bgrams (Win Bomem Easy). Foram realizados 32 escaneamentos por amostra (20 escaneamentos/minuto). As Figuras 13 a 15 mostram a sequência de preparo e análise. Os espectros de infravermelhos obtidos em duplicata para cada grupo foram confrontados com os espectros da HAP publicados em trabalhos prévios. Eventuais reduções e deslocamentos de picos referentes às ligações de fosfato e hidroxila serão abordados na seção de resultados.

Figuras 13 a 15. Amostras preparadas com KBr na forma de pastilhas; pastilha em posição para análise; equipamento utilizado para a análise por espectroscopia de infravermelho, respectivamente

Análise por difração de raios-X

Utilizando a difração de raios-X podemos averiguar se o Ti pode substituir o cálcio na apatita, bem como se há incorporação de fluoreto à apatita assim como a formação de outros compostos.

Para tal, o pó previamente preparado e tratado foi submetido à análise utilizando-se um difratômetro Siemens modelo D5005 (Alemanha), equipado com um monocromador de grafite e um ânodo rotativo de cobre, operando a 40 kV e 40 mA. A análise foi realizada em uma faixa 2θ de 5 a 90° , 2 graus x min e passo 0,032 grau/seg. Todas as análises foram feitas com radiação Cu K α filtrada por Ni, comprimento de onda $\lambda=1,54056$ Å, inerente ao tubo de cobre e as fases identificadas usando um banco de dados. As análises foram realizadas em duplicata no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, na cidade de São Carlos-SP.

Como os dados são qualitativos, nenhuma análise estatística foi aplicada. Nos resultados, serão mostrados os difratômetros e os compostos encontrados.

Etapas 3. Avaliação da ação dos vernizes de TiF₄ e NaF sobre a superfície do esmalte bovino e humano (hígido e desmineralizado): análise por MEV-detector de microanálise EDAX

Obtenção dos dentes e preparo das amostras de esmalte bovino e humano

Trezentos incisivos bovinos e sessenta terceiros molares humanos foram utilizados no presente estudo. Os dentes foram limpos com curetas periodontais para remover todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície e posteriormente lavados com água deionizada e armazenados em solução de cloreto de sódio e timol a 0,1% (pH 7,0), durante todo o período de preparo dos espécimes de esmalte.

As coroas foram fixadas com godiva (Kerr, São Paulo, Brasil) em uma placa de acrílico (40x40x5 mm³). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, EUA) e com dois discos diamantados dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 x 0,3 x 12,7 mm³ (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) e um espaçador de aço inoxidável (7cm de diâmetro, orifício central de 1,3 cm e 4 mm de espessura para os dentes bovinos e 3 mm de espessura para os dentes humanos) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, foram obtidos blocos de esmalte bovino 4 mm x 4 mm da porção mais

plana da coroa, através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido méso-distal. (Figuras 16 a 18).

Figuras 16 a 18. Sequência de corte das amostras de esmalte bovino. Imagens da cortadeira ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) e da amostra de esmalte bovino (4 mm x 4 mm)

Para a obtenção das amostras de esmalte humano foram cortadas rodela de esmalte de 3 mm de espessura em corte transversal à coroa (Figuras 19 a 21). Em seguida, as rodela foram fixadas novamente nas placas de acrílicos e 4 blocos de esmalte 3 mm x 3 mm foram obtidos de cada rodela (Figuras 22 e 23).

Figuras 19 a 21. Corte transversal à coroa do dente humano para se obter rodela de esmalte de 3 mm

Figuras 22 e 23. Corte das rodela para obtenção dos blocos de esmalte de 3 mm x 3 mm

Após o corte, as amostras de esmalte foram submetidas a um polimento. Para tal, as amostras foram fixadas com cera de incrustação (Asfer, Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, Brasil) com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex SS White, Rio de Janeiro, Brasil) e uma lamparina (Jon, Ind. Bras., São Paulo, Brasil) no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura), com a face de esmalte voltada para o disco, com o intuito de realizar primeiramente a planificação da dentina. O conjunto (disco/dente) foi adaptado em uma Politriz Metalográfica (Arotec, Cotia-SP, Brasil) para realizar a planificação da dentina, permitindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico no qual foram fixadas as amostras. Para tal, foi utilizada uma lixa de carbeto de silício de granulação 320 (Extec Corp., Enfield, CT, EUA), sob refrigeração com água deionizada, até que as amostras ficassem com espessura de aproximadamente 3 mm (Figuras 24 e 25). Para tanto, a politriz foi acionada em baixa velocidade, entre 5 a 15 s, até se alcançar a espessura desejada.

Figuras 24 e 25. Planificação da dentina utilizando uma politriz metalográfica

Em seguida, as amostras foram removidas do disco de acrílico, sendo estes limpos com xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha), para que se retirasse todo o resíduo de cera aderido a eles. Posteriormente, as amostras de esmalte foram novamente fixadas com cera no centro da placa de acrílico com a face de esmalte exposta, para que fosse feito o polimento, objetivando a obtenção de uma superfície absolutamente plana e paralela à base, indispensável para a realização dos testes. Novamente o conjunto foi adaptado a politriz e o esmalte foi desgastado inicialmente com uma lixa de carbeto de silício de granulação 600 (Extec Corp., Enfield, CT, EUA), sob refrigeração com água deionizada, durante 1-2 min para o esmalte bovino e 15-20 s para o esmalte humano, com 2 pesos, em velocidade baixa. Em seguida, foi feito o polimento do esmalte com lixa de carbeto de silício de granulação 1200 (Extec Corp., Enfield, CT, EUA), sob refrigeração, durante 2-3 min, com 2 pesos, em velocidade alta, removendo-se aproximadamente 200 μm da superfície do esmalte bovino e 50-100 μm da superfície do esmalte humano, cujo controle foi realizado com o auxílio de um micrômetro (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão) (Figuras 26 e 27).

Figuras 26 e 27. Polimento de uma amostra de esmalte bovino (4 mm x 4 mm) e humano (3 mm x 3 mm), respectivamente

Para impedir que os grãos das primeiras lixas interferissem na qualidade do polimento das seguintes, entre cada etapa de polimento, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultra-som T7 Thornton, com frequência de 40 KHz, durante 2 minutos, com água deionizada. Ao final do polimento, este procedimento foi repetido por 5 minutos.

A microdureza de superfície inicial (SH inicial) foi avaliada em todas as amostras utilizando-se o Microdurômetro Shimadzu (HMV 2) acoplado em um software, composto por um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP através da realização de cinco endentações por leitura, a distância de 100 μ m entre elas (com carga de 25 g e tempo de 10 s), com o objetivo de selecionar e alocar as amostras em cada grupo de tratamento. Foram selecionadas as amostras de esmalte bovino que apresentaram SH inicial entre 305,6 a 379,4 KHN (média de $342,9 \pm 18,6$ KHN) e amostras de esmalte humano que apresentaram SH inicial entre 329,6 a 416 KHN (média de $367,9 \pm 17,7$ KHN).

Metade das amostras permaneceu hígida, enquanto a outra metade foi desmineralizada. Para as amostras previamente desmineralizadas (DES), as lesões artificiais de cárie foram produzidas utilizando a solução desmineralizante composta por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mM (LabSynth); KH_2PO_4 3 mM (Sigma-Aldrich); ácido láctico 50 mM (Sigma); tetraetil metidifosfanafato 6 μ M (Sigma-Aldrich) e traços de timol, (pH ajustado a 5,0 com adição de KOH 10M) em um volume de 30 ml/bloco, por um período de 6 dias para o esmalte bovino e um período de 12 dias pra o esmalte humano, a uma temperatura de 37°C (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985). Um piloto foi realizado para determinar o tempo de desmineralização do esmalte humano, uma vez que o período de 6 dias foi insuficiente para produzir uma lesão de cárie compatível com a lesão produzida por esta solução em dente bovino. A lesão de cárie artificial produzida por esta solução por 12 dias foi checada utilizando-se microradiografia transversal conforme imagem de uma amostra representativa abaixo (Figura 28).

Figura 28. Imagem de microradiografia de uma amostra de esmalte humano representativa do piloto de 12 dias em solução desmineralizante

Logo após a indução da lesão de cárie artificial, as amostras foram submetidas à análise da microdureza de superfície pós-desmineralização (SH lesão) conforme descrito anteriormente. Dessa forma, calculou-se a porcentagem de alteração de dureza de superfície [%SHC= (SH lesão – SH inicial)/ SH inicial) x100], sendo selecionadas amostras de esmalte bovino que apresentaram perda de dureza superficial entre 62,6 a 92,2% (média de 77,3 ± 8,6% de perda) e amostras de esmalte humano que apresentaram perda de dureza superficial entre 47,3 a 98,5% (média de 75,4 ± 12,9% de perda).

As amostras foram alocadas nos grupos de tratamento conforme média dos valores de %SHC para as amostras desmineralizadas, já para as amostras hígidas (H) essa alocação foi realizada de acordo com a média de SH inicial.

Tratamento das amostras de esmalte bovino e humano

Para a avaliação da ação de TiF_4 e NaF sobre o esmalte, 70 amostras de esmalte bovino e 70 amostras de esmalte humano foram selecionadas, sendo que em metade delas (35) foi produzida lesão de cárie artificial (DES) e a outra metade permaneceu hígida (H).

As amostras foram aleatoriamente divididas nos 7 grupos de tratamento (n=10, 5 hígidos e 5 desmineralizados): Grupo 1- verniz de TiF_4 1,55%; Grupo 2- verniz de TiF_4 3,10%; Grupo 3- verniz de TiF_4 4,00%; Grupo 4- verniz de NaF 2,10%; Grupo 5- verniz de NaF 4,20%; Grupo 6- verniz de NaF 5,42% e Grupo 7- controle (sem tratamento).

Os vernizes foram aplicados na superfície do esmalte com auxílio de um *microbrush* e as amostras permaneceram imersas em saliva artificial (KLIMEK; HELLWIG; AHRENS, 1982) durante um período de 12h (período de tratamento escolhido mediante resultados da Etapa 1) em potes individuais (Figuras 29 a 31). Na sequência, o verniz foi removido com auxílio de uma lâmina de bisturi e uma haste de algodão flexível (Cotonete®, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) embebido em solução de acetona/água 1:1 (Figuras 32 e 33) (MAGALHÃES et al., 2008b).

Figuras 29 a 31. Aplicação do verniz na amostra de esmalte seguida de armazenamento da mesma em saliva artificial em potes individuais

Figuras 32 e 33. Remoção do verniz da amostra através de lâmina de bisturi e cotonete® embebido em solução de acetona, respectivamente

Análise por MEV- detector de microanálise EDAX

Após o tratamento, as amostras foram cuidadosamente desidratadas em um dessecador a vácuo contínuo durante um período de dois dias e logo após foram metalizadas com cobertura de ouro (Figura 34). Em seguida, todas as amostras foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura-MEV (Inspect™ S50, filamento de tungstênio; FEI Company, Hillsboro-Oregon, EUA) em que foram avaliadas nos modos de imagens de elétrons retro-espalhados (BSE) e elétrons secundários (SE). Desta forma, fotos digitais foram obtidas com a distribuição das fases formadas nas superfícies tratadas do esmalte. A caracterização química da superfície do esmalte foi realizada pela quantificação dos elementos presentes na superfície em porcentagem (Ca, P, F, Ti, Mg, Na, Cl, O, C e K), utilizando-se um detector de microanálise EDAX acoplado ao MEV (Figura 35). Foram realizadas duas microanálises por amostra, em regiões diferentes, e as determinações foram

Wallis/Dunn, individualmente para o esmalte hígido e desmineralizado. O software utilizado foi o GraphPad InStat (EUA) e o nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

Etapla 4. Avaliação da quantidade de CaF_2 depositada sobre o esmalte bovino e humano (hígido e desmineralizado) tratados com vernizes de TiF_4 e NaF : análise por biópsia básica

Tratamento e ensaio da biópsia básica

Para a análise da quantidade de CaF_2 depositada sobre o esmalte dentário após os tratamentos com os vernizes fluoretados, 140 blocos de esmalte bovino e 140 blocos de esmalte humano, preparados conforme descrição prévia, foram selecionados para esta etapa, sendo metade das amostras previamente desmineralizadas (70 DES) e a outra metade hígida (70 H) ($n=20$, 10 hígidos e 10 desmineralizados, 7 grupos de tratamento). O tratamento com os vernizes NaF e TiF_4 , nas três concentrações, foi realizado por 12 h, conforme descrito no ensaio anterior.

Inicialmente as amostras de esmalte foram imersas e limpas em uma solução de acetona diluída em água deionizada (1:1), durante ± 10 segundos, e secas em gaze estéril. As amostras foram manuseadas somente com pinças para que não houvesse incorporação de partículas de gordura oriundas da mão. A seguir, uma fita adesiva foi perfurada utilizando um perfurador de dique de borracha, a fim de se obter uma área circular dessa fita. Esta área circular foi colada sobre a superfície do esmalte por meio de uma pinça (Figura 36). Com a fita colada na superfície do esmalte, o restante da área foi isolada com cera do tipo enceramento (Asfer, Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, Brasil) (Figura 37). Após a secagem da cera na superfície da amostra, a fita adesiva foi removida, expondo uma área de $3,14 \text{ mm}^2$ da superfície, que foi submetida à biópsia básica (Figuras 38 e 39).

Figuras 36 a 39. Sequência de preparo da amostra de esmalte para a realização da biópsia básica

As amostras foram tratadas com os vernizes, como descrito anteriormente, e logo após foram imersas em 1 ml de KOH a 1M em seus respectivos potes J10 (Figura 40), onde permaneceram durante 24h sob agitação, em temperatura ambiente. Na sequência, as amostras foram removidas de seus potes e o extrato básico obtido foi neutralizado com 1 ml de TISAB II (HCl 1M) (Figuras 41 e 42) e homogeneizado em um agitador (CASLAVSKA; MORENO; BRUDEVOLD, 1975).

Figuras 40 a 42. Amostra imersa em 1 ml de KOH no interior de um pote J10; retirada da amostra do pote para posterior neutralização com 1 ml de TISAB II (HCl)

As soluções foram submetidas à análise de fluoreto utilizando eletrodo sensível aos íons F^- (Thermo ORION 9609, EUA) acoplado a um potenciômetro (Thermo ORION 720A+, EUA), previamente calibrados com padrões contendo 0,125 a 16 ppm de F^- para o esmalte bovino, e 0,50 a 8 ppm de F^- para o esmalte humano. Os padrões foram preparados anteriormente com a solução padrão de estoque (100 ppm F), em duplicata (somente os padrões). A curva de calibração foi realizada seguindo os padrões preparados. Os dados de mV foram convertidos em $\mu g F$, considerando a curva-padrão obtida ($r^2=0,99$).

Os dados da quantidade de fluoreto liberado pelas amostras foram tabulados em planilhas do Excel, sendo que para a obtenção da concentração de fluoreto álcali solúvel, dividiu-se o valor encontrado pela área exposta ($\mu g F/mm^2$). Os dados foram submetidos à ANOVA a 2 critérios seguida pelo teste de Bonferroni considerando como fatores de variação: a condição do esmalte (hígido ou desmineralizado) e os tratamentos, separadamente para o esmalte bovino e humano. O software utilizado foi o GraphPad Prism (EUA) e o nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

Etapas 5. Protocolo *in situ*: Avaliação do efeito de vernizes de TiF_4 e NaF sobre a des-remineralização do esmalte dentário bovino submetido a diferentes condições de desafio cariogênico: análise por microrradiografia transversal (TMR)

Preparo das amostras de esmalte bovino

Seiscentos e vinte incisivos bovinos recém-extraídos foram adquiridos no Frigorífico Vangélio Mondelli Ltda., em Bauru-SP para utilização no presente estudo. O corte e polimento foram realizados conforme previamente descrito. A média de desgaste do esmalte durante o polimento foi de $226 \pm 113 \mu\text{m}$, cujo controle foi realizado com o auxílio de um micrômetro (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão).

A microdureza de superfície inicial (SH inicial) foi avaliada em 612 amostras de esmalte utilizando-se o Microdurômetro Shimadzu (HMV 2) acoplado em um software, composto por um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP através da realização de cinco endentações por leitura, com distâncias de $100 \mu\text{m}$ entre elas (com carga de 25 g e tempo de 10 s), com o objetivo de selecionar e alocar as amostras. Foram selecionados 544 blocos que apresentaram SH inicial entre 320,6 a 400,8 KHN (média de $376,3 \pm 16,2$ KHN).

Todas as amostras foram protegidas em 1/3 da superfície com esmalte cosmético de unha para a obtenção de uma superfície controle de esmalte hígido e então foram submetidas à desmineralização *in vitro* (Figuras 43 e 44) como já descrito e ilustrado nas etapas anteriores (Solução DES, pH ajustado a 5,0, 30 ml/bloco, 6 dias, 37°C) (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985). Um piloto com poucas amostras foi realizado para averiguar a efetividade da solução, anteriormente à desmineralização de todas as amostras. A lesão de cárie foi checada por microrradiografia transversal (Figuras 45 e 46).

