Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

LÍVIA PICCHI COMAR

**Comparação do efeito de TiF_4 e NaF,
nas formas de verniz e solução, sobre a
desmineralização e remineralização
do esmalte dentário bovino *in situ***

BAURU
2011

LÍVIA PICCHI COMAR

Comparação do efeito de TiF_4 e NaF, nas formas de verniz e solução, sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dentário bovino *in situ*

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Carolina Magalhães

Versão Corrigida

BAURU
2011

C73c Comar, Livia Picchi
Comparação do efeito de TiF_4 e NaF, nas formas de verniz e solução, sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dentário bovino *in situ* / Livia Picchi Comar . – Bauru, 2011.
145 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profª Drª Ana Carolina Magalhães

Nota: A versão original desta dissertação 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: 058/2009
Data: 06/06/2009

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família, a quem devo tudo o que sou.

Aos meus pais **Marco** e **Renata**, pelo exemplo de força, persistência e dignidade.

Ao meu irmão **Marco Aurélio**, pela amizade e companheirismo.

Aos meus avós paternos **Dorival** e **Theresa** (*in memoriam*), e avós maternos **Warner** e **Bernardete**, pela presença tão carinhosa em minha vida.

Meu amor por vocês é incondicional e eterno!

*“Não ame pela beleza, pois um dia ela acaba.
Não ame por admiração, pois um dia você decepciona-se.
Ame apenas,
pois o tempo nunca pode acabar com um amor sem explicação”*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

Inicialmente pelo dom da vida. Por colocar boas oportunidades em meio caminho, por me fazer enxergá-las e aproveitá-las. Por colocar pessoas tão especiais em minha vida durante toda essa trajetória. Por me proporcionar saúde, luz, força e garra para que eu sempre conseguisse seguir em frente.

Deus é essencial em minha vida.

Obrigada, Senhor, por nunca me abandonar!

Ao meu pai **Marco**,

Por desde o início nunca ter desistido de mim e pela constante preocupação em fazer tudo dar certo. Por acreditar em meus ideais e me apoiar em todos os momentos da minha vida. Você é o meu melhor exemplo de caráter, bondade, honestidade, força e perseverança.

Pai, você é o meu maior orgulho e se eu cheguei onde estou hoje, sem dúvida devo isso a você.

Muito obrigada por tudo, sempre!

À minha mãe **Renata**,

Pela preocupação diária. Pela amizade, amor, carinho, paciência, confiança e esforço em fazer por mim tudo o que há de melhor. Por me apoiar, acreditar e me convencer de que eu posso seguir e atingir meus objetivos com dignidade.

Agradeço a Deus todos os dias por Ele ter me dado você como mãe.

Obrigada por existir e por sua presença constante em minha vida!

Ao meu irmão **Marco Aurélio**,

Pela amizade, pelo companheirismo, incentivo, carinho e por todos os momentos especiais que passamos juntos. Por toda a ajuda que me prestou todas as vezes que precisei.

Obrigada por demonstrar que sempre posso contar com você!

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 de meus objetivos.

Ao meu namorado **Leonardo**,

Pela paciência diária. Por me ouvir tanto nos momentos de desespero como nos de alegria. Por me apoiar e sempre ser sincero, me mostrando meus erros e acertos. Por toda a ajuda que me prestou durante fases difíceis e por se esforçar para que eu me sentisse bem em todos os momentos, independente do que acontecia ao nosso redor. Você, juntamente com seus pais e irmãos, sempre tão prestativos, me permitiram sentir que eu tenho uma segunda família aqui em Bauru.

Léo, obrigada pelo amor, carinho, companheirismo, amizade, preocupação, enfim, por tudo o que você fez e demonstrou por mim durante esses dois anos.

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

Por cada minuto que dividimos juntas, seja no lazer ou no trabalho. Pela amizade durante esses anos, pela cumplicidade, companhia, por me ouvir todas as vezes que lamentei ou todas que gargalhei. Por dividir comigo problemas diários e pela tentativa de me ajudar a resolvê-los. Por todas as noites de festa ou mesmo pelas madrugadas em que ficamos fazendo os aparelhos no laboratório.

Bru, obrigada pela amizade, por ser colaboradora desta pesquisa, pela grande ajuda que me deu nesta dissertação, e é claro, por dividir comigo momentos tão especiais da minha vida, afinal você é especial!

Às minhas queridas amigas: **Marcela, Renata, Thais, Larissa, Gabriela, Letícia, Laís, Priscila, Luciana e Sabrina,**

Por todos os momentos em que dividimos alegrias, tristezas, preocupação, lazer, trabalho, conversas, saídas, entre tantos. A amizade e companhia de vocês, aqui em Bauru, fizeram com que tudo parecesse mais fácil e tranquilo, e apesar da distância já ter me afastado da maioria de vocês, saibam que eu nunca vou esquecer cada dia, cada conversa, cada choro, cada risada, cada festa, cada fofoca ou mesmo cada silêncio. Cada uma de vocês estará para sempre guardada num lugar especial do meu coração.

Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos colegas do laboratório de Bioquímica: **Ângela, Thiemi, Heloisa, Kellen, Senda, Cíntia, Cristiane, Maria Cecília, Alessandra, Camila, Juliano, Claudinha, Flávia Levy, Flávia Iano, Kelly, Aline, Mileni, Larissa, Luiz, Melina, Taísa, Priscila, Cláudia, Janete, Bruno, Lucas, Vinícius, Joyce, Adriana e Flávia,**

Pela companhia e amizade durante todo esse tempo. Pelas conversas fora de hora, pelas risadas, pela ajuda nos trabalhos realizados e pelo convívio diário. Sem dúvida, a presença e companhia de vocês transformaram o ambiente de trabalho do laboratório muito mais agradável.

Às alunas de Iniciação Científica: **Beatriz, Bianca, Marina, Suzana e Luana,**

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

Aos **voluntários** que participaram desta pesquisa,

Agradeço imensamente aos voluntários: Rafael, Luiz, Vanessa, Izabella, Naiana, Layla, Luciana, Alessandra, Thiemi e Bruna, que aceitaram a participar desta pesquisa por livre e espontânea vontade. Obrigada por se dedicarem ao experimento, por atenderem às nossas instruções e por sempre estarem prontos a ajudar. Sem dúvida, se não fosse por vocês, este trabalho não teria acontecido.

Muito obrigada, de coração!

À **Profª Annette Wiegand,**

Pela disponibilidade em fazer todas as análises de microradiografia para este trabalho. Sempre tão atenciosa e disposta a fazer o seu melhor. Pela paciência em repetir as análises quando foi necessário, por responder tão prontamente aos meus e-mails e dúvidas.

Annette, muito obrigada, sua ajuda foi de essencial importância, espero vê-la em breve. *Thank you very much, and I hope see you soon!*

Aos professores da banca examinadora: **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem** e **Profª Drª Daniela Rios,**

Por aceitarem tão prontamente o 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 (2005-2008) me fez perceber que a carreira acadêmica era o que eu realmente queria para mim. Obrigada por sempre ser tão atenciosa, por continuar a abrir as portas do departamento de Bioquímica para meus estudos e por ter um coração gigante, estando sempre disposta a ajudar.

Agradeço todo o conhecimento que adquiri durante o tempo q trabalhamos juntas, a senhora é sem dúvida meu maior exemplo.

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

Pelo convívio de trabalho no departamento de Bioquímica, e por ser sempre tão atencioso e educado.

Aos funcionários do departamento de Ciências Biológicas: **Thelma, Ovídio, Vera e Dalva,**

Vocês sempre foram muito prestativos, principalmente quando precisei da ajuda de vocês. Obrigada pela atenção e pelo esforço em ajudar.

Às secretárias da pós-graduação: **Fátima, Meg e Letícia** e à **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 vida e que por algum motivo perdemos contato,

Obrigada pelo carinho, nunca me esquecerei de cada um de vocês.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru-USP**, na pessoa do senhor diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, e do senhor presidente da **Comissão de Pós-Graduação Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**,

Pela oportunidade em realizar pós-graduação em nível de Mestrado nesta instituição, que tanto amo e de que 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 6 anos.

À **Universidade de Zurich**, Suíça, representa pelo PD. Wolfgang Buchalla e pela PD. Annette Wiegand,

Pela parceria estabelecida e por disponibilizarem seus equipamentos laboratoriais para a realização de parte da análise deste trabalho.

Obrigada pela oportunidade e pela atenção dispensada.

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

Pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo de Mestrado, e também de dois estudos de Iniciação Científica, realizados anteriormente (2006 e 2008).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

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

Tudo começou quando resolvi fazer Iniciação Científica no departamento de Bioquímica da FOB/USP (Nov 2005). Parece que foi ontem o dia que marcamos uma reunião e você me disse que iria ser minha co-orientadora no projeto. Desde então, estamos trabalhando juntas até hoje.

Carol, nem se eu escrevesse aqui todas as palavras que gostaria eu iria conseguir expressar o quanto lhe sou grata por absolutamente tudo: por todas as manhãs, tarde e noites que passamos trabalhando juntas, por sempre me atender prontamente a qualquer hora do dia para o que precisasse, por todas as noites que ficou no laboratório para me ajudar com os trabalhos, por toda atenção e preocupação que você sempre dispensou em sanar minhas dúvidas, por todas as vezes que atendeu ligações de desespero, tarde da noite, e você com a maior paciência conseguia me explicar um artigo inteiro que eu não tinha conseguido entender; pelo apoio e incentivo que sempre me deu em continuar pesquisando, estudando, seguindo em frente.

Obrigada por acreditar no meu potencial, por confiar no meu trabalho. Obrigada por todas as explicações minuciosas, por todos e-mails prontamente respondidos, pela companhia nos congressos, por todos os chocolates suíços que chegavam em boa hora, pela consideração de estar presente tanto na minha vida profissional, quanto na pessoal. Gostaria que soubesse que eu te admiro muito. Admiro sua competência, sua capacidade, seu empenho, sua inteligência, seu esforço, seu conhecimento, se um dia eu conseguir ser um pouco do que você é, já estarei extremamente feliz. Tenho orgulho de representar sua primeira defesa de mestrado, e espero ter atingido as expectativas.

Carol, obrigada por tudo o que me ensinou durante esses quase 6 anos de trabalho juntas, por sempre ser tão atenciosa e dedicada. Com você aprendi a ter disciplina e me esforçar ao máximo para realizar coisas em que acredito.

Obrigada pela IMENSA AJUDA para escrever esta dissertação, para realizar meu trabalho e por fazer com que tudo desse certo. Sem dúvida, se não fosse por você, eu não conseguiria ter realizado tantas coisas. Espero ter a honra de podermos trabalhar juntas por um bom tempo.

MUITO, MUITO OBRIGADA!!!!!!!!!!!!!!

***“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar é
aproximar-se de Deus.”***

Pitágoras

“Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor.”