Figuras 43 e 44. Amostra de esmalte hígido com 1/3 da superfície protegida e amostra de esmalte após indução de cárie artificial, apresentando lesão de mancha branca em 2/3 da superfície, respectivamente

Figuras 45 e 46. Imagens representativas de TMR das amostras desmineralizadas *in vitro* no teste piloto

Logo após a indução da lesão de cárie artificial em todas as amostras, as amostras foram submetidas à análise da microdureza de superfície pós-desmineralização (SH lesão) conforme descrito anteriormente. Dessa forma, calculou-se a porcentagem de alteração de microdureza de superfície [%SHC= (SH lesão – SH inicial)/ SH inicial) x100], sendo selecionadas 480 amostras de esmalte que apresentaram perda de dureza superficial entre 69,6 a 98,3% (média de $87,2 \pm 7,6$ %). As amostras tiveram mais 1/3 da superfície protegida com esmalte cosmético de unha (Figura 47) para a obtenção de uma superfície controle desmineralizada não tratada (DES) e foram aleatoriamente distribuídas nos grupos de tratamento, nas condições de des-remineralização do protocolo *in situ* e nos voluntários conforme média dos valores de %SHC. As amostras foram desinfetadas por meio de

imersão em solução de álcool a 70% durante 30 minutos (SCHLUETER; KLIMEK; GANSS, 2009).

Figura 47. Amostra desmineralizada *in vitro* com 2/3 da superfície de esmalte protegida (controle DES em azul)

Protocolo in situ

Vinte e seis adultos foram convidados a participar deste projeto *in situ*, sendo que 21 aceitaram, porém 20 foram selecionados a partir dos dados obtidos na anamnese, exame clínico e explicação minuciosa do protocolo de pesquisa. O cálculo do número de voluntários se baseou no estudo anterior desenvolvido por Comar e colaboradores (2012). Os voluntários deveriam apresentar boa saúde geral (exclusão: gestantes, pacientes com doenças sistêmicas e com uso de medicação crônica) e saúde bucal (exclusão: baixo fluxo salivar, baixo valor de pH salivar, cárie ativos e com doença periodontal).

Realizaram-se profilaxia, exame clínico e teste de fluxo salivar (estimulado e não estimulado). Foram selecionados voluntários na faixa etária entre 19 e 42 anos (FSE: $2,1 \pm 0,6$ mL/min, FSNE: $0,4 \pm 0,2$ mL/min, pH salivar $7,5 \pm 0,3$), residentes em área fluoretada (cidade de Bauru-SP). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOB/USP (Processo 114/2011, ANEXO A). Os voluntários só aceitaram participar da pesquisa após explicação minuciosa de seus objetivos a partir de uma leitura da Carta de esclarecimento ao voluntário e assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B).

Os voluntários tiveram seus arcos dentários superiores moldados em alginato e então foram vazados os respectivos modelos em gesso pedra para a confecção dos

aparelhos intrabuciais palatinos em resina acrílica (Figura 48), nos quais foram acopladas as amostras de esmalte bovino previamente desmineralizadas.

Figura 48. Aparelho intrabucal palatino confeccionado em resina acrílica

As amostras foram aleatoriamente distribuídas nos 3 grupos de tratamento (verniz de TiF_4 , verniz de NaF e verniz Placebo); nas condições de des-mineralização *in situ* (1-sem tela e sem aplicação de sacarose, 2-com tela e sem aplicação de sacarose, 3-com tela e aplicação de sacarose 4x/dia e 4-com tela e aplicação de sacarose 8x/dia); e para os 20 voluntários, conforme média dos valores de %SHC.

Os voluntários participaram de 3 fases cruzadas, aleatórias e duplo-cegas: **Fase A:** verniz de NaF a 5,45% (pH 5); **Fase B:** verniz experimental de TiF_4 a 4,00% (pH 1) e **Fase C:** verniz placebo (sem flúor, pH 5). Os tratamentos com os vernizes foram realizados *in vitro* no dia anterior ao início de cada fase. As amostras tratadas permaneceram durante 6h em saliva artificial, da mesma forma como descrito anteriormente.

Logo em seguida ao tratamento *in vitro*, os aparelhos palatinos foram montados de forma que fossem acopladas 8 amostras de esmalte bovino com cera de incrustação (Asfer, Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, Brasil). As amostras correspondentes ao mesmo tratamento por aparelho foram distribuídas entre as 4 condições de des-remineralização: 2 amostras acopladas rentes à resina acrílica para evitar o acúmulo de biofilme e induzir à remineralização; 2 amostras inseridas 1,5 mm abaixo da superfície do aparelho protegidas com tela plástica para induzir acúmulo de biofilme sem exposição à sacarose; 2 amostras na mesma

situação, porém sobre as quais foi gotejada sacarose a 20% 4x/dia; e 2 amostras na mesma situação, porém sobre as quais foi gotejada sacarose a 20% 8x/dia (Figura 49). Para cada voluntário, a cada nova fase um novo aparelho palatino foi confeccionado para evitar contaminação cruzada entre os tratamentos.

Figura 49. Aparelho palatino pronto com as 8 amostras acopladas de acordo com as diferentes condições (2 amostras/condição) de des-remineralização *in situ*

Uma semana anterior ao início do experimento, os voluntários receberam um kit cedido pela pesquisadora, contendo uma escova dentária (Ultra Soft CS 5460, Curaprox, Suíça), um fio dentário sem fluoreto (Classic 100 m, Dentic) e um tubo de dentifrício fluoretado (NaF, 1100 ppm F, Sorriso® Fresh Plus Menthol Impact, Colgate, Brasil), com os quais foram orientados a manter a higiene bucal durante este período inicial, para que fosse eliminado qualquer resquício de fluoreto de outras fontes presente no ambiente bucal. Um dia antes do início de cada fase, os voluntários recebiam outro kit contendo uma caixa de aparelho ortodôntico com o aparelho palatino, um frasco conta-gotas descartável contendo solução de sacarose a 20%, outro frasco conta-gotas descartável contendo suspensão de dentifrício fluoretado 1:3 água (NaF, 1100 ppm F, Sorriso® Fresh Plus Menthol Impact, Colgate, Brasil), gaze estéril e uma lista com instruções aos voluntários (ANEXO C). Cada fase teve duração de 14 dias e um *washout* (período de descanso) de 7 dias entre elas.

Durante todo o período experimental, os voluntários foram orientados a permanecerem com o aparelho na boca durante 20 horas (h) por dia, retirando-o

apenas para as 4 refeições diárias (máximo de duração de 1h cada). O intervalo entre as refeições foi estabelecido entre 2 a 3 h e, durante o período de refeições, o aparelho deveria ser armazenado em gaze umedecida com água de torneira, sendo imprescindível a realização da higiene bucal com os produtos cedidos anteriormente ao reposicionamento do aparelho na boca.

Os voluntários foram orientados a manter os hábitos alimentares usuais e a realizar higienização bucal utilizando os produtos fornecidos pela pesquisadora durante todas as etapas do estudo. A limpeza do aparelho somente deveria ser realizada na superfície interna (em contato com o palato duro), quando fosse julgado necessário, não sendo permitida a higienização da superfície que continha os blocos de esmalte. Além disso, os voluntários também foram instruídos a não utilizarem nenhum outro produto fluoretado ou anti-placa, a não serem os cedidos pela pesquisadora, durante todo o período experimental.

Para a realização do experimento, os voluntários foram orientados a aplicar 1 gota de solução de sacarose a 20% em cada amostra correspondente a esta condição, durante 5 minutos fora da boca, 4 vezes (condição 3) ou 8 vezes/dia (condição 4), com intervalo de pelo menos 1h entre cada desafio, com objetivo de induzir à desmineralização. Após os 5 minutos, o aparelho deveria ser reposicionado na boca. Além disso, duas vezes ao dia, durante a primeira e última higiene bucal, os voluntários deveriam aplicar uma gota da suspensão de dentifrício fluoretado sobre todas as amostras, durante 1 minuto fora da boca. Em seguida o aparelho deveria ser reposicionado na boca e enxaguado com um leve bochecho de água de torneira.

Tanto a solução de sacarose quanto a suspensão de dentifrício foram preparadas pela pesquisadora no Laboratório de Bioquímica da FOB-USP, sendo que a solução de sacarose foi trocada a cada 4 dias para evitar crescimento de microrganismos e a suspensão de dentifrício, a cada nova fase. Adicionalmente, os voluntários foram orientados a agitar o pote com as soluções anteriormente ao uso e também a ficarem atentos para que a solução de sacarose não escorresse sobre as amostras que não deveriam recebê-la (condições 1 e 2).

Análise por microrradiografia transversal (TMR)

Após a finalização das três fases do protocolo *in situ*, as amostras foram removidas dos aparelhos palatinos (Figura 50), limpas com algodão embebido em água deionizada, em seguida foram cortadas (com máquina de corte e disco diamantado, descritos anteriormente) em três fatias iguais de aproximadamente 1,33 mm cada, de forma a englobar as 3 situações de cada amostra: região controle hígida (H), região controle desmineralizada *in vitro* (DES) e região desmineralizada/tratada *in vitro* e exposta *in situ* (DES-RE) (Figuras 51 e 52).

Figura 50. Aparelho palatino após experimento *in situ*

Figuras 51 e 52. Amostras posicionadas e fixadas de forma a englobar as 3 áreas da amostra e amostras cortadas em três fatias iguais, respectivamente

Inicialmente, a fatia central de cada amostra seccionada foi fixada com cera de incrustação (Asfer, Indústria Química Ltda., São Caetano do Sul, Brasil) com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex SS White, Rio de Janeiro, Brasil) e uma lamparina (Jon, Ind. Bras., São Paulo, Brasil) no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura) (Figura 53). A fatia foi então polida manualmente em movimentos suaves e circulares com lixa de carbeto de silício granulação 600 (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) (Figura 54) até atingir uma espessura apropriada entre 80 a 100 μm (Figuras 55 e 56), espessura ideal para análise por TMR. A espessura de todas as amostras foi checada através um micrômetro digital (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão). De uma maneira geral as amostras mostraram-se frágeis e fraturavam facilmente durante o corte ou polimento, portanto as outras duas fatias de cada amostra foram utilizadas para um novo polimento e reposição das amostras fraturadas.

Figuras 53 a 56. Fatia de uma amostra fixada na placa de acrílico circular; polimento manual da fatia com lixa de granulação 600; polimento final e fatia com espessura de aproximadamente 90 μm , respectivamente

As amostras polidas foram coladas com fita adesiva em um porta-amostra de plástico (em torno de 36 amostras/porta-amostra, Figura 57), contendo o padrão de alumínio com diferentes espessuras, as quais geram diferentes gradações de cinza (*stepwedge*). O porta-amostra foi inserido em um cassette (Figura 58), juntamente à placa de vidro (filme) em ambiente escuro, sendo o conjunto envolvido em um saco preto e inserido dentro do gerador de raios-X (Softex, Japão) (Figuras 59). Dessa forma, a placa de vidro foi sensibilizada pelos raios-X (20 kv e 20mA) por 13 min.

Figuras 57 a 59. Porta-amostra completo com 36 fatias; cassete contendo porta amostra+*stepwedge* e o conjunto envolvido em saco preto em posição para ser irradiado, respectivamente

Após cada exposição, a placa de vidro foi revelada (por 4 minutos), fixada (por 6 minutos) em ambiente escuro a 20°C e lavada (por 10 minutos). A Figura 60 mostra a placa revelada, pronta para ser analisada. A análise da imagem foi realizada utilizando microscópio (Zeiss, Alemanha) com câmera CCD (Canon, Japão) e acessórios acoplado a um computador com software 2012 para captura e 2006 para a análise (Inspektor Research System bv, Holanda) (Figura 61).

Figuras 60 e 61. Placa de vidro revelada e microscópio (Zeiss, Alemanha) com câmera CCD (Canon, Japão) acoplada ao computador (Softwares, Inspektor Research System bv, Holanda)

A partir das análises das fatias de alumínio (14 fatias para a construção da curva-padrão) e das amostras foram calculadas a perda mineral integrada (ΔZ) e profundidade da lesão (P) usando a fórmula de Angmar; Carlstromd; Glas (1963). O ΔZ (%vol. μm) é o produto da diferença entre a porcentagem de volume mineral de um esmalte sadio e porcentagem de volume mineral do esmalte desmineralizado em relação à profundidade da lesão (μm). Já a profundidade da lesão (μm) é definida pela distância da superfície (0% vol. min.) até a profundidade em que o esmalte volta a apresentar um conteúdo mineral igual ou maior que 95% (82,5%) do conteúdo mineral do esmalte sadio (ARENDS; TEM BOSCH, 1992). O volume mineral do esmalte hígido corresponde a 87%. A profundidade da camada superficial pseudo-intacta (S, μm) e o valor R ($\Delta Z/\text{profundidade}$, % vol. min.), sendo este último representativo da média de perda mineral da lesão, também foram calculados. Para analisar a des ou remineralização do esmalte ao final do experimento *in situ*, o $\Delta\Delta Z$ foi calculado pela diferença entre o ΔZ lesão e ΔZ efeito (pós *in situ*), o ΔP foi calculado pela diferença entre o P lesão e P efeito (pós *in situ*), o ΔR foi calculado pela diferença entre o R lesão e o R efeito (pós *in situ*) e o ΔS foi calculado pela diferença entre o S efeito (pós *in situ*) e o S lesão. A Figura 62 mostra uma análise por TMR de uma amostra representativa do protocolo *in situ*.

Figura 62. Imagem representativa de uma análise completa de TMR

Os dados referentes ao $\Delta\Delta Z$, ΔP , ΔR e ΔS foram tabulados em planilhas do Excel e o programa Graph Pad Prism (San Diego, EUA) foi utilizado para a análise estatística. Foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal e se eram homogêneos (teste Kolmogorov e Smirnov/ Bartlett) pelo Programa Graph Pad Instat. Após esta verificação, foi aplicado o teste estatístico ANOVA a dois critérios (critérios: tratamento e condição de des-remineralização) seguido pelo teste post-hoc Bonferroni. O número amostral final foi de 17 (após a exclusão de 3 voluntários que apresentaram valores muito discrepantes) e o nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Etapa 1. Avaliação da quantidade de fluoreto liberada pelos vernizes de TiF_4 e NaF na água deionizada e saliva artificial

ANOVA a 2 critérios seguida pelo teste de Bonferroni revelou diferenças significativas entre os tratamentos, períodos e interação entre os fatores ($p < 0,0001$) tanta para a água deionizada quanto para a saliva artificial. A concordância entre as duplicatas foi satisfatória e variou de 98 a 100% (Curva padrão $r^2 > 0,99$).

Em relação à liberação de fluoreto cumulativa, houve uma relação dose-resposta entre a concentração de fluoreto no verniz e a quantidade de fluoreto liberado no meio, a qual foi mais evidente para a água deionizada em comparação à saliva artificial, especialmente após 6h de exposição. Os vernizes de TiF_4 liberaram mais fluoreto em água que os respectivos vernizes de NaF com a mesma concentração de fluoreto, em todas as concentrações testadas, por 12h (Figura 63). Em relação à saliva artificial, os vernizes de TiF_4 liberaram mais fluoreto que os respectivos vernizes de NaF por 6, 9 e 12h, respectivamente (Figura 64).

Figura 63. Média da liberação cumulativa de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em água deionizada nos diferentes períodos experimentais

Figura 64. Média da liberação cumulativa de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em saliva artificial nos diferentes períodos experimentais

As tabelas 1 e 2 mostram a liberação de fluoreto pontual na água e na saliva, respectivamente. O pico de liberação ocorreu nas primeiras 3h de contato, porém os vernizes continuaram liberando fluoreto até 12h de exposição. O padrão de liberação dos vernizes de TiF_4 (exceto para o verniz de TiF_4 a 1,55%) foi significativamente maior em comparação aos vernizes de NaF até 6h de exposição na água (nos outros períodos não houve diferença significativa) e nos períodos de 30 min, 3 e 6h em saliva artificial. No período de 12h em saliva, a relação se inverteu: NaF liberou mais fluoreto que TiF_4 .

Tabela 1. Média e d.P. da liberação pontual de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em água deionizada nos diferentes períodos avaliados

	30 min	1h	3h	6h	9h	12h
TiF₄ 1,55%	3,68±0,55 aB	2,73±0,62 bAB	7,59±1,85 cC	3,74±1,35 cB	2,16±0,27 cAB	1,37±0,21 bA
TiF₄ 3,10%	5,42±1,52 aBC	7,05±2,72 aCD	20,12±3,94 bE	8,58±1,20 bD	4,09±0,70 bAB	2,92±1,04 bA
TiF₄ 4,00 %	4,75±0,87 aA	4,48±2,00 aA	26,85±5,26 aD	13,12±2,22 aC	6,95±1,17 aB	3,33±0,57 aA
NaF 2,10%	0,93±0,47 bA	1,32±0,83 bA	3,60±1,88 eB	2,20±0,78 cAB	1,65±0,71 cAB	1,01±0,54 bA
NaF 4,20%	0,92±0,30 bA	1,39±0,27 bA	5,42±1,73 deBC	5,59±1,63 cBC	5,95±1,58 abC	3,77±0,99 abB
NaF 5,42%	1,36±0,35 bA	1,79±0,65 bAB	7,20±1,50 cdC	7,55±1,23 bC	6,21±1,06 abC	3,63±0,83 aB
Controle	0,16±0,01	0,15±0,02	0,11±0,00	0,09±0,00	0,14±0,00	0,15±0,01

Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos para cada tempo experimental (comparação por coluna), já letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tempos para cada tratamento (comparação por linha). ANOVA a 2 critérios ($p < 0,0001$). OBS: Controle não foi incluso na análise estatística. O grupo controle foi utilizado para testar eventuais contaminações.

Tabela 2. Média e d.P. da liberação pontual de fluoreto (ppm) proveniente dos vernizes fluoretados em saliva artificial nos diferentes períodos avaliados

	30 min	1h	3h	6h	9h	12h
TiF₄ 1,55%	2,55±0,55 bAB	1,45±0,53 aA	4,72±0,64 aC	3,08±0,41 aB	1,40±0,14 aA	1,26±0,28 aA
TiF₄ 3,10%	6,97±1,73 dC	6,92±1,51 bC	7,69±1,22 bC	3,54±0,40 aB	1,58±0,16 aA	1,17±0,08 aA
TiF₄ 4,00 %	4,03±0,55 cB	1,84±0,32 aA	16,63±4,79 cD	14,78±4,46 dC	5,06±1,56 bcB	2,42±0,58 abA
NaF 2,10%	0,40±0,13 aA	0,74±0,17 aAB	4,93±1,55 aC	4,43±0,53 abC	2,64±0,29 abB	1,99±0,19 abB
NaF 4,20%	1,09±0,39 abA	1,51±0,36 aAB	5,04±1,11 aC	5,36±0,94 bcC	3,71±0,43 bB	2,83±0,44 bB
NaF 5,42%	0,92±0,27 aA	1,34±0,45 aA	5,69±0,58 aB	6,80±1,19 cB	5,56±0,82 cB	5,44±0,50 cB
Controle	0,10±0,00	0,10±0,0	0,10±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00	0,08±0,00

Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tratamentos para cada tempo experimental (comparação por coluna), já letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tempos para cada tratamento (comparação por linha). ANOVA a 2 critérios ($p < 0,0001$). OBS: Controle não foi incluso na análise estatística. O grupo controle foi utilizado para testar eventuais contaminações.

Com base nos resultados apresentados, o verniz de TiF₄ tem maior capacidade de liberar fluoreto comparado ao verniz de NaF tanto em água como em saliva artificial, sendo a diferença especialmente relevante nas primeiras 6h de contato. Esta etapa foi publicada na revista *Journal of Applied Oral Science* (COMAR et al., 2014).

Etapa 2. Avaliação da ação do TiF_4 e NaF sobre a HAP: análise por FTIR e Difração de raios-X

Gráficos representativos obtidos por espectroscopia de infravermelho (BOMEM, MB 102), de acordo com cada grupo de tratamento (Grupos 1 a 7), estão apresentados abaixo (Figuras 65 a 71).

Figura 65. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com TiF_4 a 1,55%

Figura 66. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com TiF_4 a 3,10%

Figura 67. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com TiF₄ a 4,00%

Figura 68. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com NaF a 2,10%

Figura 69. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com NaF a 4,20%

Figura 70. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com NaF a 5,42%

Figura 71. Perfil das bandas expressas pela HAP tratada com água (controle)

De uma forma geral, por meio da análise por *FTIR*, foi possível identificar os grupos funcionais fosfato (PO_4^{3-}), carbonato (CO_3^{2-}) e hidroxila (OH^-), grupamentos característicos da estrutura de hidroxiapatita (Figura 71).

Para o grupo controle (Figura 71), o espectro apresentou bandas referentes à deformação do grupamento PO_4^{3-} nas faixas 602,57 e 565,91 cm^{-1} ; em 1040,13 cm^{-1} , banda referente ao estiramento deste grupamento. Em relação ao grupamento OH^- , o espectro apresentou banda referente à deformação angular da hidroxila em 1637,83 cm^{-1} , correspondente à água fisissorvida ao cristal e em 3448,01 cm^{-1} , banda referente às vibrações do estiramento do grupamento OH^- da água adsorvida. Além disso, foram apresentadas bandas referentes às vibrações moleculares do grupamento CO_3^{2-} na faixa de 1400 cm^{-1} , o que indica a presença de hidroxiapatita carbonatada.

Para os grupos referentes ao tratamento com TiF_4 (Figuras 65 a 67), os espectros apresentaram bandas referentes à deformação do grupamento PO_4^{3-} de 602,72 a 603,26 cm^{-1} e de 565,78 a 566,06 cm^{-1} . De 1037,04 a 1037,14 cm^{-1} , os espectros apresentaram bandas referentes ao estiramento do grupamento fosfato. Em relação ao grupamento OH^- , os espectros apresentaram bandas referentes à deformação da hidroxila de 1640,46 a 1644,40 cm^{-1} , e de 3445,36 a 3449,37 cm^{-1} , bandas referentes ao estiramento do grupamento hidroxila. Observou-se que quanto mais concentrada foi a solução de TiF_4 , maior foi a proporção de bandas referentes

à OH^- e menor foi a proporção de bandas referentes à deformação do grupo PO_4^{3-} em comparação ao grupo controle. Dessa forma, o TiF_4 causa maior hidratação da HAP e reduz a deformação do grupo fosfato. Adicionalmente, não foi vista banda referente ao carbonato. Portanto, podemos inferir que o TiF_4 induz à formação de uma HAP mais pura, com maior estabilidade e resistência ao ácido.

Em relação aos grupos referentes ao tratamento com NaF (Figuras 68 a 70), os espectros apresentaram bandas referentes à deformação do grupamento PO_4^{3-} em $603,80\text{ cm}^{-1}$ e de $565,78$ a $567,74\text{ cm}^{-1}$. De $1040,95$ a $1067,57\text{ cm}^{-1}$, os espectros mostraram bandas referentes ao estiramento do grupamento fosfato. Em relação ao grupamento OH^- , os espectros apresentaram bandas referentes à deformação da hidroxila de $1638,17$ a $1641,07\text{ cm}^{-1}$, e de $3457,32$ a $3483,53\text{ cm}^{-1}$, bandas referentes ao estiramento do grupamento hidroxila. Além disso, foram apresentadas bandas referentes às vibrações moleculares do grupamento CO_3^{2-} de $1372,28$ a $1394,44\text{ cm}^{-1}$, o que indica a presença de hidroxiapatita carbonatada. Este grupo provavelmente se formou pela reação da HAP com o ar na presença de gás carbônico (contaminação). Na faixa de pH da solução de NaF, a apatita carbonatada não é totalmente dissolvida em comparação ao pH mais baixo como no caso do TiF_4 .

Observou-se ainda falta de coerência entre os grupos de NaF. Houve uma diminuição da intensidade das bandas hidroxila e fosfato até a concentração de NaF 4,20%. No entanto, para o NaF mais concentrado, a proporção de hidroxila em relação ao fosfato aumentou. Isto é esperado em função da solubilidade do NaF (máximo de 5%). Provavelmente, parte do NaF a 5,42% não se solubilizou na água e, portanto, não interagiu de forma apropriada com a HAP. Em geral, não foi possível ver incorporação de fluoreto à HAP.

As figuras 72 a 78 mostram um difratograma representativo de cada tratamento com os fluoretos. No caso das amostras de HAP tratadas com TiF_4 , independentemente da concentração, formaram-se os seguintes compostos: HAP, fluoreto de cálcio, dióxido de titânio e fosfato de hidrogênio titânio hidratado. Para as amostras tratadas com NaF, notamos a presença de HAP, fosfato de sódio e cálcio e fluoreto de cálcio. Para as amostras do grupo controle foi constatada a presença de HAP apenas.

Figura 72. Difratoograma das amostras de HAP tratadas com TiF_4 a 1,55% Figura 73. Difratoograma das amostras de HAP tratadas com TiF_4 a 3,10%

Figura 74. Difratoograma das amostras de HAP tratadas com TiF_4 a 4,00%

Figura 75. Difratoograma das amostras de HAP tratadas com NaF a 2,10%

Figura 76. Difractograma das amostras de HAP tratadas com NaF a 4,20%

Figura 77. Difractograma das amostras de HAP tratadas com NaF a 5,42%

Figura 78. Difratoograma das amostras de HAP tratada com água (controle)

Portanto, com base nestas análises, podemos concluir que o TiF_4 não causou substituição de elementos na estrutura da HAP, mas sim induziu à formação de novos compostos, por dissolução da HAP e precipitação superficial de compostos contendo Ti e F, os quais provavelmente fazem parte da camada ácido-resistente vista no MEV, tornando o esmalte menos solúvel na presença de ácidos relacionados à cárie e a erosão dentária. Estes dados preliminares podem explicar em parte os bons resultados desse verniz experimental de TiF_4 nos processos de des-remineralização da estrutura dentária (cárie e erosão) em comparação ao verniz convencional contendo NaF.

Etapas 3. Avaliação da ação dos vernizes de TiF_4 e NaF sobre a superfície do esmalte bovino e humano (hígido e desmineralizado): análise por MEV-detector de microanálise EDAX

As Figuras 79 a 85 mostram imagens representativas obtidas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV InspectTM S50) do esmalte **BOVINO** (H e DES), de acordo com cada grupo de tratamento.

Figuras 79. Imagens de MEV representativas do grupo 1 (verniz de TiF_4 a 1,55%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figuras 80. Imagens de MEV representativas do grupo 2 (verniz de TiF₄ a 3,10%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figuras 81. Imagens de MEV representativas do grupo 3 (verniz de TiF_4 a 4,00%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figuras 82. Imagens de MEV representativas do grupo 4 (verniz de NaF a 2,10%). a) esmalte hígido 10.000x. b) esmalte hígido 30.000x. c) esmalte desmineralizado 10.000x. d) esmalte desmineralizado 30.000x. Imagens com maior aumento foram inseridas, pois as com menor aumento não mostravam nenhuma alteração morfológica

Figuras 83. Imagens de MEV representativas do grupo 5 (verniz de NaF a 4,20%). a) esmalte hígido 10.000x. b) esmalte hígido 40.000x. c) esmalte desmineralizado 10.000x. d) esmalte desmineralizado 40.000x. Imagens com maior aumento foram inseridas, pois as com menor aumento não mostravam nenhuma alteração morfológica

Figuras 84. Imagens de MEV representativas do grupo 6 (verniz de NaF a 5,42%). a) esmalte hígido 10.000x. b) esmalte hígido 40.000x. c) esmalte desmineralizado 10.000x. d) esmalte desmineralizado 40.000x. Imagens com maior aumento foram inseridas, pois as com menor aumento não mostravam nenhuma alteração morfológica, especialmente no caso do esmalte desmineralizado

Figuras 85. Imagens de MEV representativas do grupo 7 (controle). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Em relação ao esmalte bovino, pôde-se observar que para os grupos tratados com os vernizes de TiF_4 , houve a formação de uma camada de revestimento sobre a superfície do esmalte, apresentando microfissuras em sua extensão, independente da condição do esmalte, H ou DES. A formação dessa camada foi ligeiramente mais evidente para os vernizes mais concentrados (Grupos 2 e 3, Figuras 80 e 81).

Para as amostras tratadas com os vernizes de NaF (Grupos 4 e 5, Figuras 82 e 83), observou-se uma superfície lisa similar ao controle, em especial no esmalte H, podendo ser observados alguns glóbulos espalhados em um maior aumento da imagem (Figuras 82b e d). Interessante é que para o esmalte desmineralizado tratado com verniz de NaF a 2,10% (Figura 82c) foi possível ver o

padrão de desmineralização similar ao grupo controle (Figura 85d), mostrando nenhum efeito remineralizante deste produto sobre o esmalte desmineralizado. Por outro lado, não foi possível averiguar padrão de desmineralização nem glóbulos sobre a superfície do esmalte tratada com o verniz de NaF a 4,2% (Figura 83). Apenas para o verniz de NaF mais concentrado (Grupo 6, Figura 84), foi observada um precipitado globular que pode ser similar aos glóbulos *like*-CaF₂ somente para o esmalte hígido. As imagens da amostra desmineralizada e tratada com verniz de NaF 5,42% foram similares às imagens das amostra oriunda do verniz de NaF 4,20%. Para o grupo controle, nada foi visto sobre o esmalte hígido. Adicionalmente, a Figura 85d mostrou a característica de “favos de mel” do esmalte desmineralizado, ou seja, ficou visível a estrutura prismática do esmalte (regiões prismáticas e interprismáticas).

Em relação aos elementos encontrados sobre a superfície das amostras de esmalte **BOVINO** (microanálise), as alterações entre os grupos de tratamentos foram vistas para os elementos Ca, P, F e Ti (Tabela 3). Em geral, as porcentagens de Ca e P foram significativamente maiores para os grupos tratados com verniz de NaF (sem relação com a concentração de fluoreto) e controle em comparação aos tratados com TiF₄. Este resultado foi evidente especialmente para amostras híginas.

Por outro lado, a quantidade de fluoreto presente na superfície do esmalte foi significativamente maior para as amostras tratadas com TiF₄ em comparação àquelas tratadas com NaF, independentemente da concentração de fluoreto (somente para as amostras desmineralizadas houve uma tendência para dose-resposta), sendo que os vernizes à base de NaF não diferiram do controle. Estes resultados estão em acordo com os dados de liberação de fluoreto em água pelos vernizes experimentais fluoretados.

Somente as amostras tratadas com TiF₄ apresentaram Ti na superfície, sendo a relação dose-resposta somente evidente para as amostras desmineralizadas, similarmente ao que ocorreu com o F. Em relação às amostras tratadas com TiF₄, foi observado que as que apresentaram as maiores porcentagens de Ti e F foram aquelas que apresentaram menores porcentagens de Ca e P, sendo esta relação especialmente evidente nas amostras híginas. A relação Ca/P para as amostras tratadas com verniz de TiF₄ variou entre 0,80 e 0,98 e para as amostras tratadas com verniz de NaF e controle variou entre 0,99 e 1,04, mostrando que o TiF₄ provavelmente cause uma alteração na estequiometria da apatita dentária ou

precipitação de novos compostos como apontado pelos resultados da difração de raios-X, sendo a última hipótese mais provável.

Tabela 3. Média e d.P. da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de esmalte **BOVINO** hígido e desmineralizado tratadas com diferentes vernizes fluoretados

Hígdos				
	Ca	Ti	F	P
TiF₄ 1,55%	15,8±0,9 ^b	1,0±0,3 ^{bc}	3,9±1,4 ^{ab}	16,0±0,5 ^b
TiF₄ 3,10%	10,9±1,2 ^c	4,5±1,3 ^a	8,6±3,7 ^a	13,5±1,3 ^c
TiF₄ 4,00%	14,9±1,1 ^b	1,9±0,7 ^{ab}	2,3±1,1 ^{abc}	16,6±0,7 ^b
NaF 2,10%	19,7±1,5 ^a	0,0±0,0 ^{bc}	0,5±0,2 ^{bc}	18,8±1,2 ^a
NaF 4,20%	19,1±0,7 ^a	0,0±0,0 ^{bc}	0,5±0,2 ^{bc}	18,4±0,9 ^a
NaF 5,42%	19,8±0,6 ^a	0,0±0,0 ^{bc}	0,7±0,4 ^{abc}	19,2±0,2 ^a
Controle	19,0±0,8 ^a	0,0±0,0 ^c	0,4±0,1 ^c	18,8±0,7 ^a
Desmineralizados				
	Ca	Ti	F	P
TiF₄ 1,55%	17,2±2,2 ^{ab}	0,4±0,2 ^{ab}	2,2±0,9 ^{ab}	17,3±1,0 ^{ab}
TiF₄ 3,10%	17,7±1,2 ^{ab}	1,1±0,4 ^{ab}	4,7±0,8 ^a	17,5±0,3 ^{ab}
TiF₄ 4,00%	15,0±0,2 ^b	1,6±0,3 ^a	4,9±1,7 ^a	16,3±0,2 ^b
NaF 2,10%	18,7±2,7 ^{ab}	0,0±0,0 ^b	0,6±0,2 ^{ab}	18,8±0,4 ^a
NaF 4,20%	20,0±0,3 ^a	0,0±0,0 ^b	0,6±0,2 ^{ab}	19,2±0,1 ^a
NaF 5,42%	18,9±1,3 ^{ab}	0,0±0,0 ^b	0,5±0,2 ^b	18,6±1,0 ^{ab}
Controle	17,4±1,1 ^{ab}	0,0±0,0 ^c	0,3±0,1 ^b	18,4±0,8 ^{ab}

* Para as análises dos elementos P (hígido) e Ca (hígido) foi aplicada ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$); para as análises do Ti, F, P (des) e Ca (des), teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Letras diferentes na mesma coluna apontam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento e condição do esmalte (hígido e desmineralizado, separadamente).

As figuras 86 a 92 mostram imagens representativas do esmalte HUMANO (H e DES), de acordo com cada grupo de tratamento.