Albert Einstein

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

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

Aristóteles

***“Não há nada que dominemos inteiramente a não ser os
nossos pensamentos.”***

René Descartes

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar do efeito da aplicação tópica de um verniz e solução experimental de TiF_4 , comparando-os ao verniz e solução de NaF , sobre o processo de des-remineralização do esmalte dentário *in situ*. Para tal, 132 blocos de esmalte bovino (4x4mm) foram selecionados pela microdureza de superfície, sendo que em metade deles foi produzida lesão de cárie artificial em solução desmineralizante (pH 5,0, 6 dias). Na seqüência, foi determinada a microdureza de superfície pós-lesão. A outra metade dos blocos permaneceu hígida. Onze voluntários participaram de 3 fases cruzadas (14 dias cada, *washout* de 7 dias), boca-dividida e cegas, nas quais utilizaram aparelhos palatinos com 4 amostras de esmalte por fase (2 hígidas e 2 desmineralizadas), sendo que cada tipo de amostra recebeu um tipo de tratamento (verniz ou solução). Em todas as amostras permitiu-se o acúmulo de placa dentária. Em uma fase (Fase A), foram aplicados agentes a base de NaF a 5,42% (2,45% F^- e pH 5,0), em outra fase (Fase B), foram utilizados agentes a base de TiF_4 a 4% (2,45% F^- e pH 1,0), e na última fase (Fase C) foram utilizados agentes placebos (verniz sem flúor pH 5,0 e sem tratamento). Os tratamentos foram realizados *in vitro* (verniz-6 h e solução-1 minuto). Durante o período *in situ*, os voluntários aplicaram solução de sacarose a 20%, 8x5min ao dia, sobre os blocos hígidos, para provocar a desmineralização. Já para os blocos desmineralizados nenhum procedimento foi realizado, para permitir a remineralização. A microdureza de superfície final foi realizada, para o cálculo da porcentagem de variação de microdureza de superfície, assim como a microdureza longitudinal e microradiografia transversal, para o cálculo das perdas de microdureza e volume mineral integradas, respectivamente. Os dados foram submetidos à ANOVA-RM/ Tukey-Kramer, teste t pareado e ANOVA a dois critérios/Bonferroni ($p < 0,05$). Houve uma redução significativa da desmineralização superficial e um aumento significativo da remineralização superficial do esmalte *in situ* pelos tratamentos com verniz e solução de TiF_4 , em comparação aos controles. Pôde-se constatar ainda que os tratamentos com o verniz de NaF , verniz de TiF_4 e solução de TiF_4 foram efetivos na redução da desmineralização subsuperficial *in situ*. No entanto, observou-se que o protocolo experimental não permitiu uma adequada remineralização de subsuperfície *in situ*. Com base nos resultados, pode-se

concluir que o verniz e a solução de TiF_4 parecem ser promissores na prevenção da desmineralização, porém em relação à remineralização mais estudos *in situ* são necessários.

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

ABSTRACT

Comparison between the effect of TiF_4 and NaF varnishes and solutions on bovine enamel demineralization and remineralization *in situ*

The aim of this study was to evaluate the effect of the experimental TiF_4 varnish and solution, comparing with NaF solution and varnish, on dental enamel remineralization *in situ*. For that, 132 bovine enamel samples (4x4 mm) were selected using surface microhardness, and half of them were submitted to artificial caries lesion formation using a demineralizing solution (pH 5.0, 6 days). The surface microhardness after the demineralization was measured. The other half of the samples remained sound. Eleven volunteers took part in this cross-over, split-mouth and double-blind study performed in 3 phases of each 14 days (washout of 7 days). Four enamel samples were worn in palatal appliances (2 sound and 2 demineralized), being each type of sample submitted to one treatment (varnish or solution). The dental plaque accumulation was allowed on all samples. In phase A, 5.42% NaF varnish/solution was applied (2.45% F^- , pH 5.0); in phase B, 4% TiF_4 varnish/solution was used (2.45% F^- , pH 1.0) and at the last phase (phase C) the placebo treatments were performed (placebo varnish pH 5.0 and no-treatment). The treatments were performed *in vitro* (varnish-6h and solution-1min). During the *in situ* phase, the volunteers dripped a solution containing 20% weight/volume (w/v) sucrose on the sound samples for 5 min, 8 times a day, to provoke demineralization. While on the demineralized samples nothing was done, in order to allow remineralization. The final surface microhardness was analyzed for the calculation of the % of surface microhardness change, as well as the cross-sectional hardness and the transversal microradiography, for the calculation of the integrated loss of microhardness and mineral volume, respectively. The data were submitted to RM-ANOVA/ Tukey-Kramer, t test and 2-way ANOVA/ Bonferroni ($p < 0.05$). There was a significant reduction of the surface enamel demineralization and increase of surface remineralization by the treatments with TiF_4 varnish and solution compared to control *in situ*. The treatments with NaF varnish, TiF_4 varnish and solution were able to reduce the subsurface demineralization *in situ*. However, the experimental protocol did not allow the subsurface remineralization *in situ*. Based on the results, it can

be concluded that the TiF_4 varnish and solution seem to be promising products for preventing demineralization, but for the remineralization more studies need to be conducted.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 – Máquina de corte.....	54
Figura 2 – Dente bovino sendo cortado	54
Figura 3 – Obtenção de bloco de esmalte (4x4mm).....	54
Figura 4 – Planificação da dentina	55
Figura 5 – Politriz metalográfica	55
Figura 6 – Polimento final do esmalte	55
Figura 7 – Microdurômetro utilizado para seleção e distribuição dos espécimes	56
Figura 8 – Visão da ponta KNOOP	56
Figura 9 – Endentação, realizada com carga de 25g por 10s	56
Figura 10 – Bloco de esmalte com 1/3 da superfície protegida.....	57
Figura 11 – Bloco sendo imerso em 30 ml de solução desmineralizante	57
Figura 12 – Bloco totalmente imerso.....	57
Figura 13 – Pote de filme fotográfico tampado (pronto para ser colocado na estufa)	57
Figura 14 – Visão do microdurômetro durante a realização da endentação.....	58
Figura 15 – As cinco endentações iniciais e pós-lesão, realizadas na superfície do bloco de esmalte.....	58
Figura 16 – Bloco de esmalte hígido com 2/3 da superfície protegida	59
Figura 17 – Bloco de esmalte previamente desmineralizado com 2/3 da superfície protegida	59
Figura 18 – Verniz sendo aplicado na superfície do bloco	60
Figura 19 – Blocos imersos em saliva artificial.....	60
Figura 20 – Verniz sendo removido com auxílio de uma espátula	60

Figura 21 – Remoção do verniz com auxílio de uma haste flexível Cotonete® umedecido em solução de acetona.....	60
Figura 22 – Solução sendo aplicada por meio de uma micropipeta	61
Figura 23 – Remoção do excesso de solução por meio de uma haste flexível Cotonete®	61
Figura 24 – Blocos imersos em saliva artificial.....	61
Figura 25 – Aparelho intra-bucal palatino confeccionado através de modelo de gesso pedra.....	63
Figura 26 – Visão do aparelho palatino fora do modelo de gesso.....	63
Figura 27 – Aparelho com os 4 blocos de esmalte acoplados em seus respectivos sítios	63
Figura 28 – Tela plástica sendo colocada na superfície do bloco através de um bloco	63
Figura 29 – Tela plástica fixada na superfície dos blocos por meio de resina acrílica	63
Figura 30 – Aparelho palatino pronto para início da fase <i>in situ</i>	63
Figura 31 – Esquema de distribuição dos blocos H (hígido) e MB (previamente desmineralizados) no aparelho palatino, de acordo com o tipo de tratamento realizado (verniz ou solução).....	65
Figura 32 – Demonstração do sentido de corte das amostras de forma que englobasse os controles (bordas) e a lesão (centro).....	66
Figura 33 – Embutidora utilizada para incluir metade dos blocos em resina acrílica	67
Figura 34 – Blocos inclusos em resina acrílica.....	67
Figura 35 – Politriz metalográfica utilizada para o polimento da placa de acrílico com os blocos inclusos	67
Figura 36 – Placa de acrílico após o polimento final, blocos prontos para análise da microdureza longitudinal	67
Figura 37 – Seqüência de endentações realizada na região controle hígida 1, de um bloco hígido	68
Figura 38 – Seqüência de endentações realizadas na região de lesão produzida <i>in situ</i> de um bloco hígido	68

Figura 39 – Seqüência de endentações realizada na região controle hígida 2, de um bloco hígido	68
Figura 40 – Seqüência de endentações realizadas na região controle hígida, de um bloco previamente desmineralizado	69
Figura 41 – Seqüência de endentações realizadas na região desmineralizada <i>in vitro</i> e remineralizada <i>in situ</i> de um bloco previamente desmineralizado	69
Figura 42 – Seqüência de endentações realizadas na região controle somente desmineralizada <i>in vitro</i> de um bloco previamente desmineralizado.....	69
Figura 43 – Bloco de esmalte preparado para análise da microradiografia transversal	71
Figura 44 – Bloco de esmalte acoplado em dispositivo de acrílico	71
Figura 45 – Conjunto dispositivo de acrílico+bloco de esmalte acoplado na máquina de microradiografia transversal	71
Figura 46 – Bloco de esmalte desmineralizado <i>in situ</i> pertencente ao grupo verniz placebo	78
Figura 47 – Bloco de esmalte desmineralizado <i>in situ</i> pertencente ao grupo verniz de TiF_4	78
Figura 48 – Bloco de esmalte remineralizado <i>in situ</i> pertencente ao grupo verniz placebo	79
Figura 49 – Bloco de esmalte remineralizado <i>in situ</i> pertencente ao grupo verniz de TiF_4	79
Figura 50 – Valores médios da microdureza longitudinal (n=11) para cada profundidade avaliada	81
Figura 51 – Valores médios da microdureza longitudinal (n=11) para cada profundidade avaliada para a porção das amostras somente desmineralizadas.....	85
Figura 52 – Valores médios da microdureza longitudinal (n=11) para cada profundidade avaliada para a porção das amostras des-remineralizadas.....	85
Figura 53 – Valores médios de % volume mineral (n=11) para cada profundidade avaliada.....	88
Figura 54 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz TiF_4	89

Figura 55 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo solução TiF_4	90
Figura 56 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz NaF	90
Figura 57 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo solução NaF	91
Figura 58 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo placebo.....	91
Figura 59 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo controle	92
Figura 60 – Valores médios de % volume mineral (n=11) para cada profundidade avaliada para a porção desmineralizada.	96
Figura 61 – Valores médios de % volume mineral (n=11) para cada profundidade avaliada para a porção des-remineralizada.....	96
Figura 62 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz TiF_4 (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).	98
Figura 63 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo solução TiF_4 (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).	99
Figura 64 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz NaF (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).	100
Figura 65 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo solução NaF (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).	101
Figura 66 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz placebo (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).	102
Figura 67 – Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo controle (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).	103

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadros

Quadro 1. Porcentagem de força amostral para a diferenciação entre os verniz de TiF_4 e controle e verniz de NaF para os diferentes tipos de bloco considerando as variáveis estudadas e um alfa-erro de 5%.....	76
---	----

- Tabelas

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos valores de MD inicial, MD após desmineralização <i>in situ</i> (kPa/mm^2) e %PMDS, para os blocos hígidos de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	77
Tabela 2. Média e desvio-padrão dos valores de MD inicial, MD pós-lesão, MD pós- <i>in situ</i> (kPa/mm^2) e %RMDS, para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	79
Tabela 3. Média e desvio-padrão dos valores de ΔKHN ($\text{kPa/mm}^2 \times \mu\text{m}$) e profundidade da lesão (μm) para os blocos hígidos de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	80
Tabela 4. Média e desvio-padrão dos valores de ΔKHN lesão, ΔKHN efeito e $\Delta\Delta\text{KHN}$ ($\text{kPa/mm}^2 \times \mu\text{m}$), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	83
Tabela 5. Média e desvio-padrão dos valores da profundidade da lesão (μm) antes e após a remineralização <i>in situ</i> , para os blocos previamente desmineralizados, de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	84
Tabela 6. Média e desvio-padrão dos valores de R (% perda vol.min), profundidade da lesão (μm) e perda mineral integrada (%vol.min $\times \mu\text{m}$), para os blocos hígidos de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	87
Tabela 7. Média e desvio-padrão dos valores de R (% perda vol.min) da porção desmineralizada (antes) e daquela des-remineralizada (após), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	93