Figura 86. Imagens de MEV representativas do grupo 1 (verniz de TiF_4 a 1,55%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figura 87. Imagens de MEV representativas do grupo 2 (verniz de TiF_4 a 3,10%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figura 88. Imagens de MEV representativas do grupo 3 (verniz de TiF_4 a 4,00%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figura 89. Imagens de MEV representativas do grupo 4 (verniz de NaF a 2,10%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figura 90. Imagens de MEV representativas do grupo 5 (verniz de NaF a 4,20%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figura 91. Imagens de MEV representativas do grupo 6 (verniz de NaF a 5,42%). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Figura 92. Imagens de MEV representativas do grupo 7 (controle). a) esmalte hígido 1.000x. b) esmalte hígido 10.000x. c) esmalte desmineralizado 1.000x. d) esmalte desmineralizado 10.000x

Para o esmalte **HUMANO** de uma forma geral, pôde-se observar que para os grupos tratados com os vernizes de TiF_4 , houve a formação de uma camada de revestimento sobre a superfície do esmalte, apresentando microfissuras em sua extensão, independente da condição de esmalte, H ou DES (Figuras 86 a 88). A formação dessa camada foi ligeiramente mais evidente para os vernizes mais concentrados.

Para as amostras tratadas com os vernizes de NaF (Figuras 89 a 91), observou-se uma superfície lisa similar ao controle, independentemente da condição do esmalte e concentração do verniz. Apenas para o verniz de NaF mais concentrado (Grupo 6, Figura 91), foi observada um raro precipitado globular similar

ao que chamamos de glóbulos *like*-CaF₂ somente para o esmalte hígido. Para o grupo controle (Figura 92), nada foi visto, tanto sobre o esmalte hígido quanto sobre o desmineralizado. Estas imagens são similares às obtidas para o esmalte bovino após tratamento com os respectivos vernizes fluoretados e controle.

Em relação aos elementos encontrados sobre a superfície das amostras (microanálise por EDAX, Tabela 4), as porcentagens de Ca e P foram significativamente maiores para os grupos tratados com verniz de NaF (sem relação com a concentração de fluoreto) e controle em comparação aos tratados com TiF₄ para o esmalte hígido. Para o esmalte desmineralizado, não houve diferença significativa entre grupos.

Por outro lado, a quantidade de fluoreto presente na superfície do esmalte hígido foi significativamente maior para as amostras tratadas com TiF₄ em comparação ao controle, independentemente da concentração de fluoreto, sendo que os vernizes à base de NaF não diferiram do controle. Somente as amostras tratadas com verniz de TiF₄ a 4% apresentaram % maior de fluoreto em relação ao controle para a amostra desmineralizada.

As amostras tratadas com TiF₄ apresentaram maior quantidade de Ti na superfície que as amostras dos outros grupos, sendo uma relação dose-resposta somente evidente para as amostras híginas.

Tabela 4. Média e d.P. da % de elementos presentes sobre a superfície das amostras de esmalte **HUMANO** hígido e desmineralizado tratadas com diferentes vernizes fluoretados

Hígidos				
	Ca	Ti	F	P
TiF₄ 1,55%	19,0±0,6 ^{ab}	0,7±0,4 ^{bc}	3,2±2,3 ^b	19,3±0,4 ^{ab}
TiF₄ 3,10%	19,3±1,4 ^{abc}	1,2±0,9 ^c	3,0±2,3 ^b	19,8±1,0 ^b
TiF₄ 4,00%	17,7±1,0 ^a	1,3±0,5 ^c	5,4±1,5 ^b	18,6±0,9 ^a
NaF 2,10%	20,8±1,4 ^c	0,1±0,1 ^a	0,7±0,3 ^a	20,5±0,6 ^b
NaF 4,20%	20,3±0,8 ^{bc}	0,1±0,1 ^{ab}	1,4±0,4 ^{ab}	20,4±0,6 ^b
NaF 5,42%	20,3±1,3 ^{bc}	0,1±0,0 ^a	1,0±0,8 ^a	20,3±0,8 ^b
Controle	20,3±0,7 ^{bc}	0,0±0,0 ^a	0,3±0,2 ^a	20,1±0,4 ^b
Desmineralizados				
	Ca	Ti	F	P
TiF₄ 1,55%	18,9±2,5 ^a	0,6±0,5 ^b	2,7±2,9 ^{ab}	19,0±1,5 ^a
TiF₄ 3,10%	19,4±1,5 ^a	1,0±0,7 ^b	2,1±1,7 ^{ab}	19,7±1,0 ^a
TiF₄ 4,00%	18,5±1,9 ^a	1,0±0,4 ^b	4,1±2,9 ^{bc}	19,7±0,9 ^a
NaF 2,10%	20,1±1,0 ^a	0,1±0,1 ^a	0,6±0,3 ^a	20,3±0,7 ^a
NaF 4,20%	19,7±1,8 ^a	0,1±0,1 ^a	0,6±0,3 ^a	19,6±1,3 ^a
NaF 5,42%	20,5±1,1 ^a	0,1±0,1 ^a	0,8±0,5 ^{ab}	20,6±0,7 ^a
Controle	20,7±1,2 ^a	0,1±0,0 ^a	0,4±0,3 ^a	20,4±0,5 ^a

* Kruskal-Wallis/ Dunn foram aplicados para os dados de F e Ti e ANOVA/Tukey para os dados de Ca e P ($p < 0,05$). Para cada condição do esmalte individualmente, letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa entre os grupos de tratamento.

Quando comparamos o resultado do esmalte humano com o bovino, percebemos que o esmalte humano hígido apresenta maior porcentagem de Ca e P na superfície. Enquanto a % de F e Ti para o esmalte humano hígido tratado com TiF₄ é menor que o bovino, a % F para o esmalte humano tratado com NaF é maior

que o bovino. Para o esmalte desmineralizado, o mesmo resultado é visto em relação ao Ca e P; enquanto para o F e Ti, os resultados são similares na comparação entre esmalte bovino e humano. Portanto, há diferenças na reatividade do TiF_4 conforme o tipo de esmalte.

Etapas 4. Avaliação da quantidade de CaF_2 depositada sobre o esmalte bovino e humano (hígido e desmineralizado) tratados com vernizes de TiF_4 e NaF: análise por biópsia básica

ANOVA a 2 critérios seguido pelo teste de Bonferroni revelou diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,0001$), os tipos de esmalte ($p < 0,0001$) e interação entre fatores ($p < 0,0001$) tanto para o esmalte bovino como para o esmalte humano.

Em relação aos diferentes tratamentos, para o esmalte **BOVINO**, as amostras tratadas com verniz de TiF_4 a 3,10% e 4,00% foram as que mais proporcionaram deposição de fluoreto álcali-solúvel quando comparadas às amostras tratadas com verniz de TiF_4 a 1,55%, vernizes à base de NaF e controle, independente da condição do esmalte (hígido ou desmineralizado) (Tabela 5). O verniz de TiF_4 a 4,00% ainda proporcionou maior deposição de fluoreto sobre o esmalte que o verniz de TiF_4 a 3,10% para as amostras desmineralizadas. As amostras tratadas com os vernizes de NaF, independentemente da concentração de fluoreto, não apresentaram deposição significativamente maior de fluoreto álcali-solúvel comparadas às amostras do grupo controle. Este resultado está de acordo com os dados obtidos em relação à porcentagem de fluoreto pelo uso do detector de microanálise EDAX e as imagens do MEV.

Em relação ao tipo de esmalte, as amostras de esmalte **BOVINO** desmineralizadas apresentaram mais fluoreto álcali-solúvel que as amostras híginas somente para os grupos tratados com os vernizes de TiF_4 , já para o NaF essa diferença entre os tipos de esmalte não foi significativa. Apesar da análise do fluoreto álcali-solúvel ter mostrado maior deposição de fluoreto nas amostras desmineralizadas em relação às híginas para o TiF_4 , este dado não foi confirmado pelo detector de microanálise EDAX, uma vez que esta última técnica considera o fluoreto total (nos primeiros 5 μm de profundidade).

Tabela 5. Média e d.P. da quantidade de fluoreto álcali-solúvel ($\mu\text{gF}/\text{mm}^2$) sobre as amostras de esmalte **BOVINO** hígidas e desmineralizadas

Vernizes\Amostra	H	DES
TiF ₄ 1,55%	0,19±0,11 ^{aA}	0,50±0,11 ^{aB}
TiF ₄ 3,10%	1,10±0,73 ^{bA}	2,57±1,05 ^{bB}
TiF ₄ 4,00%	1,57±0,96 ^{bA}	3,60±1,68 ^{cB}
NaF 2,10%	0,05±0,02 ^{aA}	0,17±0,10 ^{aA}
NaF 4,20%	0,05±0,03 ^{aA}	0,07±0,05 ^{aA}
NaF 5,42%	0,20±0,16 ^{aA}	0,39±0,24 ^{aA}
Controle	0,01±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os vernizes para cada condição de esmalte (comparação por coluna), já letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tipos de amostras de esmalte para cada verniz (comparação por linha). ANOVA a 2 critérios ($p < 0,0001$).

Para o esmalte **HUMANO**, em relação aos diferentes tratamentos, as amostras desmineralizadas tratadas com verniz de TiF₄ a 3,10% e 4,00% foram as que apresentaram maior deposição de fluoreto álcali-solúvel quando comparadas às amostras tratadas com verniz de TiF₄ a 1,55%, vernizes à base de NaF e controle. Neste caso, todos os vernizes fluoretados diferiram do controle. Já as amostras hígidas que apresentaram maior deposição de fluoreto álcali-solúvel foram as tratadas com verniz de TiF₄ a 3,10% e 4,00% e verniz de NaF a 5,42%, sendo que todos os tratamentos diferiram do controle com exceção do TiF₄ a 1,55% (Tabela 6). Com base nas análises de EDAX e biopsia, o verniz de TiF₄ foi superior ao NaF somente para as amostras desmineralizadas.

Em relação à condição do esmalte, as amostras desmineralizadas apresentaram mais fluoreto álcali-solúvel que as amostras hígidas em todos os

grupos com exceção ao grupo NaF 5,42%, para o qual essa diferença não foi significativa (Tabela 6).

Tabela 6. Média e d.P. da quantidade de fluoreto álcali-solúvel ($\mu\text{gF}/\text{mm}^2$) sobre as amostras de esmalte humano hígidas e desmineralizadas

Vernizes\Amostra	H	DES
TiF₄ 1,55%	0,06±0,03 ^{abA}	0,24±0,10 ^{bB}
TiF₄ 3,10%	0,12±0,03 ^{bcA}	0,31±0,12 ^{cB}
TiF₄ 4,00%	0,20±0,08 ^{dA}	0,33±0,13 ^{cB}
NaF 2,10%	0,09±0,04 ^{bA}	0,21±0,05 ^{bB}
NaF 4,20%	0,07±0,04 ^{bA}	0,21±0,14 ^{bB}
NaF 5,42%	0,17±0,05 ^{cdA}	0,21±0,06 ^{bA}
Controle	0,00±0,00 ^{aA}	0,00±0,00 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os vernizes para cada condição de esmalte (comparação por coluna), já letras maiúsculas diferentes mostram diferenças significativas entre os tipos de amostras de esmalte para cada verniz (comparação por linha). ANOVA a 2 critérios ($p < 0,0001$).

Quando comparamos os dados da biopsia básica entre esmalte humano e bovino, as amostras de esmalte humano (H e DES) tratadas com os vernizes de TiF₄ apresentaram menor deposição de fluoreto álcali-solúvel que as amostras de esmalte bovino; para aquelas tratadas com NaF, não houve diferença entre esmalte bovino e humano.

De uma forma geral, o verniz de TiF₄ parece ser mais reativo sobre o esmalte bovino, enquanto para o NaF não há diferença entre esmalte bovino e humano.

Etapa 5. Protocolo *in situ*- Avaliação do efeito de vernizes de TiF_4 e NaF sobre a des-remineralização do esmalte dentário bovino submetido a diferentes condições de desafio cariogênico: análise por microrradiografia transversal (TMR)

Os vinte voluntários selecionados completaram o estudo, porém três foram excluídos por razões como perda da amostra durante o corte e polimento para a análise de TMR e também por algumas amostras apresentarem dados muito discrepantes da média geral (“*outliers*”). Portanto, o número amostral final foi de 17 voluntários. Nenhum voluntário relatou algum efeito colateral oriundo da utilização do aparelho palatino ou dos produtos cedidos pela pesquisadora durante o experimento.

A Tabela 7 mostra a média dos valores referentes ao cálculo do $\Delta\Delta Z$. Pôde-se observar de uma maneira geral que o protocolo *in situ* provocou remineralização nas amostras sobre as quais não houve acúmulo de biofilme dentário. No entanto, na presença de biofilme dentário, somente com a aplicação dos vernizes fluoretados foi possível obter remineralização. Na presença de biofilme, apenas o fluoreto oriundo da solução de dentifrício (fase verniz placebo) não foi capaz de induzir à remineralização do esmalte, inclusive houve desmineralização das amostras, sendo que este efeito foi mais acentuado nas condições de exposição à sacarose.

Tabela 7. Média e d.P. dos valores da diferença da perda mineral integrada ($\Delta\Delta Z$, % vol. min. x μm) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização *in situ*

Condições/ tratamento	Verniz TiF_4	Verniz NaF	Placebo
1-Sem tela sem sacarose	376,6 $\pm$ 236,5 ^{aA}	311,6 $\pm$ 254,3 ^{aA}	2,0 $\pm$ 377,2 ^{bA}
2-Com tela sem sacarose	319,7 $\pm$ 226,6 ^{aA}	48,3 $\pm$ 380,6 ^{bAB}	-95,2 $\pm$ 376,3 ^{bA}
3-Com tela sacarose 4x/dia	345,3 $\pm$ 202,5 ^{aA}	318,7 $\pm$ 341,8 ^{aA}	-436,2 $\pm$ 540,8 ^{bB}
4-Com tela sacarose 8x/dia	223,0 $\pm$ 378,9 ^{aA}	-74,2 $\pm$ 206,7 ^{bB}	-218,4 $\pm$ 187,3 ^{bAB}

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa entre os tratamentos para cada condição e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa entre as condições para cada tratamento (ANOVA/Bonferroni, $p < 0,0001$, $n=17$). Valores positivos significam remineralização; enquanto os valores negativos, desmineralização.

O verniz de TiF_4 foi efetivo em remineralizar as amostras de esmalte em todas as condições testadas em comparação ao placebo, independente da severidade do desafio cariogênico, sendo que não foram encontradas diferenças significativas entre as condições para este verniz. Já o verniz de NaF foi efetivo apenas nas condições de menor desafio (com exceção do biofilme sem sacarose) em relação ao placebo. Portanto, o efeito do verniz NaF se mostrou dependente da condição clínica. No caso do verniz NaF, houve diferença entre a condição de maior desafio cariogênico (4) e as demais condições. Para o verniz placebo, as condições 1 e 2 (menor desafio cariogênico) foram similares e diferiram significativamente das condições 3 e 4 (maior desafio cariogênico).

A Tabela 8 mostra a média dos valores referentes ao cálculo do ΔP (variação da profundidade da lesão). Da mesma forma como ocorreu para o cálculo do $\Delta\Delta Z$, o verniz de TiF_4 se mostrou mais eficaz em diminuir a profundidade da lesão, quando comparado ao verniz placebo, para todas as condições de desafio

cariogênico, o que não ocorreu para o verniz de NaF, o qual foi melhor que o placebo apenas para a condição 1 (ausência de biofilme) e condição 3 (baixo desafio cariogênico). Para este cálculo, apesar da diferença numérica, não houve diferença significativa entre o verniz de TiF_4 e NaF na presença de biofilme e alto desafio cariogênico.

Quando são comparadas as condições de des-remineralização para cada tratamento, a condição 4 (maior desafio cariogênico) apresentou um aumento significativo na profundidade da lesão em comparação à condição 2 (sem sacarose) na qual houve diminuição da profundidade da lesão, para o verniz TiF_4 . Já para o verniz de NaF, as condições 3 e 4 apresentaram um aumento significativo na profundidade da lesão em comparação à condição 1 (sem desafio), na qual houve uma diminuição da profundidade da lesão. No caso do verniz placebo, as condições 3 e 4 aumentaram a profundidade da lesão em comparação às condições 1 e 2.

Tabela 8. Média e d.P. dos valores da diferença da profundidade da lesão (ΔP , μm) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização *in situ*

Condições/ tratamento	Verniz TiF_4	Verniz NaF	Placebo
1-Sem tela sem sacarose	$28,3 \pm 14,5^{aAB}$	$23,8 \pm 21,0^{aA}$	$1,7 \pm 24,5^{bA}$
2-Com tela sem sacarose	$37,0 \pm 42,3^{aA}$	$8,8 \pm 28,4^{bAB}$	$2,7 \pm 24,2^{bA}$
3-Com tela sacarose 4x/dia	$19,6 \pm 18,9^{aAB}$	$1,2 \pm 27,2^{aB}$	$-21,9 \pm 22,3^{bB}$
4-Com tela sacarose 8x/dia	$12,3 \pm 11,7^{aB}$	$-0,75 \pm 29,3^{abB}$	$-17,4 \pm 28,3^{bAB}$

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha mostram diferença significativa entre os tratamentos para cada condição e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa entre as condições para cada tratamento (ANOVA/Bonferroni, $p < 0,0001$, $n=17$). Valores positivos significam redução da profundidade da lesão; enquanto os valores negativos, aumento da profundidade da lesão.

As Tabelas 9 e 10 mostram, respectivamente, as médias dos valores referentes ao cálculo do ΔR e a média dos valores referentes ao cálculo da variação da espessura (ΔS) e conteúdo mineral máximo da camada superficial ($\Delta Z_{\max}$).

Tabela 9. Média e d.P. dos valores da diferença da perda mineral média (ΔR , % vol.min) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização *in situ*

Condições/ tratamento	Verniz TiF_4	Verniz NaF	Placebo
1-Sem tela sem sacarose	$-2,55 \pm 6,48$	$-1,98 \pm 5,08$	$0,63 \pm 4,81$
2-Com tela sem sacarose	$-0,65 \pm 6,08$	$-2,46 \pm 5,82$	$-2,65 \pm 4,45$
3-Com tela sacarose 4x/dia	$-2,02 \pm 3,22$	$0,16 \pm 3,47$	$-0,19 \pm 3,77$
4-Com tela sacarose 8x/dia	$1,14 \pm 7,23$	$-0,04 \pm 8,03$	$-0,40 \pm 5,66$

*Não houve diferença significativa entre os tratamentos para cada condição, nem entre as condições para cada tratamento (ANOVA/Bonferroni, $p > 0,05$, $n=17$). Valores positivos significam remineralização; enquanto os valores negativos, desmineralização.

Tabela 10. Média e d.P. dos valores da diferença da espessura e conteúdo mineral máximo da camada superficial (ΔS e $\Delta Z_{\max}$, μm e %) referente ao esmalte desmineralizado submetido a diferentes tratamentos e condições de des-remineralização *in situ*

Condições/ tratamento	Verniz TiF_4		Verniz NaF		Placebo	
	μm	%	μm	%	μm	%
1-Sem tela sem sacarose	-0,84 $\pm$ 2,38	-2,03 $\pm$ 6,62	-0,21 $\pm$ 1,33	3,21 $\pm$ 7,33	0,96 $\pm$ 2,87	-0,69 $\pm$ 5,39
2-Com tela sem sacarose	0,29 $\pm$ 1,98	2,32 $\pm$ 1,00	- 0,03 $\pm$ 1,87	1,38 $\pm$ 9,33	-1,08 $\pm$ 2,71	-4,35 $\pm$ 10,31
3-Com tela sacarose 4x/dia	-0,09 $\pm$ 1,08	0,84 $\pm$ 11,20	1,34 $\pm$ 5,50	1,59 $\pm$ 13,27	-0,69 $\pm$ 3,10	-0,19 $\pm$ 6,06
4-Com tela sacarose 8x/dia	0,35 $\pm$ 1,25	4,04 $\pm$ 9,19	-0,31 $\pm$ 1,94	-2,40 $\pm$ 8,27	-0,15 $\pm$ 0,92	-3,00 $\pm$ 8,22

*Não houve diferença significativa entre os tratamentos para cada condição, nem entre as condições para cada tratamento (ANOVA/Bonferroni, $p>0,05$, $n=17$). Valores positivos significam aumento da camada superficial, enquanto os valores negativos, diminuição da camada superficial (em espessura e conteúdo mineral).

Tanto para o cálculo da variação da perda mineral pela profundidade (Tabela 9) quanto para a variação da espessura e conteúdo mineral da camada superficial (Tabela 10), não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento para todas as condições de desmineralização, pois as variações foram pequenas nestes parâmetros. Apenas as variações de ΔZ e ΔP foram sensíveis o suficiente para a detecção de diferença significativa entre os tratamentos *in situ*.

Os quadros 1 a 4 mostram imagens das regiões DES (antes) e DES-RE (pós *in situ*) de uma amostra representativa de cada grupo de tratamento (verniz de TiF_4 , NaF e placebo) para cada condição de des-remineralização *in situ* (1, 2, 3 e 4). As imagens foram obtidas durante a análise por microrradiografia transversal e foram selecionadas com base no valor da média de $\Delta\Delta Z$ para cada grupo e condição de des-remineralização.

Quadro 1. Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento, submetida à condição 1 *in situ*

Quadro 2. Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento submetida à condição 2 *in situ*

Quadro 3. Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento submetida à condição 3 *in situ*

Condição 4- com tela e sacarose 8x/dia**Verniz de TiF_4** **Verniz de NaF****Verniz Placebo**

DES

DES

DES

DES-RE

DES-RE

DES-RE

Quadro 4. Imagens das regiões DES e DES-RE de uma amostra representativa para cada grupo de tratamento submetida à condição 4 *in situ*

Com base nas análises acima descritas, o verniz de TiF_4 tem potencial de induzir remineralização, independente da condição do paciente, isto é, este produto é eficaz tanto para pacientes de baixa como de alta atividade à cárie dentária, o que não acontece no caso do verniz de NaF.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Atualmente, já está comprovado cientificamente que a aplicação tópica de fluoreto (em especial do NaF, sal fluoretado mais utilizado) reduz a desmineralização e aumenta a remineralização de lesões iniciais de cárie, reduzindo prevalência e severidade da cárie dentária (HELLWIG; LENNON, 2004; IJAZ et al., 2010; BUZALAF et al., 2011; TEN CATE, 2013). No entanto, para algumas populações de alto risco à doença, o fluoreto tem falhado em reduzir a progressão da lesão cariosa.

Neste sentido, tem-se estudado alternativas para melhorar o efeito do fluoreto e, dentre elas, está o uso de fluoretos contendo metais polivalentes como o TiF_4 . Trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostraram que um verniz de TiF_4 a 4% (2,45% F) é mais eficaz que o correspondente NaF sobre a remineralização, porém ainda não está claro se o efeito sobre o tratamento das lesões cariosas poderia ser dependente da atividade de cárie do paciente, o que justifica a tese apresentada.

Adicionalmente, especula-se que o melhor efeito do TiF_4 se deva à formação de uma camada ácido-resistente rica em Ti e F (GU; LI; SÖREMARK, 1996; LEADLEY et al., 1997; RIBEIRO; GIBSON; BARBOSA, 2006; WIEGAND; MAGALHÃES; ATTIN, 2010; MAGALHÃES et al., 2011; WAHENGHAM; TIKKU; LEE, 2011). No entanto, ainda não há resultados conclusivos em relação ao real mecanismo de ação química deste agente sobre a estrutura dentária. Este é o primeiro trabalho que teve um foco mais aprofundado sobre o mecanismo de ação do TiF_4 .

No presente estudo, nós testamos vernizes de TiF_4 e NaF, com concentrações equivalentes de fluoreto, os quais foram fabricados pela empresa FGM- Dentscare (Joinville – SC, Brasil) utilizando a mesma base resinosa do verniz comercial Duofluorid®. Já foi demonstrado que a base do verniz pode ter influência sobre a liberação de fluoreto (LIPPERT et al., 2013). O pH dos vernizes à base de TiF_4 não foi ajustado, pois isto já foi realizado previamente e não se obteve sucesso na manutenção do pH em 5,0. Estudos prévios mostraram que o efeito do TiF_4 sobre a prevenção da desmineralização do esmalte é dependente do baixo valor de pH (WIEGAND et al., 2009; HOVE et al., 2011), o que dá mais suporte ao uso do verniz de TiF_4 com pH original acidulado. O verniz de NaF foi utilizado como controle positivo durante todo o estudo, com o valor de pH 5,0 ajustado conforme verniz

comercial mais utilizado em estudos clínicos (Duraphat[®]), com base em inúmeros estudos clínicos que suportam o uso do verniz de NaF como controle positivo (STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001; MARINHO et al., 2002; PETERSSON et al., 2004; MOBERG SKÖLD et al., 2005; CARVALHO et al., 2010; MARINHO et al., 2013).

Na 1ª etapa do estudo, utilizamos água deionizada como um meio isento de qualquer interação com o fluoreto, e uma fórmula de saliva artificial, cujos componentes poderiam interagir com o fluoreto e alterar a quantidade liberada no meio. A fórmula da saliva artificial de Klimek, Hellwig e Ahrens (1982) foi escolhida, pois esta é a saliva utilizada nos nossos estudos *in vitro* durante o tratamento com os vernizes sobre as amostras, o que poderia eventualmente interferir na reação com o esmalte.

Os dados referentes à etapa 1 já foram publicados em periódico internacional (COMAR et al., 2014). Os períodos de exposição de até 12h foram escolhidos baseados em trabalhos prévios publicados na literatura, como o de Twetman, Sköld-Larsson e Modéer (1999), no qual observaram *in vivo*, significativos níveis de fluoreto na saliva após 1 hora da aplicação de dois vernizes fluoretados (6% e 2,26% F⁻), sendo que os níveis de F⁻ foram encontrados até 6 horas após o tratamento. No entanto, após 24 horas o nível de fluoreto salivar retorna ao nível inicial (EAKLE et al., 2004).

Os resultados desta etapa do projeto mostraram uma relação dose-resposta entre a liberação de F⁻ e a concentração dos vernizes, sendo esta relação mais consistente para a água devido à ausência de interação iônica, já a saliva contém cálcio que poderia interagir com o fluoreto. Ainda a saliva tem um valor de pH próximo a 7,0 enquanto a água fica em torno de 5,5.

Foi observado que o verniz à base de TiF₄ tem a capacidade de liberar mais fluoreto que o verniz de NaF, especialmente o verniz com TiF₄ a 4%, o qual tem sido testado pelo nosso grupo de pesquisa, com resultados promissores em relação à prevenção da erosão dentária (MAGALHÃES et al., 2011), bem como sobre a redução da desmineralização cariogênica e o aumento da remineralização de lesões cariosas *in vitro* e *in situ* (MAGALHÃES et al., 2008a; COMAR et al., 2012). O fato do verniz à base de TiF₄ liberar mais fluoreto que o de NaF, considerando que ambos foram ajustados para conterem a mesma concentração de fluoreto e a mesma base de resina, mostra um maior potencial deste verniz

experimental em reagir com o esmalte e possibilitar maior precipitação de F^- sobre a estrutura dentária. Esta maior liberação de fluoreto pode estar relacionada ao baixo pH do agente, possibilitando a dissociação do F^- da base de resina em meio aquoso.

O pico de liberação ocorreu nas três primeiras horas, sendo que o padrão de liberação do TiF_4 foi significativamente maior que o do NaF para as primeiras 6 horas. Resultados similares foram encontrados em um estudo prévio mais recente (RITWIK et al., 2012), em que os autores avaliaram durante 48h a liberação de F^- de quatro diferentes vernizes contendo NaF a 5%, e puderam observar que três vernizes atingiram um platô de liberação nas 4 primeiras horas, e o quarto verniz (contendo fosfato de cálcio amorfo) ainda mostrou alta taxa de liberação por até 8h.

Sabe-se que a manutenção de baixos níveis de fluoreto na saliva ao longo do tempo pode ajudar no controle da progressão de lesões cariosas (TEN CATE, 1990; TEN CATE, 1999); além disso, o aumento de níveis de F^- na saliva após a aplicação de agentes tópicos pode ser um indicativo de fluoreto disponível para interação com a estrutura dentária (OLIVEBY; EKSTRAND; LAGERLÖF, 1987). Baixos níveis de fluoreto na saliva, em torno de 0,04 ppm, foram correlacionados com um significativo efeito protetor à cárie dentária (FEATHERSTONE, 1999). Portanto, os resultados encontrados no presente estudo mostraram que todos os vernizes experimentais testados podem ter um bom efeito no controle da cárie dentária (liberação $>0,40$ ppm F), especialmente os vernizes de TiF_4 mais concentrados (liberação $> 2,42$ ppm F).

Devemos também considerar que os níveis de fluoreto na saliva têm uma relação direta com aqueles presentes no fluído do biofilme e esmalte dentário (TENUITA; CURY, 2010; VALE et al., 2011; VOGEL, 2011). Além disso, é importante salientar que existem diferenças entre estudos laboratoriais e clínicos, ou seja, funções como salivação, deglutição, mastigação e escovação, não são consideradas *in vitro*. Portanto, o padrão de liberação de F^- e seu retorno a níveis iniciais podem ser mais rápidos na condição clínica (CASTILLO et al., 2001; CASTILLO; MILGROM, 2004).

A segunda etapa deste projeto consistiu na avaliação química dos tipos de compostos formados pela interação das soluções de TiF_4 e NaF (com as mesmas concentrações de fluoreto dos vernizes) com a hidroxiapatita (HAP). O processo de produção de hidroxiapatita foi considerado satisfatório e válido, pois foi possível identificar os grupos funcionais (PO_4^{-3}) e (OH^-), que são os grupamentos

característicos da estrutura de HAP, de acordo com resultados prévios publicados da literatura (LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2006; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007; TROMMER; SANTOS; BERGMANN, 2007).

Nossos resultados mostraram que o TiF_4 pode causar uma alteração na proporção de bandas de hidroxila e fosfato. Houve um aumento na quantidade de água fisissorvida, sugerindo a formação de um composto hidratado, o qual foi comprovado pela difração de raios-X (fosfato de titânio hidratado), assim como houve uma redução na deformação do grupo fosfato e ausência de banda carbonato, o que poderia indicar aumento da estabilidade da HAP e/ou um novo composto formado (fosfato de titânio hidratado e óxido de titânio).

Com base na etapa 2, podemos concluir que o TiF_4 não causou substituição de elementos na estrutura da HAP, mas sim induziu à formação de novos compostos, por dissolução da HAP e precipitação superficial de compostos contendo Ti e F, os quais provavelmente fazem parte da camada ácido-resistente vista no MEV, tornando o esmalte menos solúvel na presença de ácidos relacionadas à cárie e a erosão dentária.

Para o NaF, apesar de terem sido constatadas algumas alterações na análise por infra-vermelho, nenhuma delas justificou alguma alteração da hidroxiapatita ou formação de um novo composto, o que foi comprovado pela difração de raios-X.

O mecanismo de ação do NaF (em alta concentração para aplicação profissional) já está comprovado na literatura (ATTIN et al., 2005; ATTIN et al., 2007; SCHEMEHORN et al., 2011; LIPPERT et al., 2013; LIPPERT et al., 2014) e foi confirmado no presente estudo com a formação de fluoreto de cálcio, detectado na difração de raios-X e biópsia básica. O CaF_2 é formado devido a uma leve dissolução da HAP que libera cálcio para reagir com o fluoreto formando este reservatório. Este reservatório de F^- , fracamente ligado, é liberado quando o pH do biofilme diminui, fornecendo fluoreto para o fluido do biofilme e esmalte, o qual interage com a HAP, protegendo-a da dissolução (OGAARD; SEPPÄ; RÖLLA, 1994; ROŠIN-GRGET et al., 2013; MARINHO et al., 2013).

Para a realização das etapas 3 e 4, foram produzidas lesões de cárie artificial *in vitro* em metade das amostras, utilizando a solução desmineralizante de Buskes, Christoffersen e Arends (1985), sendo esta capaz de induzir lesões profundas e de subsuperfície em esmalte (RIEBEN et al., 2008; MAGALHÃES et al.,

2009). Para testar o potencial remineralizante de produtos com alta concentração de fluoreto (para uso profissional), é importante que as lesões cáries artificiais sejam profundas e altamente desmineralizadas (SALOMÃO, 2013; MAGALHÃES et al., 2014), na tentativa de simular mais apropriadamente a indicação na prática clínica. Em geral, os protocolos laboratoriais produzem lesões rasas em esmalte, sendo este protocolo o mais eficaz na formação de lesões em esmalte bovino (MAGALHÃES et al., 2009) e o mais difícil de remineralizar (MAGALHÃES et al., 2014). Para que lesões similares em esmalte humano pudessem ser produzidas, dobramos o tempo de desmineralização, com base na realização de vários testes pilotos.

Em relação à aplicação dos vernizes, a escolha do tempo máximo de 12h de tratamento foi mantida, porém seria interessante ter os resultados de 6h de tratamento. Com base nos resultados etapa 1, supõe-se que as diferenças entre o TiF_4 e NaF seriam ainda maiores para tempos menores de tratamento nas etapas 3 e 4.

Na terceira etapa do projeto, o tratamento com os vernizes de TiF_4 induziu à formação de uma camada de revestimento superficial, independente se o esmalte era H ou DES, com aspecto de “craquelamento” ou de microfissuras em concordância com imagens oriundas de estudos prévios (MAGALHÃES et al., 2008b; MAGALHÃES et al., 2011), a qual é responsável pela proteção física do esmalte contra o ataque ácido. Já para as amostras tratadas com os vernizes de NaF, foi observado um raro precipitado globular que pode ser similar aos glóbulos *like-CaF₂*, porém apenas para o verniz mais concentrado. Assume-se, com base na etapa 2, que essa camada tipo *glaze (fruta cor a olho nu)* formada na superfície do esmalte após o tratamento com TiF_4 é formada por óxido de titânio e fosfato de titânio hidratado. Com o detector de microanálise EDAX, foi possível constatar que esta camada apresentava Ti e mais fluoreto (resultado validado pela biopsia básica) para amostras tratadas com TiF_4 em relação ao NaF.