Tabela 8. Média e desvio-padrão dos valores de profundidade da lesão (μm) da porção desmineralizada (antes) e daquela des-remineralizada (após), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	94
Tabela 9. Média e desvio-padrão dos valores de espessura da camada superficial pseudo-intacta (μm) da porção desmineralizada (antes) e daquela des-remineralizada (após), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	94
Tabela 10. Média e desvio-padrão dos valores de ΔZ lesão, ΔZ efeito e $\Delta\Delta Z$, para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11).....	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Vernizes fluoretados e a cárie dentária.....	27
2.1.1	Estudos <i>in vitro</i> / animais	29
2.1.2	Estudos <i>in situ</i>	32
2.1.3	Estudos clínicos	35
2.1.4	Revisões de Literatura e Revisões Sistemáticas	38
2.2	Tetrafluoreto de titânio (TiF ₄)	41
3	PROPOSIÇÃO	49
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1	Obtenção dos dentes e preparo das amostras	53
4.2	Seleção das amostras	56
4.3	Indução da lesão de cárie artificial em esmalte <i>in vitro</i>	57
4.4	Tratamento das amostras <i>in vitro</i>	59
4.5	Protocolo <i>in situ</i>	61
4.5.1	SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS	61
4.5.2	CONFECÇÃO DO APARELHO PALATINO	62
4.5.3	FASES DO PROTOCOLO <i>IN SITU</i> E ORIENTAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS	64
4.6	Avaliação da microdureza de superfície final e microdureza longitudinal.....	66
4.7	Avaliação da microradiografia transversal (TMR)	70
4.8	Análise estatística	71

5	RESULTADOS	76
5.1	Microdureza Superficial	77
5.1.1.	Amostras hígidas submetidas à desmineralização <i>in situ</i>	77
5.1.2.	Amostras desmineralizadas <i>in vitro</i> submetidas à remineralização <i>in situ</i>	78
5.2	Microdureza longitudinal	80
5.2.1.	Amostras hígidas submetidas à desmineralização <i>in situ</i>	80
5.2.2.	Amostras desmineralizadas <i>in vitro</i> submetidas à remineralização <i>in situ</i>	82
5.3	Microradiografia transversal.....	86
5.3.1.	Amostras hígidas submetidas à desmineralização <i>in situ</i>	86
5.3.2.	Amostras desmineralizadas <i>in vitro</i> submetidas à remineralização <i>in situ</i>	92
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS	125
	ANEXOS.....	141

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Diversos tipos de agentes fluoretados têm sido utilizados nos consultórios odontológicos desde o início dos anos 40, com o objetivo de possibilitar a deposição e incorporação de fluoreto ao esmalte, tornando-o mais resistente à dissolução por ácidos (BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008). Embora agora se saiba que os mecanismos de ação do flúor são mais complexos e que a frequência e disponibilidade de baixas concentrações são mais importantes na prevenção de cárie que altas concentrações, há evidência científica abundante que suporta o valor das aplicações tópicas profissionais para a prevenção de cárie dentária e tratamento de lesão de cárie inicial (HICKS et al., 2001; MUNSHI; REDDY; SHETTY, 2001; JACOBSEN; YOUNG, 2003; DEMITO et al., 2004; DOHNKE-HOHRMANN; ZIMMER, 2004; MOBERG SKÖLD et al., 2005, KHATTAK; CONRY; KO, 2005; WEINTRAUB et al., 2006; SANTOS et al., 2009; LEE et al., 2010).

Os sais fluoretados mais testados são o fluoreto de sódio (NaF), fluoreto de amina (AmF), fluoreto estanhoso (SnF_2) e os tetrafluoretos. Dentre os modos de aplicação profissional, encontramos soluções, géis, *mousses* e vernizes com concentrações de fluoreto variando entre 9.000 a 56.000 ppm F^- .

Os vernizes a base de NaF foram desenvolvidos na Europa nos anos 60 com o objetivo de prolongar o tempo de contato entre o agente fluoretado e a superfície dentária, aumentando assim, a incorporação de fluoreto pelas camadas superficiais do esmalte (CLARK, 1982; PETERSSON; TWETMAN; PAKHOMOV, 1997). Além dessa vantagem, podem ser utilizados em áreas específicas, como lesões incipientes (tratamento de manchas brancas), superfícies radiculares e margens de restaurações, com segurança em relação à toxicidade e à aceitação pelo paciente (STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001; SEPPÄ, 2004). Há evidência científica suficiente para respaldar ao uso do verniz a base de NaF na clínica para prevenção e tratamento de lesões cáries iniciais (BELTRÁN-AGUILAR; GOLDSTEIN; LOCKWOOD, 2000; STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001; MARINHO et al., 2002; MARINHO et al., 2004; PETERSSON et al., 2004; SEPPÄ, 2004; CARVALHO et al., 2010).

Em relação aos tipos de agentes fluoretados, vários estudos *in vitro* têm mostrado que o tetrafluoreto de titânio (TiF_4), na forma de solução em uma concentração variando entre 1-4%, é mais eficaz que outros sais fluoretados (NaF , AmF , SnF_2) sobre o processo de des-remineralização do esmalte dentário, devido a uma possível ação adicional do titânio. Os íons titânio podem minimizar a desmineralização, uma vez que substituem o cálcio na apatita e mostram tendência a se complexarem com o grupo fosfato formando uma camada tipo “*glaze*” sobre a superfície (SHRESTHA; MUNDORFF; BIBBY, 1972; MUNDORFF; LITTLE; BIBBY, 1972; REED; BIBBY, 1976; WEI; SOBOROFF; WEFEL, 1976; WEFEL, 1982; TVEIT et al., 1983; BÜYÜKYILMAZ; OGAARD; RÖLLA, 1997; SKARTVEIT et al., 1991; TEZEL; ERGÜCÜ; ONAL, 2002; VAN RIJKOM et al., 2003; VIEIRA; RUBEN; HUYSMANS, 2005; CHEVITARESE et al., 2004; RIBEIRO; GIBSON; BARBOSA, 2006; EXTERKATE; TEN CATE, 2007; MAGALHÃES et al., 2008a; 2008b; WIEGAND; MAGALHÃES; ATTIN, 2010). Além disso, é sugerido que o titânio interage com a superfície dentária, devido ao baixo pH do agente, levando a um aumento na incorporação de fluoreto pelo esmalte (MUNDORFF; LITTLE; BIBBY, 1972; GU; LI; SÖREMARK, 1996).

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 pudesse interagir com o esmalte por mais tempo. Um estudo *in vitro* mostrou que o verniz de TiF_4 a 4% parece ter um efeito semelhante ou um pouco inferior aos outros vernizes fluoretados comerciais (NaF) na prevenção da desmineralização do esmalte dentário bovino, porém em contraste, apresentou um melhor efeito sobre a remineralização da lesão de cárie artificial em esmalte bovino (MAGALHÃES et al., 2008a). No entanto, até o momento não há estudos sobre o efeito deste verniz experimental sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dentário *in situ*.

O modelo *in situ* possibilita o estudo de aspectos fundamentais do processo de des-remineralização dentária, levando em conta os aspectos biológicos dos indivíduos, com vantagens de simular melhor a condição *in vivo* que os modelos *in vitro*, pela presença de placa dentária (*like* biofilme), e de não danificar os dentes dos voluntários (TEN CATE, 1994; ZERO, 1995; CLASEN; OGAARD, 1999).

Para a avaliação de lesões cariosas produzidas *in vitro* e *in situ*, vários métodos têm sido aplicados tais como microdureza, microradiografia e microscopia

de luz polarizada (ARENDS; LODDING; PETERSSON, 1980; WHITE, 1987; WHITE; FEATHERSTONE, 1987; ARENDS; TEN BOSCH, 1992; NELSON et al., 1992; TODD et al., 1999; SANTOS et al., 2009). Dentre estes métodos, a microradiografia transversal (TMR) fornece o valor do volume mineral, enquanto que a microdureza longitudinal reflete a resiliência mecânica do esmalte dentário. A microradiografia transversal é considerada padrão ouro para as análises de desmineralização dentária e possibilita detectar se a lesão é de superfície amolecida ou de subsuperfície (CLASEN; OGAARD, 1999), dados de importância para diferenciação entre tipos de lesão do esmalte.

Dados comparativos entre medições de TMR e microdureza longitudinal são escassos, mas têm mostrado alguma relação (FEATHERSTONE et al., 1983; KIELBASSA et al., 1999). No entanto, as equações utilizadas para converter microdureza em conteúdo mineral parecem diferir entre si dependendo do tipo de lesão e não há uma relação linear entre as duas análises. Isto indica que o cálculo de conteúdo mineral a partir dos valores de microdureza longitudinal pode não ser confiável (BUCHALLA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009a). Mediante aos dados encontrados na literatura, o ideal seria que tanto a TMR quanto a microdureza fossem utilizadas como métodos de análise do presente trabalho.

Com base no descrito acima, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um verniz experimental a base de TiF_4 comparando-o à solução correspondente e ao controle positivo, verniz de NaF e sua solução correspondente, na prevenção da desmineralização e na promoção da remineralização do esmalte dentário bovino *in situ*, utilizando como variáveis de resposta a microdureza de superfície, microdureza longitudinal e a microradiografia transversal.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vernizes fluoretados e a cárie dentária

A lesão cariosa é causada por desmineralização dos tecidos dentários por ácidos de origem bacteriana em pacientes que apresentam biofilme dentário e dieta rica em açúcar (TEN CATE et al., 2003). O principal ácido envolvido na cárie dentária é o ácido láctico, cujo pH é em torno de 5,0, o qual associado à dinâmica do biofilme em termos de concentração de fluoreto, cálcio e fosfato, pode gerar uma desmineralização clássica inicial do tipo subsuperficial (TEN CATE et al., 2003; KIDD; FEJERSKOV, 2004).

Dependendo do grau de desmineralização subsuperficial, a lesão pode se tornar visualmente detectável como uma mancha branca, que representa o primeiro sinal clínico inicial da cárie dentária (ZERO, 1999). Clinicamente, a lesão pode estar ativa, quando a superfície do esmalte se apresenta áspera e opaca, ou inativa, quando a superfície do esmalte se apresenta lisa e brilhante (ZERO, 1999). Devido à porosidade (KIDD, 2004), esta lesão inicial pode se tornar cavitada diante a desafios ácidos constantes. Daí a importância da intervenção precoce na prevenção das manchas brancas, bem como no tratamento das mesmas, de forma a tornar lesões ativas em inativas, com redução do risco de cavitação e da possibilidade de intervenções mais agressivas.

Além do controle dos fatores etiológicos envolvidos no aparecimento da cárie dentária (dieta e biofilme), o fluoreto tem sido utilizado como coadjuvante na redução do processo de desmineralização provocado pelos ácidos bacterianos bem como no aumento da remineralização quando os desafios ácidos cessam. A eficácia do uso de fluoretos para prevenção de cárie dentária tem sido muito bem documentada desde a década de 30 (TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991; TEN CATE, 2004; BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008).

Os fluoretos podem ser aplicados através de veículos que contenham baixa concentração ($<1.500 \text{ ppm F}^-$), como exemplo pode-se citar os dentifrícios fluoretados e enxaguatórios bucais que têm indicação para uso caseiro. O fluoreto também pode ser aplicado pelos profissionais através de veículos que contenham

alta concentração (de 9.000 a 56.000 ppm F⁻), como exemplo pode-se citar géis, *mousses* e vernizes (TEM CATE, 2004; BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008).

Os diferentes produtos fluoretados têm sido utilizados para a liberação de íons fluoreto para a superfície bem como para o interior da estrutura dentária, resultando em vários níveis de captação de fluoreto e de eficácia clínica. (PETERSSON, 1975; OGAARD; SEPPÄ; RÖLLA, 1994).

Fatores como concentração de fluoreto, frequência de aplicação e tempo de contato podem ter influência na eficácia do produto (BUZALAF; PESSAN; RAMIRES, 2008). O tempo de contato entre o fluoreto tópico e o esmalte é de extrema importância, pois a captação direta de fluoretos pela superfície dentária a partir da deposição de CaF₂ (flúor fracamente ligado), ou a adsorção ou incorporação deste íon à hidroxiapatita (flúor fortemente ligado), é relativamente proporcional ao tempo de contato entre o agente fluoretado e o tecido (MARGOLIS; MORENO, 1990; RØLLA; SAXEGAARD, 1990; RØLLA; OGAARD; CRUZ, 1993; OGAARD; SEPPÄ; RÖLLA, 1994).