Foi observada ainda uma relação Ca/P relativamente menor para as amostras tratadas com verniz de TiF_4 em comparação às dos grupos NaF e controle, mostrando que o TiF_4 provavelmente cause precipitação de novos compostos na superfície, o que vai de encontro aos resultados da difração de raios-X. Quando comparamos o resultado da microanálise do esmalte humano com o bovino, algumas diferenças foram notadas. Enquanto a % de F e Ti para o esmalte humano hígido tratado com TiF_4 é menor que o bovino, a % F para o esmalte humano tratado

com NaF é maior. Para o esmalte desmineralizado, os resultados foram similares na comparação entre esmalte bovino e humano. Podemos inferir que o efeito do TiF_4 é mais pronunciado sobre o esmalte bovino que humano, o que será discutido mais adiante.

Em relação ao fluoreto fracamente ligado, as amostras de esmalte bovino tratadas com os vernizes de TiF_4 mais concentrados foram as que apresentaram maior deposição de fluoreto, especialmente as DES devido ao aumento da porosidade superficial, em concordância com Seppa (1988) que trabalhou com duas concentrações de verniz fluoretado. Para o esmalte humano, o verniz de TiF_4 foi superior ao NaF somente para as amostras DES, resultados que estão de acordo com os obtidos na microanálise. A maior precipitação de fluoreto pelo TiF_4 se deve ao menor pH do agente fluoretado em concordância com trabalhos prévios em que mostraram o efeito do pH do agente fluoretado em sua reatividade com o esmalte dentário (DIJKMAN; TAK; ARENDS, 1982; HAYACIBARA et al., 2004). Os valores obtidos na biopsia básica estão muito próximos aos resultados de Hayacibara et al. (2004).

Em relação à condição do esmalte, amostras desmineralizadas apresentaram mais fluoreto álcali-solúvel que as amostras híginas, principalmente aquelas tratadas com os vernizes de TiF_4 mais concentrados. Este resultado era esperado, uma vez que vários estudos já revelaram um aumento acentuado, tanto de F^- álcali solúvel quanto de F^- fortemente ligado, em lesões de cárie iniciais após aplicação tópica de vernizes fluoretados (DIJKMAN; TAK; ARENDS, 1982; HELLWIG et al., 1985; ATTIN et al., 1995). Pode-se assumir que a estrutura porosa do esmalte desmineralizado permite uma melhor interação e penetração do fluoreto aplicado, com um maior número de possíveis locais de retenção (BRUUN; GIVSKOV, 1993). No entanto, esta diferença não foi significativa para o NaF. Este fato pode ser devido à baixa quantidade de fluoreto liberado por este agente, que estaria disponível para reagir com o esmalte, o que culminou com baixos valores de fluoreto álcali-solúvel.

Apesar da análise do fluoreto álcali-solúvel ter mostrado maior deposição de fluoreto nas amostras DES em relação às H para o TiF_4 , esta tendência não foi confirmada pela microanálise, uma vez que esta última técnica considera o fluoreto total presente nos 5-10 μm de profundidade do esmalte (CaF_2 , FAP).

Quando comparamos esmalte humano e bovino, as amostras de esmalte humano (H e DES) tratadas com os vernizes de TiF_4 apresentaram menor deposição de fluoreto álcali-solúvel que as amostras de esmalte bovino; para aquelas tratadas com NaF, não houve diferença entre esmalte bovino e humano. Como já foi abordado, o verniz de TiF_4 parece ser mais reativo sobre o esmalte bovino, o que não ficou claro para o NaF. Os nossos resultados de microanálise e biópsia básica estão de acordo com o estudo de Hove, Young e Tveit (2007); estes autores observaram que o esmalte humano possui um comportamento diferente comparado ao esmalte bovino quando tratado com solução de TiF_4 (F a 0,5 M) para prevenção da erosão dentária. Neste estudo, os autores mostraram que o tratamento com TiF_4 pode formar uma camada mais resistente a ácidos na superfície do esmalte bovino que na superfície do esmalte humano. Estas diferenças podem estar relacionadas ao grau de mineralização dos diferentes tipos de esmalte. O esmalte humano por ser mais mineralizado que o esmalte bovino, pode necessitar de um período maior de tratamento para que haja uma adequada deposição de fluoreto e formação da camada protetora *glaze*, da mesma forma como foi necessário um maior período de tempo para atingir uma desmineralização similar ao bovino *in vitro*. Seria interessante no futuro repetir estas análises com amostras de esmalte decíduo. Como o dente decíduo é menos mineralizado que o permanente, pode-se especular que sejam observados resultados parecidos com os encontrados para o esmalte bovino. Desta forma, é provável que as diferenças entre TiF_4 e NaF na clínica sejam menores do que às encontradas no Laboratório.

Estes dados preliminares de mecanismo podem explicar os bons resultados encontrados para o verniz de TiF_4 nos processos de des-remineralização do esmalte em comparação ao verniz convencional contendo NaF, em estudos já referidos acima.

Na última etapa do projeto, nós repetimos o estudo *in situ* realizado anteriormente referente à dissertação de mestrado da candidata (Comar, 2011; COMAR et al., 2012), porém com a inclusão de diferentes condições de remineralização, simulando desde o paciente sem atividade de cárie até o paciente com alta atividade de cárie. Neste estudo anterior, foi observado um efeito positivo do verniz de TiF_4 , similar ao NaF, na prevenção da desmineralização do esmalte bovino sob desafio cariogênico severo *in situ* em concordância com os dados *in vitro* (Magalhães et al., 2008a). Em relação à remineralização *in situ*, o verniz e a solução

de TiF_4 foram capazes de aumentar significativamente a dureza superficial do esmalte pré-desmineralizado. Contudo, não ocorreu a remineralização da subsuperfície devido à ausência de desafios cariogênicos *in situ* que pudessem proporcionar condições para que os mecanismos de ação dos agentes pudessem ser de fato testados. Portanto, não conseguimos averiguar apropriadamente o efeito do TiF_4 na remineralização das lesões cariosas.

No presente estudo apenas amostras previamente desmineralizadas *in vitro* foram incluídas, para que pudéssemos responder a questão anterior. Adicionalmente, na atual prática clínica, os vernizes fluoretados têm sido mais aplicados em esmalte com lesão de cárie já estabelecida que em esmalte hígido. Chi (2014) afirma que o tratamento com vernizes fluoretados é clinicamente indicado para pacientes de alta atividade de cárie, e que a aplicação deste produto em pacientes de baixo risco é desnecessária e dispendiosa. Outros autores também indicam aplicações de vernizes fluoretados como estratégia efetiva e benéfica no tratamento de lesões de cárie em crianças com alta atividade de cárie (PETERSSON; TWETMAN; PAKHOMOV, 1997; ARRUDA et al., 2012; WEYANT et al., 2013; MARINHO et al., 2013).

Além das diferentes condições de des-remineralização, também foi adicionada ao protocolo desta pesquisa, a utilização de dentifrício fluoretado (1100 ppm F), com o objetivo de simular melhor a situação clínica em comparação ao estudo anterior.

Os vernizes foram aplicados e permaneceram em contato com as amostras durante 6 h em saliva artificial, uma vez que neste período obtivemos os melhores resultados para o TiF_4 na etapa 1, e também para possibilitar comparação com o nosso estudo *in situ* anterior. A aplicação foi realizada *in vitro*, pois seria difícil aplicar e remover o produto *in situ* pela presença da tela plástica. Na prática clínica, os vernizes são aplicados sobre o esmalte após profilaxia e não são removidos. Os pacientes são instruídos para postergarem ao máximo a alimentação e escovação dentária por aproximadamente 4-6h.

Utilizamos a microradiografia transversal (TMR) para avaliar o efeito dos tratamentos sobre o esmalte, uma vez que este método é considerado o padrão ouro para quantificação do conteúdo mineral. Apenas as variações da perda mineral integrada (ΔZ) e da profundidade da lesão (P) foram consideradas sensíveis o suficiente para a detecção de diferença significativa entre os tratamentos. O

protocolo *in situ* proporcionou a remineralização apenas para as amostras sobre as quais não houve acúmulo de biofilme dentário; já na presença de biofilme, somente aquelas tratadas com os vernizes fluoretados remineralizaram, mostrando a importância do uso do fluoreto no tratamento de lesões cariosas. As amostras que não foram tratadas com os vernizes fluoretados, apenas expostas à saliva e ao fluoreto do dentifrício, apresentaram uma ligeira desmineralização, sendo que este efeito foi mais acentuado nas condições com exposição à sacarose.

Foi observado que o verniz de TiF_4 foi capaz de provocar significativa remineralização em comparação ao placebo, em todas as condições testadas, diferente do verniz de NaF que foi superior ao verniz placebo somente nas condições em que não houve acúmulo de biofilme ou com acúmulo de biofilme sob baixo desafio cariogênico. Portanto, o efeito do verniz NaF se mostrou dependente da condição clínica. Podemos inferir que na ausência de biofilme, alguma incorporação direta de fluoreto ao esmalte, durante a aplicação do verniz, pudesse ter aumentado o conteúdo mineral mais superficial da lesão. Já na presença de biofilme este fluoreto pode ter se deslocado para o biofilme e somente liberado para o esmalte durante o desafio cariogênico, na presença de ácido, porém o efeito é limitante e somente viável quando o desafio cariogênico é mais brando. Na presença de alto desafio cariogênico, o fluoreto liberado provavelmente não foi suficiente para remineralizar o esmalte. Nestas duas condições, o verniz de TiF_4 foi superior ao NaF, justamente porque o seu mecanismo de ação não se baseia somente na deposição de CaF_2 , mas também na formação de uma camada rica em titânio, que parece proteger o esmalte frente a desafios cariogênicos, o que ficou bastante evidente na presença de alto desafio cariogênico do presente estudo.

Quando comparamos os dados da TMR, o potencial superior do verniz de TiF_4 no aumento do ganho mineral integrado ($\Delta\Delta Z$) se deve a um efeito mais superficial do agente, pois se o mineral tivesse sido depositado mais ao fundo da lesão, poderia se esperar diferença significativa na redução da profundidade da lesão para o verniz de TiF_4 em comparação ao verniz NaF, o que não ocorreu. Estes resultados vão de encontro a evidências presentes na Literatura que o fluoreto induz a uma hipermineralização das camadas mais superficiais do esmalte com efeito reduzido em regiões mais profundas, após aplicações de produtos com alta concentração de F^- (LAGERWEIJ et al., 2006; ALTENBURGER et al., 2008). Além disso, o nosso trabalho *in situ* anterior mostrou que o verniz de TiF_4 é capaz de

aumentar a dureza superficial do esmalte em comparação ao NaF, reforçando a hipótese de que o efeito seja mais superficial.

Os resultados deste protocolo *in situ* mostraram-se diferentes dos apresentados no estudo anterior por Comar et al. (2012), no qual os vernizes fluoretados não foram capazes de promover a remineralização subsuperficial da lesão de cárie artificial em comparação ao placebo, pela análise do ΔZ , quando as amostras ficaram expostas *in situ* sem acúmulo de biofilme por 14 dias. Esta diferença pode ter acontecido devido ao baixo número amostral do trabalho anterior, que não permitiu que uma diferença estatística pudesse ser vista. Outra hipótese seria a adição do dentifrício fluoretado no protocolo do presente estudo, promovendo um efeito adicional sobre as lesões cariosas como coadjuvante ao efeito do verniz. Carvalho e colaboradores (2010) mostraram em uma revisão sistemática que a aplicação de vernizes fluoretados confere proteção adicional contra a cárie em populações de alta atividade de cárie que consomem água fluoretada e fazem uso de dentifrício fluoretado.

Nossos trabalhos não podem ser diretamente comparados a outros estudos na literatura, uma vez que estes utilizam soluções ao invés de verniz. Um estudo realizado por Exterkate e Ten Cate (2007) mostrou efeitos positivos *in vitro* de soluções de TiF_4 em comparação a soluções de NaF, na prevenção da desmineralização do esmalte previamente desmineralizado submetido à ciclagens de pH. Já um estudo mais recente não mostrou diferença entre um solução de TiF_4 a 4% e um gel de NaF a 2% (com concentrações de fluoreto e veículos diferentes) pela análise de microdureza de amostras previamente desmineralizadas submetidas à apenas 30 minutos de remineralização *in situ*, o que é considerado baixo tempo de exposição (ALCÂNTARA et al., 2014).

Quando comparamos as quatro condições de des-remineralização para cada tipo de tratamento, foi observado que os resultados não apresentaram uma relação direta e proporcional com a severidade dos desafios. Somente o verniz placebo demonstrou diferença entre biofilme com sacarose (4 e 8x) versus ausência ou presença de biofilme sem sacarose. No caso dos tratamentos, a presença de fluoreto mascarou diferenças entre as condições, além da limitação do próprio método em detectar as diferenças. Devemos levar em consideração que as análises por TMR em geral apresentam um alto-desvio padrão, o que pode ser considerado uma limitação do uso deste método.

De modo geral, o verniz de TiF_4 parece ser eficaz no tratamento de lesões de mancha branca tanto em pacientes de baixa como de alta atividade de cárie dentária, o que não aconteceu no caso do verniz de NaF. No presente estudo, não foi observado nenhum efeito colateral decorrente da aplicação dos vernizes fluoretados, diferente do que foi observado no estudo anterior (COMAR et al., 2012), no qual as amostras desmineralizadas tratadas com o verniz de TiF_4 apresentaram-se mais amareladas ao final do experimento *in situ*, provavelmente devido ao lote utilizado. Efeito parecido foi observado por Pedro Rde e colaboradores (2011), em um relato de caso clínico, no qual os autores avaliaram o tratamento de lesões de mancha branca com uma solução de TiF_4 em comparação ao tratamento apenas com dentifrício fluoretado. Uma pigmentação extrínseca foi observada nas regiões tratadas com TiF_4 , sendo estas parcialmente removidas por profilaxia profissional, porém foi notada uma recidiva na consulta posterior. Provavelmente, no nosso estudo anterior, isto ocorreu devido ao fato de que a base resinosa do verniz de TiF_4 era de coloração amarelada, diferente dos vernizes utilizados neste trabalho em que as bases eram incolores.

Outra questão importante ainda a ser investigada é a citotoxicidade do TiF_4 . O nosso grupo de pesquisa investigou o efeito do TiF_4 (pH 1,2 e 4,5) e NaF (pH 4,5 e 8,6), em concentrações de F^- variando entre 0,61 a 2,45%, na viabilidade e morfologia de fibroblastos por períodos de 3 a 48h de tratamento. Houve redução significativa da viabilidade celular (teste de MTT) para os grupos tratados com os fluoretos em relação ao controle. Células tratadas com fluoretos apresentaram-se em número reduzido e com mudanças morfológicas. Os pesquisadores concluíram que os dois agentes fluoretados apresentam potencial citotóxico similar quando o compararam TiF_4 (pH 1-2) com NaF (pH 5) (AL-AHJ et al., 2013). Apesar de estes resultados apontarem para um potencial citotóxico aparentemente similar entre NaF e TiF_4 , mais estudos estão sendo realizados para a confirmação desses efeitos e para o entendimento do mecanismo de ação do fluoreto nas células. Estes dados serão importantes para o planejamento de ensaios clínicos.

Em resumo, observamos no presente estudo que o verniz de TiF_4 apresentou um melhor efeito na remineralização de lesões iniciais de cárie, independente da severidade do desafio cariogênico, em conjunto à utilização de dentifrício fluoretado. Já o efeito remineralizante do verniz de NaF foi dependente da condição clínica. O melhor efeito do TiF_4 está relacionado à formação de uma

camada superficial protetora ácido-resistente na superfície do esmalte, composta por fluoreto de cálcio, óxido de titânio e fosfato de titânio hidratado, além de uma maior deposição de F^- fracamente ligado ao esmalte.

Os resultados deste estudo devem ser futuramente confirmados em ensaios clínicos controlados e randomizados, com a inclusão de pacientes de alta atividade de cárie e acompanhamento por período de 2 a 3 anos, sendo que as aplicações dos vernizes devem ser realizadas em conjunto à instrução de higiene oral e escovação com dentífrico fluoretado.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados encontrados no presente estudo, pôde-se concluir:

- (1) Os tratamentos com os vernizes de TiF_4 foram mais eficazes na liberação de fluoreto tanto em água deionizada como em saliva artificial *in vitro* (hipótese nula rejeitada);
 - (2) O TiF_4 causou alteração na estrutura da HAP por induzir à formação de novos compostos como CaF_2 , TiO_2 e $\text{Ti}(\text{HPO}_4)_2$, por dissolução e precipitação *in vitro* (hipótese nula rejeitada);
 - (3) O tratamento com vernizes de TiF_4 promoveu, tanto no esmalte bovino como humano, hígido ou desmineralizado, a formação de camada de revestimento sobre a superfície do esmalte com microfissuras em sua extensão, sendo esta rica em Ti e F (hipótese nula rejeitada), o que provavelmente fornece uma proteção adicional aos ataques ácidos *in vitro*;
 - (4) Os tratamentos com os vernizes de TiF_4 foram mais eficazes na deposição de fluoreto álcali-solúvel *in vitro* tanto sobre o esmalte bovino, como humano, hígido e desmineralizado, em comparação aos vernizes de NaF (hipótese nula rejeitada). A diferença entre os sais fluoretados foi mais evidente para o esmalte bovino;
 - (5) O verniz de TiF_4 a 4% possui uma melhor capacidade de induzir a remineralização de lesões iniciais de cárie, independente da condição da atividade de cárie *in situ*, em comparação ao verniz de NaF (hipótese nula rejeitada).
-

Referências

REFERÊNCIAS

- Adriaens ML, Dermaut LR, Verbeeck RM. The use of 'Fluor Protector', a fluoride varnish, as a caries prevention method under orthodontic molar bands. *Eur J Orthod*. 1990 Aug;12(3):316-9.
- Agouropoulos A, Twetman S, Pandis N, Kavadia K, Papagiannoulis L. Caries-preventive effectiveness of fluoride varnish as adjunct to oral health promotion and supervised tooth brushing in preschool children: a double-blind randomized controlled trial. *J Dent*. 2014 Oct;42(10):1277-83.
- Al-Ahj LP, Amadeu F, Salomão P, Gasque K, Buzalaf MAR, Oliveira RC, Magalhães AC. TiF_4 and NaF present similar cytotoxic effect on NIH/3T3b fibroblast. In: IADR/AADR/CADR 91st General Session, 2013, Seattle, Washington. *J Dent Res* 92 (Spec Iss A): 2013.1105.
- Alcântara PC, Alexandria AK, Souza IP, Maia LC. In situ effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on artificially decayed human enamel. *Braz Dent J*. 2014 Jan-Feb;25(1):28-32.
- Almeida MQ, Costa OX, Ferreira JM, Menezes VA, Leal RB, Sampaio FC. Therapeutic potential of Brazilian fluoride varnishes: an in vivo study. *Braz Dent J*. 2011;22(3):193-7.
- Altenburger MJ, Schirrmester JF, Wrbas KT, Klasser M, Hellwig E. Fluoride uptake and remineralisation of enamel lesions after weekly application of differently concentrated fluoride gels. *Caries Res*. 2008;42(4):312-8.
- American Dental Association Council on Scientific Affairs. Professionally applied topical fluoride: evidence-based clinical recommendations. *J Am Dent Assoc*. 2006 Aug;137(8):1151-9.
- Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res*. 1963 Feb;8:12-23.
- Arends J, Christoffersen J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res*. 1990 Feb;69 Spec No:601-5; discussion 634-6.
- Arends J, Lodding A, Petersson LG. Fluoride uptake in enamel. In vitro comparison of topical agents. *Caries Res*. 1980;14(6):403-13.
- Arends J, Schuthof J. Fluoride content in human enamel after fluoride application and washing - an in vitro study. *Caries Res*. 1975;9(5):363-72.
- Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res*. 1992 Apr;71 Spec No:924-8.
-

Arruda AO, Senthamarai Kannan R, Inglehart MR, Rezende CT, Sohn W. Effect of 5% fluoride varnish application on caries among school children in rural Brazil: a randomized controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2012 Jun;40(3):267-76.

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

Attin T, Hartmann O, Hilgers RD, Hellwig E. Fluoride retention of incipient enamel lesions after treatment with a calcium fluoride varnish in vivo. *Arch Oral Biol.* 1995;40(3):169-74.

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

Austin RS, Stenhagen KR, Hove LH, Tveit AB, Moazzez RV, Bartlett DW. The effect of single-application fluoride treatment on simulated gastric erosion and erosion-abrasion of enamel in vitro. *Int J Prosthodont.* 2014 Sep-Oct;27(5):425-6.

Autio-Gold JT, Courts F. Assessing the effect of fluoride varnish on early enamel carious lesions in the primary dentition. *J Am Dent Assoc.* 2001 Sep;132(9):1247-53.

Bawden JW. Fluoride varnish: a useful new tool for public health dentistry. *J Public Health Dent.* 1998 Fall;58(4):266-9.

Beltrn-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA. Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc.* 2000 May; 131(5):589-96.

Bibby BG. A test of the effect of fluoride-containing dentifrices on dental caries. *J Dent Res.* 1945 Dec;24:297-303.

Bichu YM, Kamat N, Chandra PK, Kapoor A, Razmus T, Aravind NK. Prevention of enamel demineralization during orthodontic treatment: an in vitro comparative study. *Orthodontics (Chic.).* 2013;14(1):e22-9.

Bnecker M, Ardenghi TM, Oliveira LB, Sheiham A, Marcenes W. Trends in dental caries in 1- to 4-year-old children in a Brazilian city between 1997 and 2008. *Int J Paediatr Dent.* 2010 Mar;20(2):125-31.

Bruun C, Givskov H. Calcium fluoride formation in enamel from semi- or low-concentrated F agents in vitro. *Caries Res.* 1993;27(2):96-9.

Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res.* 1985;19(6):490-6.

Bykyilmaz T, Ogaard B, Rlla 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 MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:97-114.

Buzalaf MAR, Pessan JP, Ramires I. Métodos de uso tópico dos fluoretos no controle da cárie dentária. In: Marília Afonso Rabelo Buzalaf. (Org.): Fluoretos e saúde bucal. 1 ed. São Paulo: Santos, 2008, v.1, 111-162.

Cardoso L, Rösing C, Kramer P, da Costa CC, da Costa Filho LC. Polarização da cárie em município sem água fluoretada. *Cad Saúde Pública* 2003 Jan-Fev;19(1):237-43.

Carey CM. Focus on fluorides: update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. *J Evid Based Dent Pract.* 2014 Jun;14 Suppl:95-102.

Carvalho DM, Salazar M, Oliveira BH, Coutinho ES. Fluoride varnishes and decrease in caries incidence in preschool children: a systematic review. *Rev Bras Epidemiol.* 2010 Mar;13(1):139-49.

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;20(5-6):333-9.

Castillo JL, Milgrom P, Kharasch E, Izutsu K, Fey M. Evaluation of fluoride release from commercially available fluoride varnishes. *J Am Dent Assoc.* 2001 Oct;132(10):1389-92; quiz 1459-60.

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

Chevitarese AB, Chevitarese O, Chevitarese LM, Dutra PB. Titanium penetration in human enamel after TiF₄ application. *J Clin Pediatr Dent.* 2004 Spring;28(3):253-6.

Chi DL. Topical fluoride varnish every 6 months is not more effective than placebo varnish at preventing dental caries in preschoolers in Brazil. *J Evid Based Dent Pract.* 2014 Sep;14(3):142-4.

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

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

Comar LP, Wiegand A, Moron BM, Rios D, Buzalaf MA, Buchalla W, Magalhães AC. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. *Eur J Oral Sci.* 2012 Aug;120(4):342-8.

Comar LP. Comparação do efeito de TiF₄ e NaF, nas formas de verniz e solução, sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dentário bovino *in situ*

[dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23 Suppl 1:23-30.

de Bruyn H, Arends J. Fluoride varnishes--a review. *J Biol Buccale.* 1987 Jun;15(2):71-82.

Demito CF, Vivaldi-Rodrigues G, Ramos AL, Bowman SJ. The efficacy of a fluoride varnish in reducing enamel demineralization adjacent to orthodontic brackets: an in vitro study. *Orthod Craniofac Res.* 2004 Nov;7(4):205-10.

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

Divaris K, Preisser JS, Slade GD. Surface-specific efficacy of fluoride varnish in caries prevention in the primary dentition: results of a community randomized clinical trial. *Caries Res.* 2013;47(1):78-87.

Du M, Cheng N, Tai B, Jiang H, Li J, Bian Z. Randomized controlled trial on fluoride varnish application for treatment of white spot lesion after fixed orthodontic treatment. *Clin Oral Investig.* 2012 Apr;16(2):463-8.

Eakle WS, Featherstone JD, Weintraub JA, Shain SG, Gansky SA. Salivary fluoride levels following application of fluoride varnish or fluoride rinse. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004 Dec;32(6):462-9.

Exterkate RA, Ten Cate JM. Effects of a new titanium fluoride derivative on enamel de- and remineralization. *Eur J Oral Sci.* 2007 Apr;115(2):143-7.

Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999 Feb;27(1):31-40.

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

Hayacibara MF, Paes Leme AF, Lima YB, Gonçalves NC, Queiroz CS, Gomes MJ, Kozlowski FC. Alkali-soluble fluoride deposition on enamel after professional application of topical fluoride in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2004 Mar;12(1):18-21.

Hellwig E, Klimek J, Schmidt HF, Egerer R. Fluoride uptake in plaque-covered enamel after treatment with the fluoride lacquer Duraphat. *J Dent Res.* 1985;64(8):1080-3.

Hellwig E, Lennon AM. Systemic versus topical fluoride. *Caries Res.* 2004;38(3):258-62.

Hove LH, Holme B, Stenhagen KR, Tveit AB. Protective effect of TiF(4) solutions with different concentrations and pH on development of erosion-like lesions. *Caries Res.* 2011;45(1):64-8.

Hove LH, Young A, Tveit AB. An in vitro study on the effect of TiF(4) treatment against erosion by hydrochloric acid on pellicle-covered enamel. *Caries Res.* 2007;41(1):80-4.

Ijaz S, Croucher RE, Marinho VC. Systematic reviews of topical fluorides for dental caries: a review of reporting practice. *Caries Res.* 2010;44(6):579-92.

Jacobsen P, Young D. The use of topical fluoride to prevent or reverse dental caries. *Spec Care Dentist.* 2003 Sep-Oct;23(5):177-9.

Jiang EM, Lo EC, Chu CH, Wong MC. Prevention of early childhood caries (ECC) through parental toothbrushing training and fluoride varnish application: a 24-month randomized controlled trial. *J Dent.* 2014 Dec;42(12):1543-50.

Khattak MF, Conry JP, Ko CC. Comparison of three topical fluorides using computer imaging. *J Clin Pediatr Dent.* 2005 Winter;30(2):139-44.

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

Kidd EA. How 'clean' must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):305-13.

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Res.* 1982;16(2):156-61.

Lacerda KA, Lameiras FS, Silva VV. Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. *REM: R. Esc. Minas.* 2006;59(2):217-23.

Lagerweij MD, Buchalla W, Kohnke S, Becker K, Lennon AM, Attin T. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. *Caries Res.* 2006;40(2):148-53.

Lawrence HP, Binguis D, Douglas J, McKeown L, Switzer B, Figueiredo R, Laporte A. A 2-year community-randomized controlled trial of fluoride varnish to prevent early childhood caries in Aboriginal children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008 Dec;36(6):503-16.

Leadley SR, Davies MC, Ribeiro CC, Barbosa MA, Paul AJ, Watts JF. Investigation of the dissolution of the bioceramic hydroxyapatite in the presence of titanium ions using ToF-SIMS and XPS. *Biomaterials.* 1997 Feb;18(4):311-6.

Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB. Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. *J Dent*. 2010 Feb;38(2):166-71.

Lippert F, Hara AT, Martinez-Mier EA, Zero DT. In vitro caries lesion rehardening and enamel fluoride uptake from fluoride varnishes as a function of application mode. *Am J Dent*. 2013 Apr;26(2):81-5.

Lippert F, Hara AT, Martinez-Mier EA, Zero DT. Laboratory investigations into the potential anticaries efficacy of fluoride varnishes. *Pediatr Dent*. 2014 Jul-Aug;36(4):291-5.

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

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

Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res*. 2009;43(6):474-83.

Magalhães AC, Salomão PMA, Comar, LP, Buzalaf MAR. In situ response of artificial carious enamel lesions to remineralization. In: IADR 92nd General Session, 2014, Cape Town, South Africa. *J Dent Res* 93 (Spec Iss B): 2014.1216.

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

Manly RS, Bibby BG. Substances capable of decreasing the acid solubility of tooth enamel. *J Dent Res*. 1949 Apr;28(2):160-71.

Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;(3):CD002279.

Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. One topical fluoride (toothpastes, or mouthrinses, or gels, or varnishes) versus another for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(1):CD002780.

Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jul 11;7:CD002279

Marthaler TM. Changes in dental caries 1953-2003. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):173-81.

Milgrom P, Taves DM, Kim AS, Watson GE, Horst JA. Pharmacokinetics of fluoride in toddlers after application of 5% sodium fluoride dental varnish. *Pediatrics*. 2014 Sep;134(3):e870-4.

Moberg Sköld U, Petersson LG, Lith A, Birkhed D. Effect of school-based fluoride varnish programmes on approximal caries in adolescents from different caries risk areas. *Caries Res*. 2005 Jul-Aug;39(4):273-9.

Mühler JC, van Huysen G. Solubility of enamel protected by sodium fluoride and other compounds. *J Dent Res*. 1947 Apr;26(2):119-27.

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

Nalbantgil D, Oztoprak MO, Cakan DG, Bozkurt K, Arun T. Prevention of demineralization around orthodontic brackets using two different fluoride varnishes. *Eur J Dent*. 2013 Jan;7(1):41-7.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JL. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica* 2006 Jun;19(6):385-93.

Nassur C, Alexandria AK, Pomarico L, de Sousa VP, Cabral LM, Maia LC. Characterization of a new TiF(4) and β -cyclodextrin inclusion complex and its in vitro evaluation on inhibiting enamel demineralization. *Arch Oral Biol*. 2013 Mar;58(3):239-47.

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

Oliveby A, Ekstrand J, Lagerlöf F. Effect of salivary flow rate on salivary fluoride clearance after use of a fluoride-containing chewing gum. *Caries Res*. 1987;21(5):393-401.

Oliveira BH, Salazar M, Carvalho DM, Falcão A, Campos K, Nadanovsky P. Biannual fluoride varnish applications and caries incidence in preschoolers: a 24-month follow-up randomized placebo-controlled clinical trial. *Caries Res*. 2014;48(3):228-36.

Olympio KP, Cardoso VE, Bijella MF, Pessan JP, Delbem AC, Buzalaf MA. Urinary fluoride output in children following the use of a dual-fluoride varnish formulation. *J Appl Oral Sci*. 2009 May-Jun;17(3):179-83.

Pattussi MP, Marcenes W, Croucher R, Sheiham A. Social deprivation, income inequality, social cohesion and dental caries in Brazilian school children. *Soc Sci Med* 2001 Oct;53(7):915-25.

Pedro Rde L, Pomarico L, Villardi M, Maia LC. Adverse effects associated with the clinical use of 4% TiF₄ on teeth enamel: case report. *Compend Contin Educ Dent*. 2011 May;32(4):e66-8.

Peres KG, Bastos JR, Latorre M do R. Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. *Rev Saude Publica* 2000 Ago;34(4):402-8.

Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MA. Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:115-32.

Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005 Sep;83(9):661-9.

Petersson HG, Brathall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sci.* 1996 Aug;104(4 (Pt 2)):436-43.

Petersson LG, Arthursson L, Ostberg C, Jönsson G, Gleerup A. Caries-inhibiting effects of different modes of Duraphat varnish reapplication: a 3-year radiographic study. *Caries Res.* 1991;25(1):70-3.

Petersson LG, Twetman S, Dahlgren H, Norlund A, Holm AK, Nordenram G, Lagerlöf F, Söder B, Källestål C, Mejäre I, Axelsson S, Lingström P. Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials. *Acta Odontol Scand.* 2004 Jun;62(3):170-6.

Petersson LG, Twetman S, Pakhomov GN. Fluoride varnish for community-based caries prevention in children. *World Health Organization:Geneva.* 1997;1-7.

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

Petersson LG. Fluorine gradients in outermost surface enamel after various forms of topical application of fluorides in vivo. *Odontol Revy.* 1976;27(1):25-50.

Qu H, Wei M. Synthesis and characterization of fluorine-containing hydroxyapatite by a pH-cycling method. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16(2):129-33.

Reed AJ, Bibby BG. Preliminary report on effect of topical applications of titanium tetrafluoride on dental caries. *J Dent Res.* 1976 May-Jun;55(3):357-8.

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

Rieben AS, Zimny B, Noetzel J, Neumann K, Kielbassa AM. Influence of chlorhexidine on fluoride uptake by bovine dentin in vitro. *Am J Dent.* 2008 Dec;21(6):351-5.

Rigo ECS, Gehrke AS, Carbonari M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método de precipitação. *Rev. Dental Press Periodontia Implantol.* 2007;1(3):39-50.

Rintoul L, Wentrup-Byrne E, Suzuki S, Grøndahl L. FT-IR spectroscopy of fluoro-substituted hydroxyapatite: strengths and limitations. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(9):1701-9.

Rirattanapong P, Vongsavan K, Saengsirinavin C, Pornmahala T. Effect of fluoride varnishes containing tri-calcium phosphate sources on remineralization of initial primary enamel lesions. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2014 Mar;45(2):499-504.

Ritwik P, Aubel JD, Xu X, Fan Y, Hagan J. Evaluation of short-term fluoride release from fluoride varnishes. *J Clin Pediatr Dent*. 2012 Spring;36(3):275-8.

Robinson C. Fluoride and the caries lesion: interactions and mechanism of action. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009 Sep;10(3):136-40.

Roncalli AG, Sheiham A, Tsakos G, Watt RG. Socially unequal improvements in dental caries levels in Brazilian adolescents between 2003 and 2010. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2015 Feb 8 (*In press*).

Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad*. 2013 Nov;42(2):179-88.

Saban A, Ridic O, Karamehic J, Saban O, Delic-Sarac M, Džananovic N, Coric J, Ridic G, Panjeta M. Assessments of the socioeconomic status and diet on the prevalence of dental caries at school children in central bosnian canton. *Mater Sociomed*. 2014 Oct;26(5):309-12.