Neste sentido, os vernizes foram inicialmente desenvolvidos e introduzidos na prática clínica em alguns países da Europa com o objetivo prolongar o tempo de contato entre o agente fluoretado e a superfície dentária, aumentando assim a incorporação de fluoreto nas camadas superficiais do dente (CLARK, 1982; PETERSSON; TWETMAN; PAKHOMOV, 1997).

Schmidt introduziu o primeiro verniz fluoretado, em 1964, sob o nome comercial de Duraphat[®] (Woelm Pharma Co, Eshwege, Alemanha). O verniz Duraphat[®] é uma resina natural, composta por uma base de colofônia neutra, contendo 5% em peso de NaF (2,26% F⁻) dissolvido em etanol (STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001).

Arends e Schuthof introduziram um segundo produto, em 1975, sob o nome comercial de Fluor Protector[®] (Vivadent; Schaan; Liechtenstein) (ARENDS; SCHUTHOF, 1975). Este produto é composto por uma resina transparente à base de poliuretano, contendo 1% de fluoreto de silano (0,1% F⁻) (STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001). Estudos mostram que as propriedades ácidas deste verniz fluoretado, como as do gel de flúor fosfato acidulado (FFA), aumentaram a captação de F⁻ pelo esmalte (DE BRUYN; ARENDS, 1987; ARENDS; CHRISTOFFERSEN, 1990).

Durante as três últimas décadas, o verniz fluoretado tem sido comumente utilizado para prevenção de cárie dentária (MOBERG SKÖLD et al., 2005). A vantagem do verniz fluoretado é o tempo de contato relativamente longo entre o produto e o dente. Isto resulta em uma liberação de fluoreto para a superfície dentária, que pode inibir a desmineralização e aumentar a remineralização (PETERSSON, 1993). O fluoreto, oriundo da interação verniz e estrutura dentária, é depositado principalmente como CaF_2 (fluoreto de cálcio), criando um reservatório de íons fluoreto que são lentamente liberados durante o processo de desmineralização, e incorporados à apatita durante a remineralização (TEN CATE, 1997).

Outra vantagem do verniz é que este veículo é seguro em termos de toxicidade, pois é utilizado em pequenas quantidades e o nível de fluoreto na urina é baixo após o seu uso, mostrando que é pouco absorvido no trato gastrointestinal (OLYMPIO et al., 2009). Além disso, é bem tolerado pelos pacientes e pode ser aplicado de maneira rápida e fácil (BAWDEN, 1998).

Muitos estudos indicam que os vernizes fluoretados podem reverter, bem como prevenir, o processo de desmineralização de lesões incipientes 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).

A seguir serão descritos os resultados obtidos com o uso do verniz à base de NaF para a prevenção/controle das lesões cáriesas bem como para o tratamento das lesões iniciais. Estes trabalhos foram divididos em estudos *in vitro/ animais*, *in situ*, clínicos e revisões sistemáticas. Na última parte da revisão bibliográfica, todos os artigos que fazem referência ao uso do TiF_4 , como alternativa ao NaF, na prevenção da desmineralização relacionada à cárie dentária foram inseridos.

A busca dos artigos foi realizada pelo site do pubmed utilizando como palavras-chaves: *topical fluorides, dental caries, fluoride varnishes, in vitro, in situ, in vivo, clinical trial, review, titanium, tooth remineralization*.

2.1.1 Estudos *in vitro/ animais*

Seppä (1988) realizou um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar a eficácia de um verniz de fluoreto de sódio (NaF) e de uma solução de NaF na remineralização do esmalte dentário. Para isso, o autor utilizou fatias de dentes

humanos não cariados que foram pré desmineralizados por 6 h em solução tampão contendo ácido láctico 0,1 M (pH 5,0). As amostras foram aleatoriamente divididas em 6 grupos: 1- controle (nenhum tratamento foi realizado), 2- aplicação de verniz Duraphat® - 2,26% F⁻ (Woelm, FRG) 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 (1 minuto) com solução de NaF 0,1% (0,045% F⁻). As amostras permaneceram imersas em saliva artificial (pH 7,0) durante 9 dias, exceto por 30 minutos diários em que foram expostas à solução tampão de ácido láctico 0,1 M (pH 5,0). A microdureza superficial do esmalte foi avaliada e 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 com vernizes, 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.

Um ano depois, Seppä, Forss e Sormunen (1989), com o objetivo de determinar se a redução da quantidade de fluoreto presente no verniz Duraphat® provocaria algum efeito na prevenção da cárie dentária, desenvolveram um estudo com animais. Ratos *Osborne-Mendel* foram desmamados aos 22-23 dias, inoculados com *Streptococcus sobrinus* e alimentados com dieta cariogênica por 40 dias. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento; os grupos experimentais receberam aplicações de Duraphat® contendo 2,26%, 1,1% ou 0,6% F⁻ ou um verniz placebo, nos dias 21 a 23. Como resultados, os autores observaram que lesões cariosas em fissura foram significativamente reduzidas pelos vernizes com 2,26% e 1,13% F⁻, enquanto o tratamento com verniz fluoretado na concentração 0,6% F⁻ não foi eficaz na prevenção das lesões cariosas.

Adriaens, Dermout e Verbeeck (1990) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de determinar se o verniz fluoretado Fluor Protector® (0,1% F⁻) aplicado em molares, anteriormente à bandagem ortodôntica, poderia prevenir a formação de lesões de mancha branca. Resumidamente, 93 pré-molares humanos foram seccionados ao meio, sendo que uma metade serviu como controle e a outra como teste. Todas as amostras foram armazenadas em solução desmineralizante a fim de

se induzir a formação de lesões artificiais de mancha branca. Após a avaliação dos resultados, foi concluído que o verniz fluoretado Fluor Protector® é altamente eficaz na prevenção de lesões de mancha branca artificiais formadas sob bandas ortodônticas.

Com o propósito de avaliar o potencial do verniz fluoretado Duraflor® em inibir diretamente a desmineralização do esmalte ao redor de brackets ortodônticos, Todd e colaboradores (1999) realizaram um estudo *in vitro* em que brackets foram colados, com resina composta tradicional, em 36 dentes caninos e pré-molares humanos extraídos. As amostras foram distribuídas entre os 3 grupos de tratamento: 1- controle (nenhuma aplicação tópica foi realizada após a colagem); 2- aplicação do verniz placebo (não fluoretado) e 3- aplicação do verniz fluoretado Duraflor® (NaF a 5%). Os vernizes foram aplicados sobre as superfícies das amostras e estas submetidas a ciclagens de pH, duas vezes ao dia, durante uma hora, em um período de 37 dias. Além disso, as amostras foram escovadas com uma escova dentária de cerdas média, para simular o desgaste mecânico do verniz. A desmineralização do esmalte foi avaliada através de microscopia de luz polarizada e os resultados mostraram que os dentes tratados com Duraflor® apresentaram uma desmineralização 50% menor que o controle e verniz placebo. De acordo com os autores, os vernizes fluoretados deveriam ser indicados para pacientes ortodônticos com alto risco à cárie dentária.

Para testar a hipótese de que vernizes fluoretados são eficazes em reduzir a desmineralização de lesões adjacentes a brackets ortodônticos (lesões de mancha branca), Demito e colaboradores (2004) realizaram um estudo *in vitro*, em que utilizaram dentes incisivos bovinos, nos quais brackets ortodônticos foram fixados com resina composta. Essas amostras foram divididas em dois grupos: experimental (tratamento com verniz fluoretado) e controle (sem tratamento). O verniz fluoretado Duraflor® (Pharmascience Inc.) foi aplicado nas amostras do grupo experimental no primeiro e no décimo quinto dia de experimento. As amostras dos dois grupos foram submetidas à desmineralização (pH 4,4; 1h) duas vezes ao dia, intercaladas por imersões em saliva artificial (pH 7,0; 6h), durante 35 dias. Ao final do experimento, a profundidade das lesões de mancha branca foi avaliada por imagens microscópicas de luz polarizada. Os resultados mostraram que as amostras que foram tratadas com verniz fluoretado apresentaram uma redução de

aproximadamente 38% nos valores de profundidade da lesão quando comparadas às amostras que não receberam tratamento.

Santos e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da aplicação de produtos fluoretados no desenvolvimento de lesões cariosas em esmalte de dentes decíduos. Dentes decíduos extraídos foram divididos entre os grupos de tratamento: 1- controle (tratamento com dentifrício sem flúor); 2- tratamento com gel fluoretado acidulado (1,23% F⁻, FFA, Dentsply); 3- tratamento com verniz fluoretado Duraflur[®] (2,26% F⁻, NaF, Dentsply); 4- verniz fluoretado Duraphat[®] (2,26% F⁻, NaF, Woelm & Pharma Co.); 5- verniz fluoretado Fluorniz[®] (2,26% F, 5% NaF, SS White); 6- verniz fluoretado Fluorphat[®] (2,26% F⁻, 5% NaF, Inodon); 7- verniz fluoretado Duoflurid[®] (2,71% F⁻, NaF, 6% CaF₂, FGM); 8- Cariestop[®] (12% diamino fluoreto de prata, Biodinâmica); 9- dentifrício fluoretado para crianças (500 ppm F⁻, Colgate-Palmolive). Os produtos testados foram aplicados nas amostras de acordo com as recomendações de cada fabricante, e logo após 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. Após o experimento, a profundidade da lesão cariada das amostras foi analisada através de microscopia de luz polarizada, e mediante aos resultados obtidos, 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 as lesões cariosas artificiais. O melhor efeito cariostático foi atingido pelo verniz fluoretado Duraphat[®] e o mais baixo, pelo dentifrício fluoretado.

De uma forma geral, os estudos *in vitro* têm mostrado que o verniz fluoretado, em especial o Duraphat[®], é capaz de reduzir a desmineralização e profundidade da lesão de amostras de esmalte bovino e humano, hígidas ou previamente desmineralizadas, em comparação ao controle e a outros produtos fluoretados.

2.1.2 Estudos *in situ*

Um estudo *in situ* foi realizado por Attin e colaboradores (2005a) com o propósito de avaliar a retenção de fluoreto em esmalte sadio e desmineralizado, após a aplicação de um novo verniz fluoretado a base de água (Mirafluorid[®], 0,12% F⁻) comparado a um verniz fluoretado a base de resina (Duraphat[®], 2,26% F⁻). Foram

utilizadas 300 amostras de esmalte bovino, sendo que em metade delas (150) foi produzida lesão artificial de cárie (gel ácido; pH 4,8; 72h), a outra metade (150) foi mantida hígida. Os espécimes foram igualmente alocados nos grupos: A- tratamento com Mirafluorid®; B- tratamento com Duraphat® e C- controle. Os vernizes foram aplicados nas amostras sadias e desmineralizadas e logo após, 3 amostras de cada tipo de esmalte, foram fixadas em um aparelho intra-oral mandibular. Dez voluntários utilizaram o respectivo aparelho durante 5 dias, em 3 fases diferentes (A-C). Durante o experimento, os espécimes foram escovados duas vezes ao dia com dentifrício fluoretado (Elmex®), sendo que os aparelhos foram removidos da boca apenas para as refeições. A captação de fluoreto fracamente e fortemente ligado foi avaliada, e mediante aos resultados obtidos, os autores concluíram que o novo verniz fluoretado a base de água depositou menos fluoreto fracamente e fortemente ligado, tanto no esmalte hígido como no esmalte desmineralizado, comparado ao verniz Duraphat® *in situ*.

Attin e colaboradores (2007) desenvolveram um estudo *in situ* com o objetivo de determinar a captação de fluoreto em esmalte desmineralizado, após aplicação de vernizes fluoretados, em amostras de esmalte localizadas a várias distâncias da amostra tratada. Todas as amostras de esmalte foram pré desmineralizadas (gel ácido; pH 4,8; 3 dias) e dez voluntários utilizaram aparelhos intra-orais mandibulares em 3 diferentes fases de 6 dias cada: 1- tratamento com Mirafluorid® 0,12% F⁻ (Hager & Werken); 2- Duraphat® 2,26% F⁻ (Colgate-Palmolive) e 3- controle (não fluoretado). Os aparelhos intra-orais foram constituídos de uma amostra controle e uma amostra tratada de acordo com sua fase. Nas fases 1 e 2, 0,1 g de Mirafluorid® e Duraphat®, respectivamente, foi aplicado no centro da amostra de esmalte e na fase 3, as respectivas amostras não foram tratadas, servindo como controle. Adicionalmente às amostras tratadas, 3 amostras foram colocadas nos aparelhos em 3 sítios diferentes: a- próximo; b- 1 cm; c- lado oposto, em relação à amostra tratada. Nestes sítios citados acima, novas amostras de esmalte não tratadas foram colocadas no primeiro, terceiro e quinto dia de cada fase, e permaneceram no aparelho por um dia. Após a aplicação dos vernizes, os aparelhos foram imediatamente inseridos na cavidade oral. Durante o experimento, os voluntários escovavam os dentes e as amostras, com dentifrício fluoretado (0,125% F⁻, AmF) 2 vezes ao dia, para simular a prática comum do uso de dentifrícios fluoretados. A captação de fluoreto fracamente ligado foi avaliada e

observou-se que apenas ocorreu incorporação de fluoreto (liberado pelo verniz Duraphat[®] testado) nas amostras desmineralizadas localizadas próximas às amostras centrais tratadas. Portanto, os autores concluíram que, para uma situação clínica, todas as superfícies dentárias que necessitam de tratamento com fluoreto devem ser diretamente tratadas com o verniz, pois o fluoreto liberado de um dente não é capaz de ser incorporado a outro.

Mais recentemente, Lee e colaboradores (2010) realizaram um estudo *in situ* com o objetivo de comparar os efeitos de 3 tratamentos fluoretados tópicos na microdureza de superfície, captação de flúor e área de lesão fluorescente do esmalte dentário. Dentes bovinos foram inicialmente desmineralizados através de uma solução contendo 0,2% de carbopol e 0,1 mol/L de ácido láctico (pH 5,0, 71h) e submetidos a um dos seguintes tratamentos: 1- controle (nenhum tratamento foi realizado); 2- iontoforese utilizando solução de fluoreto de sódio a 2%; 3- aplicação de gel de flúor fosfato acidulado (1,23% F⁻); 4- aplicação de verniz de fluoreto de sódio 5% Cavity Shield (3M Espe Co.) (12h). As aplicações tópicas foram realizadas nas amostras de acordo com seu respectivo grupo: 2- as amostras foram tratadas através de iontoforese a 200 µA, com solução de NaF 2% durante 4 minutos; 3- o gel de FFA foi aplicado cuidadosamente sobre a superfície do esmalte até formar uma camada de aproximadamente 2mm de espessura e após 4 minutos o gel foi removido com auxílio de papel absorvente; 4- o verniz foi aplicado sobre o esmalte até formar uma camada de 2mm de espessura e após 1 minuto de secagem do verniz, as amostras foram armazenadas em água destilada a 4°C. Após 12h, os vernizes foram removidos com auxílio de uma lâmina. 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 utilizaram este dispositivo intra-oral, durante 4 semanas continuamente, retirando-o apenas para comer, escovar os dentes e dormir. Os resultados não revelaram diferença estatística entre os tratamentos em relação à microdureza de superfície. No entanto, o gel de FFA mostrou melhores efeitos em relação à captação de F⁻ e uma diminuição na área de fluorescência da lesão, os quais não diferiram significativamente do verniz fluoretado.

Há poucos estudos *in situ* sobre o uso do verniz fluoretado 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

Petersson (1976) avaliou a incorporação de fluoreto pelo esmalte dentário após várias formas de aplicação tópica de F^- , como solução de NaF a 2%, SnF_2 a 8%, Na_2PO_3F a 5%, gel FFA a 2% e verniz Duraphat® (NaF a 5%). Gradientes de fluoreto do esmalte hígido de dentes humanos homólogos foram avaliados em diferentes profundidades através de um processo de biopsia. Observou-se que a captação mais alta de fluoreto ocorreu para o tratamento com Duraphat®, porém esta captação foi baixa e limitada à camada superficial do esmalte.

Holm (1979) testou o efeito preventivo de aplicações semi-anuais do verniz Duraphat® durante um período de 2 anos para prevenção de cárie na dentição decídua. Os tratamentos foram realizados em 112 crianças de 3 anos de idade (67 meninas/ 45 meninos) e 113 crianças serviram como controle. Ao final do estudo, foi observada uma redução de 44% na incidência da cárie dentária no grupo de crianças que receberam tratamento em relação às crianças do grupo controle.

O primeiro estudo clínico que comparou Duraphat® e Fluor Protector® foi realizado por Seppä, Tuutti e Luoma (1982) em crianças de 11 a 13 anos de idade com alta atividade de cárie, residentes em uma região com água de abastecimento fluoretada. Foram realizadas aplicações semi-anuais dos vernizes através da técnica da boca dividida (metade da arcada tratada e a outra metade sem tratamento), e após 3 anos de estudo, foi observado que o tratamento com verniz Duraphat® apresentou uma redução em 30% na incidência de lesões cariosas, enquanto que para o verniz Fluor Protector®, essa redução foi de apenas 10% (índice CPOS-superfícies cariadas, perdidas e obturadas).

No mesmo ano Seppä, Luoma e Hausen (1982) compararam a concentração de fluoreto permanentemente ligado em dentes tratados com cinco aplicações semi-anuais de Duraphat® e Fluor Protector®. Para isso, foram selecionadas crianças de 11 a 13 anos com alta prevalência à cárie, residentes em uma comunidade com fluoretação da água de abastecimento. A biopsia do esmalte foi realizada após o tratamento. Apesar dos resultados do estudo anterior, os

sujeitos que foram tratados com Fluor Protector[®] apresentaram uma maior concentração de fluoreto no esmalte em comparação ao grupo Duraphat[®].

Um ano mais tarde Seppä e colaboradores (1983) estudaram, em crianças de 11 a 13 anos de idade, o efeito de aplicações de Duraphat[®] na progressão de lesões de cárie inicial. Crianças que apresentaram elevado índice CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados) foram selecionadas pelo sistema de saúde pública. Essas crianças, portanto, apresentavam alto risco à cárie e residiam em local com exposição à fluoretação da água de abastecimento. O verniz foi aplicado semi-anualmente utilizando-se a técnica da boca dividida. Lesões iniciais encontradas antes da primeira aplicação (regressão, progressão ou não) e aquelas encontradas durante o estudo (novas lesões) foram observadas separadamente. Após 3 anos, os resultados mostraram que o tratamento apresentou um pequeno efeito na progressão das lesões cariosas iniciais presentes anteriormente à primeira aplicação do verniz fluoretado, e que a incidência das lesões durante o estudo foi inibida mais distintamente pelo tratamento.

Petersson e colaboradores (1991) desenvolveram um ensaio clínico controlado durante 3 anos, em que avaliaram o efeito de aplicações intensivas de Duraphat[®], na prevenção de cáries proximais, comparadas a uma aplicação de rotina a cada 6 meses. Para isso, 154 crianças de 11 anos de idade foram distribuídas em dois grupos de tratamento: 1- tratamento bianual mais 3 aplicações de verniz Duraphat[®] (2,26% F⁻), em intervalos de 2 dias por semana (procedimento repetido anualmente) e 2- tratamento com uma aplicação de Duraphat[®], em intervalos de 6 meses, duas vezes ao ano. Para cada criança, um conjunto de 4 radiografias interproximais foi realizado no início e anualmente, durante os 3 anos de estudo, com o objetivo de avaliar a incidência e progressão de cáries proximais. O grupo 1 (tratamento intensivo com verniz Duraphat[®]) apresentou redução na progressão e desenvolvimento de cáries proximais, enquanto no grupo 2 (tratamento de rotina com verniz Duraphat[®]), houve um aumento na incidência de cárie dentária, durante o período experimental.

Com o objetivo de comparar o efeito preventivo de um verniz de fluoreto de sódio e um gel de flúor fosfato acidulado na prevenção de cárie dentária, Seppä, Leppänen e Hausen (1995) desenvolveram um estudo clínico com 254 crianças de 12 a 13 anos de idade que apresentaram histórico de alta atividade cariosa. As crianças foram divididas em 2 grupos: 1- tratamento com aplicações de verniz de

fluoreto de sódio (Duraphat®; 2,26% F⁻) e 2- tratamento com aplicações de gel de fluoreto fosfato acidulado (Nupro®; 1,23% F⁻; 4 min). Todas as aplicações foram realizadas semi-anualmente, durante 3 anos. Através do método de análise CPOS (superfícies cariadas, perdidas e obturadas), os resultados foram avaliados e os autores concluíram que o verniz fluoretado é tão efetivo quanto o gel, na prevenção de cáries proximais.

Autio-Gold e Courts (2001) avaliaram em um estudo clínico o efeito de um verniz fluoretado na progressão de lesões cariosas em esmalte da dentição decídua. Para isso, foram selecionadas crianças de 3-5 anos de idade divididas entre o grupo verniz e controle. As crianças do grupo verniz receberam tratamento com Duraphat® (Colgate-Palmolive) no início do estudo e após 4 meses, e as crianças do grupo controle não receberam aplicações profissionais de fluoreto. Após 9 meses, 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, 81,2% das lesões ativas tornaram-se inativas, 2,4% progrediram e 8,2% não apresentaram mudanças. Segundo os autores, 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.

Para testar se um tratamento intensivo com verniz de fluoreto de sódio 5% (três aplicações/2 semanas) pode ter um impacto diferente que uma aplicação bianual, na progressão de lesões cariosas na dentição decídua, Weinstein, Spiekerman e Milgrom (2009) selecionaram crianças hispânicas de 3 a 4 anos de idade, residentes em Washington-EUA, e as distribuíram em dois grupos de tratamento: Intensivo e Padrão. Todos os participantes (600) receberam aplicações de verniz fluoretado (Cavity Shield, NaF 5%, Omni Oral Pharmaveuticals) ou placebo (verniz similar ao ativo, porém sem F⁻), semi-anualmente, 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 2 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 os grupos.

Em geral os estudos clínicos mostram evidência de que a aplicação bianual de verniz fluoretado é efetiva em reduzir a incidência de lesões cariosas em pacientes de alto risco à cárie dentária em comparação ao controle. O verniz NaF parece ter a mesma eficácia que o gel FFA e não há evidência se o aumento da frequência de aplicação do verniz poderia potencializar o seu efeito na clínica, diferentemente dos estudos *in vitro* que apontaram para um efeito aditivo com o aumento da frequência de aplicação.

2.1.4 Revisões de Literatura e Revisões Sistemáticas

Beltrán-Aguilar, Goldstein e Lockwood (2000) revisaram e resumiram estudos *in vitro* e *in vivo*, ensaios clínicos, programas demonstrativos e editoriais publicados em inglês na literatura biomédica desde 1966, a respeito do uso clínico, mecanismo cariostático, eficácia, segurança e toxicidade dos vernizes fluoretados. Os autores observaram que ensaios clínicos e extensivas pesquisas laboratoriais, conduzidos na Europa e em qualquer outro lugar, mostraram que vernizes fluoretados são tão eficazes quanto aos outros agentes fluoretados em relação à prevenção da cárie dentária, e são largamente utilizados na Europa com esse objetivo. A “Administração de Drogas e Comidas dos Estados Unidos” (*U.S. Food and Drug Administration*) apenas autorizou a utilização desses produtos para forramento de cavidades e hiperestesia dentinária nos EUA. Os autores afirmaram no estudo que os vernizes fluoretados ainda não haviam sido autorizados a serem comercializados nos Estados Unidos como agentes de prevenção a cárie dentária, 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. Como conclusão em relação às implicações clínicas da utilização dos vernizes fluoretados, os autores afirmaram que os vernizes são seguros e de fácil aplicação e que endurecem em contato com a saliva.