Salomão PMA. Efeito do tipo de lesão cáriosa artificial em esmalte bovino sobre o potencial remineralizante da saliva, do dentifrício e do verniz fluoretado: um estudo *in situ* [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

Santos Lde M, Reis JI, Medeiros MP, Ramos SM, Araújo JM. In vitro evaluation of fluoride products in the development of carious lesions in deciduous teeth. *Braz Oral Res*. 2009 Jul-Sep;23(3):296-301.

Sarumathi T, Kumar B S, Datta M, V T H, Nisha V A. Prevalence, severity and associated factors of dental caries in 3-6 year old children. *J Clin Diagn Res*. 2013 Aug;7(8):1789-92.

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

Schemehorn BR, Wood GD, McHale W, Winston AE. Comparison of fluoride uptake into tooth enamel from two fluoride varnishes containing different calcium phosphate sources. *J Clin Dent*. 2011;22(2):51-4.

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.

Seppä L, Hausen H, Tuutti H, Luoma H. Effect of a sodium fluoride varnish on the progress of initial caries lesions. *Scand J Dent Res*. 1983 Apr;91(2):96-8.

Seppä L, Leppänen T, Hausen H. Fluoride varnish versus acidulated phosphate fluoride gel: a 3-year clinical trial. *Caries Res*. 1995;29(5):327-30.

Seppä L, Luoma H, Hausen H. Fluoride content in enamel after repeated applications of fluoride varnishes in a community with fluoridated water. *Caries Res*. 1982;16(1):7-11.

Seppä L, Pöllänen L. Caries preventive effect of two fluoride varnishes and a fluoride mouthrinse. *Caries Res*. 1987;21(4):375-9.

Seppä L, Tuutti H, Luoma H. Three-year report on caries prevention of using fluoride varnishes for caries risk children in a community with fluoridated water. *Scand J Dent Res*. 1982 Apr;90(2):89-94.

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

Seppä L. Fluoride varnishes in caries prevention. *Med Princ Pract*. 2004 Nov-Dec;13(6):307-11.

Seppä L. Studies of fluoride varnishes in Finland. *Proc Finn Dent Soc*. 1991;87(4):541-7.

Shrestha BM, Mundorff SA, Bibby BG. Enamel dissolution. I. Effects of various agents and titanium tetrafluoride. *J Dent Res*. 1972 Nov-Dec;51(6):1561-6.

Slade GD, Bailie RS, Roberts-Thomson K, Leach AJ, Raye I, Endean C, Simmons B, Morris P. Effect of health promotion and fluoride varnish on dental caries among Australian Aboriginal children: results from a community-randomized controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2011 Feb;39(1):29-43.

Souza BM, Lima LL, Comar LP, Buzalaf MA, Magalhães AC. Effect of experimental mouthrinses containing the combination of NaF and TiF₄ on enamel erosive wear in vitro. *Arch Oral Biol*. 2014 Jun;59(6):621-4.

Stahl J, Zandona AF. Rationale and protocol for the treatment of non-cavitated smooth surface carious lesions. *Gen Dent*. 2007 Mar-Apr;55(2):105-11.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Tveit AB. The effect of daily fluoride mouth rinsing on enamel erosive/abrasive wear in situ. *Caries Res*. 2013;47(1):2-8.

Strohmenger L, Brambilla E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review. *Oral Dis*. 2001 Mar;7(2):71-80.

Sundell AL, Ullbro C, Koch G. Evaluation of preventive programs in high caries active preschool children. *Swed Dent J*. 2013;37(1):23-9.

- Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011 Mar; 90(3):294-303.
- ten Cate J. In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res*. 1990;69(Spec. Iss.):614-19.
- ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(3):283-96.
- ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In Fejerskov O, Kidd EAM (eds): *Dental Caries: The Disease and its clinical management*. Oxford; Blackwell Munksgaard, 2003:49-69.
- ten Cate JM. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J*. 2013 Feb;214(4):161-7.
- ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. *Acta Odontol Scand*. 1999;57:325-9.
- ten Cate JM. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):254-7.
- ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci*. 1997 Oct;105(5 Pt 2):461-5.
- Tenuta LM, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. *Braz Oral Res*. 2010;24 Suppl 1:9-17.
- Tezel H, Ergücü Z, Onal B. Effects of topical fluoride agents on artificial enamel lesion formation in vitro. *Quintessence Int*. 2002 May;33(5):347-52.
- Todd MA, Staley RN, Kanellis MJ, Donly KJ, Wefel JS. Effect of a fluoride varnish on demineralization adjacent to orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999 Aug;116(2):159-67.
- Trommer RM, dos Santos LA, Bergmann CP. Alternative technique to obtain hydroxyapatite coating. *Cerâmica*. 2007;53:153-8.
- Twetman S, Sköld-Larsson K, Modéer T. Fluoride concentration in whole saliva and separate gland secretions after topical treatment with three different fluoride varnishes. *Acta Odontol Scand*. 1999 Oct;57(5):263-6.
- Vale GC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, ten Cate JM, Cury JA. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm. *J Dent Res*. 2011 Jan;90(1):77-81.
- Vieira A, Ruben JL, Huysmans MC. Effect of titanium tetrafluoride, amine fluoride and fluoride varnish on enamel erosion in vitro. *Caries Res*. 2005 Sep-Oct;39(5):371-9.
-

Vieira AM, Ruben JL, Bronkhorst EM, Huysmans MC. In vitro reduction of dental erosion by low-concentration TiF₄ solutions. *Caries Res.* 2011;45(2):142-7.

Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:146-57.

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

Wefel JS. Artificial lesion formation and fluoride uptake after TiF₄ applications. *Caries Res.* 1982;16(1):26-33.

Weinstein P, Spiekerman C, Milgrom P. Randomized equivalence trial of intensive and semiannual applications of fluoride varnish in the primary dentition. *Caries Res.* 2009;43(6):484-90.

Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Jue B, Shain S, Hoover CI, Featherstone JD, Gansky SA. Fluoride varnish efficacy in preventing early childhood caries. *J Dent Res.* 2006 Feb;85(2):172-6.

Weyant RJ, Tracy SL, Anselmo TT, Beltrán-Aguilar ED, Donly KJ, Frese WA, Hujoel PP, Iafolla T, Kohn W, Kumar J, Levy SM, Tinanoff N, Wright JT, Zero D, Aravamudhan K, Frantsve-Hawley J, Meyer DM; American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Topical Fluoride Caries Preventive Agents. Topical fluoride for caries prevention: executive summary of the updated clinical recommendations and supporting systematic review. *J Am Dent Assoc.* 2013 Nov;144(11):1279-91. Erratum in: *J Am Dent Assoc.* 2013 Dec;144(12):1335.

Weyne SC. A construção do paradigma de promoção de saúde: um desafio para as novas gerações. In: Kriger L, organizador. *Promoção de Saúde Bucal.* São Paulo: Artes Médicas. 1997:1-26.

Wiegand A, Magalhães AC, Attin T. Is titanium tetrafluoride (TiF₄) effective to prevent carious and erosive lesions? A review of the literature. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8(2):159-64.

Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhães AC, Attin T. Comparison of the effects of TiF₄ and NaF solutions at pH 1.2 and 3.5 on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2009;43(4):269-77.

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. Dental caries process. *Dent Clin North Am.* 1999 Oct;43(4):635-64.

Anexos

ANEXO A

Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº 114/2011

Bauru, 27 de outubro de 2011.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **Avaliação da interação do TiF4 com a hidroxiapatita e esmalte bem como o efeito sobre a des-remineralização do esmalte dentário com lesão de cárie artificial in situ**, de autoria de Lívia Picchi Comar, sob sua orientação, foi novamente analisado em reunião realizada no dia **26 de outubro de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Ana Carolina Magalhães

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o Sr. (a) _____ a participar da seguinte pesquisa:

1 - Título do Trabalho Experimental

Avaliação da interação do TiF_4 com a hidroxiapatita e esmalte bem como o efeito sobre a des-mineralização do esmalte dentário com lesão de cárie artificial *in situ*

2 - Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar do efeito de uma aplicação única de verniz à base de TiF_4 e NaF sobre a formação e desenvolvimento da cárie dentária em esmalte *in situ*.

3 - Procedimentos da Fase Experimental

Você utilizará, durante três fases de 14 dias de duração cada uma, com um período de descanso de 7 dias entre elas, um aparelho no céu da boca, confeccionado em resina acrílica, no qual serão fixados 8 blocos de dente bovino previamente esterilizados. Sobre alguns blocos será fixada uma tela plástica com objetivo de acumular placa dentária. Durante cada período, você deverá aplicar uma gota de solução de sacarose a 20% sobre cada bloco de dente, 4 ou 8 vezes ao dia (blocos com cera azul- 4 vezes e com cera vermelha – 8 vezes), por 5 minutos, fora da boca. Além disso, você também deverá aplicar uma gota de solução de dentífrico fluoretado 1:3 em cada bloco do aparelho (todos os blocos), 2 vezes ao dia fora da boca, durante a primeira e a última escovação dentária, por um período de 1 minuto. Na sequência, o aparelho deverá ser reinserido na boca.

O aparelho só poderá ser removido para a realização do experimento acima descrito e para as principais refeições (com no máximo 1 hora de duração), ocasião em que o dispositivo ficará envolvido em gaze encharcada por água da torneira. Logo após a refeição, vocês deverão realizar a higiene bucal e esperar ao redor de 5 minutos para recolocar o aparelho. O intervalo entre as refeições deverá ser de pelo menos 2 a 3 h e entre os experimentos de pelo menos 1h. Durante o uso do aparelho, nenhum tipo de alimento ou bebida poderá ser ingerido, exceto água.

4 - Benefícios do Experimento

Produtos fluoretados, dentre estes podemos citar mousses, soluções, géis e vernizes, têm sido testados para a prevenção e tratamento da cárie dentária. Os vernizes parecem possuir um bom efeito protetor e de tratamento de lesões iniciais de cárie (mancha branca), devido a sua adesão à superfície dentária, o que prolonga o tempo de contato entre o fluoreto e o esmalte. A ideia de se utilizar um verniz de tetrafluoreto de titânio surgiu devido ao fato deste este sal fluoretado, incorporado a soluções, ter se mostrado mais eficaz quando comparado ao NaF e AmF sobre a desmineralização dentária. Espera-se que este verniz de tetrafluoreto de titânio possa apresentar um melhor efeito em prevenir a progressão da cárie dentária que os produtos já disponíveis no mercado, beneficiando a população de alto risco ao aparecimento da lesão. Não há benefício direto para o participante dessa pesquisa.

5 - Riscos do Experimento

Como os blocos de esmalte são fixados ao aparelho palatino através de cera pegajosa, as amostras podem eventualmente se desprender e o participante ter o inconveniente de engolir o bloco, porém isto não acarretará maiores problemas ao participante. Além disso, devido ao acúmulo de placa bacteriana no aparelho, o voluntário poderá apresentar uma leve inflamação das amígdalas. É importante reforçar que estes inconvenientes raramente ocorrem. Nestes casos, o participante irá comunicar o responsável pela pesquisa, que irá acompanhá-lo até um médico. E então será liberado da participação na pesquisa, sem penalização alguma. Os gastos que forem gerados por este trabalho ficará a cargo da responsável pelo projeto. Importante ressaltar que não está sendo considerado nenhum pagamento ou recompensa material pela participação do sujeito neste estudo. Você terá garantido o direito à indenização compensatória caso fique comprovado que a sua participação acarretou algum problema a você.

Fica claro que você poderá, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos o participante da pesquisa poderá recorrer a qualquer um dos membros da equipe do projeto (Laboratório de Bioquímica 14-3235-8247) ou a pesquisadora responsável Livia Picchi Comar (telefone 14 981260040/ 14 32457580, e-mail liviacomar@usp.br). Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa,

poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Pós Graduação FOB/USP) ou pelo telefone (14)3235-8356, ou por e-mail (cep@fob.usp.br).

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3, item IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o sujeito da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Pesquisadora: Livia Picchi Comar

O **Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**, organizado e criado pela **FOB-USP**, em 29/06/98 (**Portaria GD/0698/FOB**), previsto no item VII da Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:

Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das **13h30 às 17 horas**, em dias úteis.

Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75

Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901

Telefone/FAX(14)3235-8356

e-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO C

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

1. Todos os materiais utilizados na pesquisa não acarretam em custo ao voluntário.
2. Durante o experimento, os voluntários deverão utilizar apenas a escova, fio dentário e pasta de dente, fornecidos pela autora do trabalho.
3. A pesquisa será composta por três fases de 14 dias cada uma, com 7 dias de descanso entre elas.
4. Os voluntários deverão utilizar um dispositivo bucal palatino e só o removerão para as principais refeições diárias (café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir), e para os procedimentos de aplicação de sacarose.
5. Enquanto o dispositivo permanecer fora da boca durante as refeições, este deverá ficar envolvido em gaze umedecida em água de torneira.
6. Durante o uso do dispositivo, nenhum tipo de alimento ou bebida poderá ser ingerido (retirar o dispositivo para a ingestão de água e recolocá-lo imediatamente após a ingestão).
7. Evite que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a refeição (máximo de 1 hora por refeição).
8. Realize sua higiene bucal normalmente, utilizando o dentífrico fornecido.
9. Os voluntários deverão aplicar uma gota de solução de sacarose (fornecida pela autora) em cada bloco da fileira vermelha (2 blocos), 8 vezes ao dia, e em cada bloco da fileira azul (2 blocos), 4 vezes ao dia, durante 5 minutos fora da boca. Logo após a aplicação o aparelho deve ser reinserido na boca. O intervalo das aplicações deve ser de aproximadamente 2 horas para a fileira vermelha e 4 horas para a fileira azul. Não deverá ser aplicada sacarose nos blocos das duas fileiras verdes.
10. Muito cuidado deverá ser tomado para que a solução de sacarose aplicada não escorra para as fileiras verdes. Esse cuidado é de extrema importância.
11. Além disso, os voluntários deverão aplicar uma gota de solução de dentífrico fluoretado ("solução fluoretada") em cada bloco do aparelho (todos os blocos), 2 vezes ao dia, durante a primeira e a última escovação dentária, por um período de 1 minuto. Na sequência, o aparelho deverá ser reinserido na boca e o voluntário deve bochechar água de torneira para realizar um leve enxágue do aparelho.
12. A aplicação da solução fluoretada deve ser realizada com um intervalo de 30 minutos da aplicação de sacarose seguinte (manhã) e anterior (noite). Após cada aplicação de sacarose, o aparelho não poderá ser removido da boca por pelo menos 30 minutos.
13. Uma vez ao dia, os voluntários poderão realizar a escovação do dispositivo, somente da face voltada para o palato e com o dentífrico fornecido pela autora.
14. Quando qualquer material estiver acabando, entrar em contato com a autora, para que este seja repostado.
15. Favor verificar todos os dias se os fragmentos estão em suas lojas e se a tela plástica e sua proteção em cera permanecem intactas. Caso não estejam, entrar em contato imediatamente com a autora.
16. Qualquer dúvida, entrar em contato com a autora do trabalho pelos telefones abaixo:

Lívia Comar
Celular: (14) 981260040
Residência Bauru: (14) 32457580
Laboratório de Bioquímica FOB/USP: (14) 32358246

Muito grata pela sua colaboração!
Lívia Comar

RESUMO DAS INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Durante o período de utilização do aparelho, o voluntário deverá utilizar apenas o dentífrico, a escova e o fio dentário fornecidos pela autora para a realização da pesquisa. Bem como não poderão realizar bochechos com enxaguatórios bucais, como por exemplo, Cepacol, Listerine, Periogard. Também não poderá ser submetido à aplicação tópica de flúor profissional.

1. Primeira noite: apenas dormir com o aparelho.
2. Durante 14 dias:
 - retirar o aparelho **4 vezes ao dia** (café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir), por um período de no máximo **1 hora** por vez. Enquanto isso o aparelho deverá permanecer envolvido em gaze umedecida com água de torneira.
 - após cada período, realizar a higiene bucal com dentífrico e escova dental fornecidos pela autora, antes do aparelho ser recolocado na boca.
3. Aplicar **1 gota de solução de sacarose** em cada bloco da fileira **VERMELHA** (2 blocos), com o aparelho fora da boca. Aguardar **5 minutos** e recolocar o aparelho na boca.
 - este procedimento deverá ser realizado **8 vezes ao dia**, de preferência com um intervalo de 2h entre as aplicações.
4. Aplicar **1 gota de solução de sacarose** em cada bloco da fileira **AZUL** (2 blocos), com o aparelho fora da boca. Aguardar **5 minutos** e recolocar o aparelho na boca.
 - este procedimento deverá ser realizado **4 vezes ao dia**, de preferência com um intervalo de 4h entre as aplicações.
5. Aplicar **1 gota de solução fluoretada** em cada bloco do aparelho (todos os blocos), com o aparelho fora da boca. Aguardar **1 minuto**, recolocar o aparelho na boca e enxaguar levemente.
 - este procedimento deverá ser realizado **2 vezes ao dia**, durante a primeira e a última escovação dentária.

Obs: Ao fazer a aplicação de sacarose nas fileiras VERMELHA e AZUL, tomar o máximo de cuidado para que esta não escorra para as fileiras VERDES.

No último dia, dormir com o dispositivo, retirar no dia seguinte pela manhã e guardar em gaze umedecida com água até a entrega para o pesquisador.

Muito grata.

Lívia Comar

(14) 981260040