Strohmenger e Brambilla (2001) realizaram uma avaliação de resultados disponíveis *in vitro*, em estudos com animais e em estudos clínicos a respeito da eficácia de vernizes fluoretados na prevenção da cárie dentária. Os autores observaram que a eficácia do verniz fluoretado na prevenção da cárie é claramente demonstrada em muitos estudos experimentais, e que ensaios clínicos mostraram

uma variação entre 18% a 70% de redução na incidência de cárie. Os autores puderam concluir que os dados disponíveis na literatura sugerem que os vernizes fluoretados são ferramentas úteis para a prevenção da cárie dentária, e que quando aplicados regularmente, demonstraram boas propriedades preventivas.

Com o objetivo de determinar a eficácia e a segurança de vernizes fluoretados na prevenção de lesões cariosas em crianças e de examinar fatores potencialmente modificadores deste efeito, Marinho e colaboradores (2002) analisaram dados presentes na literatura e selecionaram ensaios clínicos aleatorizados, cegos, em que se comparou verniz fluoretado ao verniz placebo, ou controle (sem tratamento), em crianças acima de 16 anos, com acompanhamento de pelo menos um ano. Após a avaliação da literatura, nove estudos foram incluídos, envolvendo 2.709 crianças, sendo que destes, sete estudos contribuíram com os principais dados para as análises realizadas nesta revisão. Os estudos selecionados mostraram uma estimativa de aproximadamente 46% de redução na incidência de lesões cariosas, através da avaliação do índice CPOS (superfícies cariadas, perdidas e obturadas). Os resultados mostraram que houve um efeito preventivo significativo do verniz fluoretado sobre a dentição permanente. Os autores afirmaram que havia pouca informação disponível em relação à aceitabilidade ao tratamento e possíveis efeitos colaterais durante os ensaios clínicos estudados, e sugeriram que mais estudos de melhor qualidade fossem realizados.

Um ano depois, os mesmos autores realizaram uma nova revisão de literatura com o objetivo de comparar a efetividade das formas de aplicação tópica de fluoretos, quando utilizadas para prevenção de cárie dentária em crianças (MARINHO et al., 2004). O critério de seleção utilizado novamente foi de ensaios clínicos aleatorizados e cegos em crianças acima de 16 anos, com duração de pelo menos um ano, em que foram comparados vernizes, géis, enxaguatórios e dentifrícios fluoretados. O método de análise empregado foi o índice CPOS e dados de quinze estudos contribuíram para as avaliações. 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. Não houve nenhuma sugestão clara de que os vernizes fluoretados são mais

efetivos que os enxaguatórios e foram inconclusivas as evidências em relação à diferença de efetividade dos vernizes e géis, e de enxaguatórios e géis, quando comparados entre si.

Petersson e colaboradores (2004) avaliaram o efeito de tratamentos profissionais com vernizes fluoretados na prevenção da cárie dentária, através de uma revisão sistemática 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 (sem tratamento) ou a outro produto fluoretado, com duração de pelo menos dois anos. O método de análise utilizado foi de fração preventiva expressa em porcentagem. Os resultados mostraram evidências limitadas em relação ao efeito preventivo de aplicações tópicas de vernizes fluoretados, em dentes permanentes, na prevenção da cárie dentária em crianças e adolescentes (30%). Evidências inconclusivas foram encontradas em relação ao tratamento com verniz fluoretado em dentes decíduos e em adultos. Os autores reforçaram a necessidade de mais estudos clínicos de alta qualidade, nos quais devem ser incorporados conceitos clínicos mais modernos.

Seppä (2004) mostrou em uma revisão sistemática a respeito de vernizes fluoretados na prevenção da cárie, que o verniz Duraphat[®] é o agente fluoretado de aplicação tópica profissional mais extensamente utilizado na Europa e que o uso de vernizes fluoretados está crescendo nos Estados Unidos da América. Além disso, o verniz Duraphat[®] tem se mostrado efetivo por mais de três décadas, mas os resultados a respeito do verniz Fluor Protector[®] são escassos. Estudos, que compararam Duraphat[®] e gel de FFA, mostraram que o verniz fluoretado é igualmente ou mais efetivo que este gel. Além disso, a aplicação de vernizes é fácil e segura. Nenhuma toxicidade aguda foi reportada após o uso de qualquer verniz fluoretado.

Mais recentemente, Carvalho e colaboradores (2010) realizaram uma revisão sistemática 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. Ensaios clínicos que avaliaram o desenvolvimento de lesões cariosas cavitadas em crianças acima de 6 anos de idade, foram pesquisados em banco de dados de revistas eletrônicas (BBO, LILACS, MEDLINE e Cochrane). Foram encontrados 513 artigos, porém, apenas 8 preencheram os critérios de inclusão dos autores, que afirmaram que a maioria dos

estudos apresentaram qualidade metodológica pobre. Mediante aos dados encontrados, os autores concluíram que o verniz fluoretado pode ser efetivo para diminuir a incidência de cárie dentária em pré-escolares, porém, ensaios clínicos com metodologia mais padronizada seriam necessários para fornecer evidências mais conclusivas.

Com base nas revisões sistemáticas, sugere-se que o tratamento profissional com verniz fluoretado tenha efeito preventivo sobre a cárie dentária (em torno de 30% de redução da incidência). Entretanto, mediante aos dados encontrados, pode-se observar que boa parte dos ensaios clínicos realizados até o presente momento apresentou metodologias de baixa qualidade, o que impossibilitou resultados mais claros e conclusivos. Frente a isso, novas pesquisas clínicas com metodologias mais padronizadas devem ser realizadas para uma apuração de evidências mais conclusivas 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 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 HUYSEN, 1947; MANLY; BIBBY, 1949).

Shrestha, Mundorff e Bibby (1972) realizaram o primeiro estudo *in vitro* que deu origem aos estudos posteriores a respeito do efeito do tetrafluoreto de titânio (TiF₄) no esmalte dentário como agente preventivo para a cárie e erosão dentárias. Nesse estudo os autores compararam 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), 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 com esmalte de unha restando apenas uma “janela” exposta em sua superfície, com o objetivo de avaliar a quantidade de fosfato dissolvida em 20 ml solução tampão de ácido acético 0,01M (pH 4,0), após os tratamentos. Os tratamentos foram realizados através de uma aplicação de soluções

contendo 100ppm dos elementos citados acima, durante 15 minutos, sendo que o pH de cada solução não foi ajustado. Como resultados, 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 repetida do esmalte.

Estes resultados culminaram com a realização de estudos adicionais para entender o mecanismo de ação dos tetrafluoretos com especial ênfase ao TiF_4 . Mundorff, Little e Bibby (1972) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de investigar por quais mecanismos o TiF_4 reduzia a solubilidade do esmalte. Os autores concluíram que o TiF_4 pode reagir com o esmalte dentário através de duas maneiras distintas: quimicamente, o agente diminuiria a solubilidade do esmalte e aumentaria o conteúdo de fluoreto; e fisicamente, promoveria a formação de uma camada protetora do tipo “*glaze*”, na superfície do esmalte, formada por óxido de titânio ou fosfato de titânio (YU et al., 2010). Portanto os autores sugeriram a possibilidade de realização de testes clínicos para avaliação dos efeitos do TiF_4 na cárie dentária.

Reed e Bibby (1976) realizaram um estudo clínico em que observaram que a aplicação anual de uma solução de TiF_4 1% (0,61% F^-), por um minuto em dentes de um lado da boca de 110 crianças de 11 a 13 anos de idade, oferecia melhor proteção contra o aparecimento de lesões cariosas, após 3 anos, em comparação a proteção dada para o outro lado da boca, a qual foi tratada com uma aplicação de quatro minutos de solução FFA (1,25% F^-). Como controle, sessenta crianças não receberam tratamento. Observou-se que 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.

Wei, Soboroff e Wefel (1976) constataram, através de biópsia por ataque ácido, que espécimes de esmalte humano tratados com solução de TiF_4 (1,23% F^- , pH 1,3, 4 min) mostraram uma incorporação de fluoreto significativamente maior quando comparados aos espécimes não tratados, porém menor quando comparados aos espécimes tratados com solução de flúor fosfato acidulado (FFA, 1,23% F^- , pH 3,0, 4 min), ambos com concentração similar de fluoreto, contrapondo o efeito clínico visto no trabalho anterior.

Wefel (1982) comparou *in vitro* aplicações tópicas de soluções de FFA (1,23% e 1% F⁻) e TiF₄ (1,23% e 1% F⁻) em relação à captação de fluoreto pelo esmalte, penetração e formação da lesão de cárie artificial. Molares humanos extraídos foram imersos em 2 ml de solução (FFA ou TiF₄), durante 4 minutos, de acordo com os grupos de comparação: A- FFA e TiF₄ 1,23% F⁻; B- FFA e TiF₄ 1% F⁻; C- FFA 1,23% F⁻ e TiF₄ 1% F⁻ e D- FFA 1,23% F⁻ e TiF₄ 1% F⁻, sendo esta última solução aplicada por 1 minuto. O último grupo de comparação (D) foi escolhido baseado em um ensaio clínico (REED; BIBBY, 1976). Após o tempo de aplicação, as amostras foram lavadas por 24h em água corrente destilada e então, armazenadas em saliva artificial (1mM Ca, 3mM P, 20mM NaHCO₃; pH 7,0; 24h). Para a avaliação da concentração de F⁻ aderido, foram realizadas sucessivas exposições das amostras a HClO₄, e as soluções foram analisadas em um eletrodo íon- específico, e então essas concentrações foram calculadas em relação à profundidade, obtendo-se um perfil de captação de F⁻ por profundidade. Para a análise da formação das lesões, foram realizadas avaliações histológicas de secções do esmalte, comparando-se a profundidade do corpo da lesão e a formação da zona de superfície. O autor observou maiores concentrações de fluoreto nas amostras tratadas com FFA, porém este sal fluoretado não preveniu tão bem a formação de lesão cariosa quanto o TiF₄. Concluiu-se que o mecanismo de ação do TiF₄ em prevenir lesões iniciais de esmalte parece não estar envolvido com a concentração de fluoreto incorporado ao esmalte, mas à formação de uma camada superficial protetora que não foi facilmente removida pelos desafios.

Com o propósito de avaliar o efeito do TiF₄ em prevenir cárie dentária, Skartveit e colaboradores (1991) desenvolveram um estudo com ratos, em que compararam TiF₄, em soluções equimolares de F⁻, ao NaF neutro e acidificado. Ratos *Sprague-Dawley* foram desmamados 19 dias após o nascimento, submetidos a uma dieta cariogênica e divididos nos seguintes grupos: 1- tratamento com solução TiF₄ 1% (pH 1,5); 2- solução NaF 1,3% (pH 7,0); 3- solução NaF 1,3% (pH 1,5) e 4- controle (água destilada). As soluções foram aplicadas durante 1 minuto, no dente molar, no primeiro e no décimo sétimo dia de experimento. A partir do segundo dia, os ratos foram inoculados com *Streptococcus mutans* duas vezes por semana. Os resultados mostraram que houve redução na incidência de lesões cariosas para todos os grupos de tratamento, após 35 dias de experimento, porém não houve diferença estatisticamente significativa quando os grupos foram

comparados entre si. Os autores concluíram que o efeito do TiF_4 foi pelo menos tão bom quanto ao do NaF na prevenção da cárie dentária.

Segundo Chevitarese e colaboradores (2004) a aplicação de TiF_4 provoca a formação de uma camada rica em titânio na superfície do esmalte, reduzindo a sua solubilidade na presença de um desafio cariogênico. Com o objetivo de avaliar a presença dessa camada superficial e a penetração de titânio para o interior do esmalte humano hígido e cariado após aplicação de TiF_4 , os autores realizaram um estudo *in vitro* em que terceiros molares não irrompidos foram seccionados em seu sentido méso-distal, e divididos em dois grupos: A- hígido e B- artificialmente cariado. Após uma aplicação de solução de TiF_4 a 4% (pH 1,0; 1 min), as amostras foram longitudinalmente seccionadas para a avaliação da incorporação de titânio, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de energia dispersiva. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à penetração de titânio, porém no grupo A (esmalte hígido), o titânio penetrou mais profundamente do que no grupo B (esmalte artificialmente cariado).

Exterkate e Ten Cate (2007) realizaram um estudo *in vitro* em um modelo de ciclagem de pH com o objetivo de testar o potencial de um novo derivado de tetrafluoreto de titânio na prevenção da cárie dentária. Os autores compararam tratamentos diários com soluções de TiF (100, 250 e 500 ppm F, pH 3,0) em relação ao tratamento com NaF, com concentrações de fluoreto e pH similares. Amostras de esmalte bovino foram pré desmineralizadas (sistema ácido láctico/ metilcelulose; pH 4,6; 1 semana) e logo após, submetidas à ciclagem de pH (14-21 dias). Os autores avaliaram três modelos 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 um sistema de ciclagem de pH (0,5h desmineralização, pH 4,8/ 2,5h remineralização, 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 um sistema de ciclagem de pH (0,5h desmineralização, pH 4,8/ 2,5h remineralização, pH 7,0) seguidos de um período de 6 horas de remineralização; e 3- amostras hígdas foram 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) e posteriormente imersas em 3 ml de solução remineralizante por 24h.

Na seqüência, as amostras foram submetidas a uma desmineralização contínua (5 ml solução; pH 4,6 ou 4,4) durante 14 dias. Os resultados mostraram que os tratamentos com NaF reduziram a perda de cálcio, aumentaram a sua captação e induziram a remineralização de todas as lesões. Já os tratamentos com derivado de TiF gradualmente causaram quase a completa inibição da perda de cálcio, independentemente da concentração do derivado de TiF. Os autores concluíram que o derivado de TiF é um agente promissor na prevenção e controle da cárie dentária.

Segundo Magalhães e colaboradores (2008a) o NaF é o composto fluoretado presente na maioria dos vernizes comercialmente disponíveis e segundo os mesmos autores, ainda não havia na literatura nenhum estudo em que tivesse sido testado o uso do agente TiF_4 incorporado a um verniz, para a prevenção e tratamento de lesões iniciais de cárie. Portanto, Magalhães e colaboradores (2008a) desenvolveram o primeiro estudo *in vitro* em que um verniz de TiF_4 4% foi avaliado em relação à desmineralização e remineralização do esmalte hígido e do esmalte com lesão artificial de cárie, respectivamente, a partir da análise da microdureza superficial e longitudinal. Para isso, foram utilizados blocos de esmalte bovino que foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos de tratamento: D- Duraphat® (NaF ; 2,26% F^- ; pH 4,5; Colgate); F- Duofluorid® (6% NaF, 2,71% F^- ; 6% CaF_2 , 2,92% F^- ; pH 8,0; FGM); T- TiF_4 4% (2,45% F^- ; pH 1,0; FGM) e P- placebo (verniz sem flúor). Para a formação das lesões artificiais de cárie, metade dos blocos foi imerso em solução de tampão acetato (16h) e a outra metade dos blocos foi mantida hígida. Os vernizes foram aplicados na superfície dos blocos de esmalte nos quais permaneceram por 6 horas. As amostras foram submetidas a uma ciclagem de pH (6h desmineralização/ 18h remineralização) durante 7 dias. De acordo com os resultados encontrados, os autores puderam concluir que o verniz de TiF_4 foi capaz de diminuir a desmineralização e aumentar a remineralização do esmalte. O verniz em questão foi igualmente efetivo quando comparado ao verniz de NaF na redução da desmineralização da subsuperfície, mas foi mais efetivo no aumento da remineralização da superfície e subsuperfície.

Wiegand, Magalhães e Attin (2010) realizaram uma revisão de literatura a respeito dos efeitos do TiF_4 na progressão e desenvolvimento de lesões cariosas e erosivas. Os autores afirmam que o modo de ação do TiF_4 está relacionado com a formação de uma camada superficial estável e ácido-resistente que fornece 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 de esmalte e dentina, assim, foi igualmente ou mais efetivo do que outros agentes fluoretados (NaF , AmF ou SnF_2). Os autores concluíram que os resultados de estudos *in vitro* e *in situ*, disponíveis na literatura, sugerem que o TiF_4 é um agente efetivo para prevenção de cárie e erosão dentárias. 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 que vêm sendo encontrados para lesões artificiais.

Com base nesta revisão da literatura pode-se observar que em relação ao verniz a base de NaF há evidência científica da sua eficácia na prevenção das lesões cariosas bem como no tratamento das lesões iniciais. A evidência científica é oriunda de estudos *in vitro*, *in situ* e especialmente, os clínicos. Várias revisões sistemáticas foram publicadas a este respeito 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 à cárie dentária. Em relação ao TiF_4 , há poucos estudos, sendo estes basicamente laboratoriais, os quais têm mostrado um bom efeito deste sal fluoretado na prevenção da desmineralização do esmalte, inclusive superior ao efeito do FFA e NaF . No caso específico do verniz de TiF_4 , há somente um estudo *in vitro* com resultados promissores na prevenção e tratamento de lesões cariosas artificiais em esmalte pela aplicação do TiF_4 em comparação ao NaF , dando suporte para a hipótese do presente trabalho. A realização de um estudo *in situ*, que pode mais apropriadamente simular as condições clínicas, é de suma importância, pois poderá gerar resultados científicos e tecnológicos de grande aplicabilidade nas diferentes especialidades da Odontologia, como Odontologia Preventiva e Saúde coletiva, Odontopediatria, Dentística, e Ortodontia.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar do efeito da aplicação tópica de um verniz e solução experimental de TiF_4 , comparando-os ao verniz e solução de NaF , sobre o processo de des-remineralização do esmalte dentário *in situ*.

Foram testadas as seguintes hipóteses nulas:

- Não há diferença significativa na redução da desmineralização do esmalte dentário bovino *in situ* entre os quatro agentes fluoretados (com ênfase no efeito do verniz experimental de TiF_4), para cada variável de resposta separadamente.
 - Não há diferença significativa no aumento da remineralização do esmalte dentário bovino *in situ* entre os quatro agentes fluoretados (com ênfase no efeito do verniz experimental de TiF_4), para cada variável de resposta separadamente.
-
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos dentes e preparo das amostras

Para o presente estudo, foram utilizados dentes incisivos bovinos permanentes recentemente extraídos, livres de cárie, que foram desinfetados e mantidos em solução tamponada de formol 2%, em pH 7,0 sob temperatura ambiente, por no mínimo 30 dias, e submetidos à análise visual, para a averiguação de possíveis manchas e trincas, situação na qual foram excluídos da amostra.

A limpeza dos dentes selecionados foi realizada com o auxílio de uma cureta periodontal (DUFLEX. Ind. Bras.), removendo todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície, com o intuito de prepará-los para o corte. Primeiramente foram removidas as raízes, com o auxílio de um torno de polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni/ Série 16223, Tipo: TG1/3, São Paulo, SP) e um disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes.

Na seqüência, as coroas foram fixadas com godiva (Kerr) em uma placa de acrílico (40x40x5 mm³). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) (Figura 1) e com dois discos diamantados de dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 x 0,3 x 12,7 mm³ (Extec Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205, Figura 2) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os eles, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada, foram obtidos blocos de esmalte de 4 x 4 mm da porção mais plana da coroa, através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido mésio-distal (Figura 3).

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figuras 1 a 3 – Seqüência de corte dos blocos de esmalte bovino. Figura 1 – Máquina de corte. Figura 2 – Dente bovino sendo cortado. Figura 3 – Obtenção de bloco de esmalte (4x4mm).

Após o corte, os blocos foram submetidos a um polimento e para isso, foram fixados com cera de incrustação (Kota) com o auxílio de um instrumento de PKT (Duflex Ind. Bras.) e uma lamparina (JON, Ind. Bras.) no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura), inicialmente com a face de esmalte colada em contato com o disco, com o intuito de realizar a planificação da dentina (Figura 4). O conjunto (disco/dente) foi adaptado a uma Politriz Metalográfica (Arotec, Figura 5) para realizar a planificação da dentina, permitindo o paralelismo entre as superfícies polidas e a base de acrílico em que foram fixados os espécimes. Para tal, foi utilizada uma lixa de carbeto de silício de granulação 320 (Extec Corp.), sob refrigeração com água deionizada, até que os blocos ficassem com espessura de aproximadamente 3 mm (Figura 4). Para tanto, a politriz foi acionada em baixa velocidade, entre 30 s e 1 min, até os blocos alcançarem a espessura desejada.

Em seguida, os blocos de esmalte foram removidos do disco de acrílico, sendo estes últimos limpos com xilol (MERCK, Darmstadt-Germany), para que fosse retirado todo o resíduo de cera aderido a eles. Posteriormente, os blocos de esmalte foram novamente fixados no disco de acrílico, agora com a face de esmalte exposta, para que o polimento fosse realizado, objetivando a obtenção de uma superfície absolutamente plana, paralela à base e lisa (Figura 6), sendo este um critério 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.), sob refrigeração com água deionizada, durante 1-2

minutos, com 2 pesos, em velocidade baixa. Em seguida, foi realizado o polimento do esmalte com lixa de carbeto de silício de granulação 1200 (Extec Corp.), sob refrigeração, durante 2-3 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta. Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Extec Corp.) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μm (Buehler), durante 3 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta.

Figura 4

Figura 5

Figura 6

Figuras 4 a 6 – Seqüência de polimento do bloco de esmalte. Figura 4 - Planificação da dentina. Figura 5 - Politriz metalográfica. Figura 6 - Polimento final do esmalte.

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 freqüência de 40 KHz, durante 2 minutos, com água deionizada. Ao final do polimento dos blocos, este procedimento foi repetido por 5 minutos.

Após o polimento do esmalte, a microdureza superficial inicial (MD inicial) de todos os blocos foi realizada utilizando-se um Microdurômetro (Shimadzu HMV 2, Figura 7) composto por um penetrador diamantado piramidal tipo KNOOP (Figura 8) que foi aplicado com carga de 25g por 10s, sendo que os dados foram analisados em um software. Foram realizadas 5 endentações por bloco (Figura 9), com uma distância de 100 μm entre elas. A média de microdureza superficial KNOOP por bloco foi calculada.

Figura 7

Figura 8

Figura 9

Figura 7 - Microdurômetro utilizado para seleção e distribuição dos espécimes. Figura 8 - Visão da ponta KNOOP. Figura 9 – Endentação realizada com carga de 25g por 10s.

Ao final desta etapa, foi analisada a microdureza de 295 blocos de esmalte bovino, obtendo-se uma média e desvio padrão de $371 \pm 25,9$ kPa/mm². Foram desprezadas as amostras que apresentaram média de microdureza de superfície 10% acima ou 10% abaixo da média geral de todos os blocos.

4.2 Seleção das amostras

Para o estudo foram utilizados 192 corpos de prova confeccionados em esmalte bovino (4x4mm), sendo metade hígidos (n=96) e a outra metade com lesão de cárie artificial (n=96), que foram posteriormente divididos em 6 grupos (tipo de verniz/solução) através da média de microdureza de superfície inicial e pós-lesão.

4.3 Indução da lesão de cárie artificial em esmalte *in vitro*

Para a produção das lesões de cárie artificial em metade dos blocos (n=96) foi utilizada uma solução desmineralizante contendo $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 3 mM (LabSynth); KH_2PO_4 a 3 mM (Sigma-Aldrich); ácido láctico a 50 mM (Sigma); metilhidroxidifosfato a 6 μM (Sigma-Aldrich) e traços de timol (pH ajustado a 5,0 com adição de KOH 10M) (BUSKES; CHRISTOFFERSEN; ARENDS, 1985; MAGALHÃES et al., 2009a).

Todas as amostras selecionadas para a produção de cárie artificial tiveram 1/3 da sua superfície protegida com esmalte cosmético de unha vermelho (Risque, Figura 10), anteriormente ao procedimento de desmineralização, com o objetivo de se obter uma superfície controle não desmineralizada. Cada bloco foi imerso em 30 ml de solução desmineralizante em potes de filme fotográfico separadamente, durante 6 dias, à temperatura de 37° C no interior de uma estufa (Figuras de 11 a 13).

Figura 10

Figura 11

Figura 12

Figura 13

Figura 10 – Bloco de esmalte com 1/3 da superfície protegida. Figura 11 - Bloco sendo imerso em 30 ml de solução desmineralizante. Figura 12 - Bloco totalmente imerso. Figura 13 - Pote de filme fotográfico tampado (pronto para ser colocado na estufa).

Inicialmente foi preparada uma “Solução 1” e dois pilotos da mesma foram realizados (n=2-4 blocos/piloto). A microdureza superficial pós-lesão (MD pós-lesão) dos dois pilotos foi avaliada (Figuras 14 e 15). Dessa forma, calculou-se a média de MD-pós lesão para posterior cálculo da porcentagem de perda de microdureza de superfície [%PMDS = (MD-pós lesão – MD inicial)/ MD inicial) x100].

Figura 14

Figura 15

Figura 14 – Visão do microdurômetro durante a realização da endentação. Figura 15 - As cinco endentações iniciais e pós-lesão, realizadas na superfície do bloco de esmalte.

O piloto 1 (n=4 blocos) apresentou uma média de MD-pós lesão de 30,2 kPa/mm² e uma %PMDS de 92,3, e o piloto 2 (n=2 blocos) apresentou uma média de MD-pós lesão de 8,8 kPa/mm² e uma %PMDS de 97,5. Devido à alta porcentagem de perda de microdureza de superfície encontrada, uma nova solução desmineralizante (“Solução 2”) e um piloto da última foi realizado (n=4), sendo que este último piloto apresentou uma média de MD lesão de 41,5 kPa/mm² e uma %PMDS de 89,2.

Devido à alta perda de microdureza encontrada com a 1^a solução, optou-se por utilizar a “Solução 2” para a produção das lesões de cárie artificiais. Para tal, foram utilizados 99 blocos de esmalte. Após os 6 dias em que permaneceram imersos em solução desmineralizante, os blocos foram retirados da solução, lavados com água deionizada e submetidos à análise de microdureza superficial pós-cárie (MD pós-lesão) e ao cálculo da porcentagem de perda de dureza superficial (%PMDS).

4.4 Tratamento das amostras *in vitro*

Anteriormente ao tratamento realizado *in vitro* e *in situ*, as amostras foram novamente desinfetadas por meio de imersão em solução de álcool a 70% durante 30 minutos (SCHLUETER; KLIMEK; GANSS, 2009).

Na sequência, 2/3 da superfície dos blocos hígidos e mais 1/3 da superfície dos blocos previamente desmineralizados foram protegidas com esmalte cosmético de unha (verde-hígidos, vermelho- desmineralizados) com o objetivo de se obter uma superfície controle pré-tratamento (Figuras 16 e 17).

Figura 16

Figura 17

Figura 16 – Bloco de esmalte hígido com 2/3 da superfície protegida. Figura 17 – Bloco de esmalte previamente desmineralizado com 2/3 da superfície protegida.

As amostras foram tratadas *in vitro* no dia anterior ao início da fase *in situ*, de acordo com os seguintes grupos (n=16/grupo, considerando separadamente os blocos previamente hígidos e desmineralizados artificialmente):

- Verniz de NaF a 5,42% (2,45% F⁻, em uma base de resina sintética, pH 5,0, DentsCare-FGM, Brasil) aplicado com um *microbrush*.
- Verniz experimental de TiF₄ a 4% (2,45% F⁻, em uma base de resina sintética, pH 1,0, DentsCare-FGM, Brasil) aplicado com um *microbrush*.
- Verniz placebo sem fluoreto (base de resina sintética, pH 5,0, FGM, Brasil) aplicado com um *microbrush*.

- Solução de TiF_4 a 4% (2,45% F^- , pH 1,0) aplicada com uma micropipeta ($v=20\ \mu\text{L}$).
- Solução de NaF a 5,42% (2,45% F^- , pH 5,0 ajustado com ácido fosfórico 5M) aplicada com uma micropipeta ($v=20\ \mu\text{L}$).
- Nenhum tratamento (controle).

Para os grupos tratados com os vernizes, o agente foi removido com auxílio de uma espátula e uma haste flexível Cotonete[®] (Johnson & Johnson) umedecido em acetona diluída 1:1, após 6 h em contato com a superfície de esmalte (MAGALHÃES et al., 2008a; 2008b) (Figuras 18 a 21 se referem à seqüência de aplicação e remoção dos vernizes). Para os grupos tratados com as soluções, o excesso do agente foi gentilmente removido com uma haste flexível Cotonete[®] (Johnson & Johnson) após 1 minuto (MAGALHÃES et al, 2008a; 2008b) (Figuras 22 a 24 se referem à seqüência de aplicação e remoção das soluções).

Todas as amostras foram armazenadas em saliva artificial (composição: glicose a 0,2mM, NaCl a 9,9 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,5mM, NH_4Cl a 3 mM, KCl a 17mM, NaSCN a 2mM, K_2HPO_4 a 2,4 mM, uréia a 3,3 mM, NaH_2PO_4 a 2,4 mM e traços de ácido ascórbico, pH 6,8, $v=30\ \text{mL/amostra}$) (KLIMEK; HELLWIG; AHRENS, 1982) durante o período de espera de 6h de atuação dos vernizes. As amostras foram armazenadas em saliva artificial separadamente para cada grupo experimental.

Figura 18

Figura 19

Figura 20

Figura 21

Figura 18 - Verniz sendo aplicado na superfície do bloco. Figura 19 - Blocos imersos em saliva artificial. Figura 20 - Verniz sendo removido com auxílio de uma espátula. Figura 21 – Remoção do verniz com auxílio de uma haste flexível Cotonete[®] umedecido em solução de acetona.

Figura 22

Figura 23

Figura 24

Figura 22 - Solução sendo aplicada por meio de uma micropipeta. Figura 23 – Remoção do excesso de solução por meio de uma haste flexível Cotonete®. Figura 24 – Blocos imersos em saliva artificial.

Após o período de 6h e a remoção dos vernizes, as amostras foram imediatamente acopladas aos aparelhos palatinos, de acordo com a fase experimental de cada voluntário.

4.5 Protocolo *in situ*

4.5.1 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Este trabalho foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki e com guia de boas práticas em estudos clínicos. Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da FOB-USP, do ponto de vista ético (Processo nº 058/2009, Anexo A). Os voluntários apenas participaram 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 (Anexos B e C).

O número de voluntários de 12 foi previamente estipulado com base nos resultados de um estudo prévio (Magalhães et al., 2008a), considerando um α -erro de 5% e um β -erro de 10%, porém devido à possibilidade de perda amostral foram incluídos inicialmente 16 voluntários. Os 16 adultos jovens, na faixa etária de 18 a 30 anos, sendo 2 homens e 14 mulheres, residentes na cidade de Bauru (área fluoretada, 0,8 ppm F⁻), foram selecionados a partir de uma anamnese, avaliação de parâmetros salivares e da condição de saúde bucal, seguindo as diretrizes do

Consort. Os voluntários foram selecionados utilizando como critérios de inclusão (fluxo salivar estimulado > 1mL/min, fluxo salivar não estimulado > 0,25 mL/min, pH salivar > 6, boa saúde bucal, ausência de lesões dentárias cavitadas bem como gengivite aguda e doença periodontal), sem violar os critérios de exclusão de saúde geral (gestantes, pacientes com doenças sistêmicas e com uso crônico de qualquer tipo de medicação) e de saúde bucal (baixo fluxo salivar estimulado/ não estimulado e pH, usuários de aparelhos ortodônticos, cárie ativos e presença de doença periodontal assim como usuários de bochechos com fluoreto e agentes anti-placa no último mês ou que receberam aplicação profissional nos últimos 6 meses).

A saliva de cada voluntário foi coletada seguindo padrões estabelecidos para a avaliação de fluxo salivar e pH. A coleta foi realizada no período da manhã, 2h após o desjejum, em ambiente bem iluminado, individual e climatizado. Os voluntários expectoraram a saliva em potes de coleta universal durante 10 minutos, os quais foram pesados antes e após a coleta, para o cálculo do volume de saliva não estimulada produzida por minuto, considerando que a densidade da saliva é de 1g/1mL. O mesmo procedimento foi realizado para a saliva estimulada, porém neste caso os voluntários mastigaram um pedaço de borracha por 1 minuto e expectoraram a saliva por 5 minutos. O pH da saliva foi medido utilizando-se um pHmetro.

Uma semana antes do início da fase *in situ*, os voluntários receberam um kit contendo escova dentária (Sorriso[®], Kolynos), fio dentário (Hillo Ind. e Comércio) e dentifrício não fluoretados (Crest[®], Procter and Gamble, USA). Esta padronização de higiene bucal foi realizada com o objetivo de eliminar qualquer vestígio de agente fluoretado que pudesse estar presente na cavidade bucal do paciente, podendo então, interferir no efeito do verniz fluoretado.

4.5.2 CONFECÇÃO DO APARELHO PALATINO

Após a seleção, os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados em alginato e nesse molde, um modelo de gesso pedra foi confeccionado. Sobre este modelo foi confeccionado um aparelho de resina acrílica intra-bucal palatino, onde foram acoplados 4 blocos de esmalte com auxílio de cera para incrustação (Kota) (Figuras 25 a 27 mostram a seqüência de confecção do aparelho palatino).

Esses 4 blocos de esmalte foram divididos no aparelho em 2 fileiras correspondentes ao tipo de amostra (hígida –verde e desmineralizada –vermelho) e subdivididos em cada fileira de acordo com o tratamento realizado (verniz e solução com o mesmo sal fluoretado). Um espaço de aproximadamente 4 mm de profundidade foi criado nos sítios correspondentes à localização de cada bloco, sendo reservado 1,5 mm para o acúmulo de placa dentária sobre a superfície de cada amostra.

Figura 25

Figura 26

Figura 27

Figura 25 - Aparelho intra-bucal palatino confeccionado sobre o modelo de gesso pedra. Figura 26 – Visão do aparelho palatino fora do modelo de gesso. Figura 27 – Aparelho com os 4 blocos de esmalte acoplados em seus respectivos sítios.

Com o intuito de permitir o acúmulo de placa dentária na superfície das amostras e de protegê-la contra distúrbios mecânicos, uma tela plástica (Peneira plástica POLICRON) foi fixada sobre cada bloco com auxílio de resina acrílica e cera de incrustação (MAGALHÃES et al., 2007; HONÓRIO et al., 2010) (Figuras 28 a 30).

Figura 28

Figura 29

Figura 30

Figuras 28 a 30 – Seqüência de fixação da tela plástica na superfície dos blocos acoplados ao aparelho palatino. Figura 28 – Tela plástica sendo colocada sobre o bloco. Figura 29 – Tela plástica

fixada na superfície dos blocos por meio de resina acrílica. Figura 30 – Aparelho palatino pronto para início da fase *in situ*.

4.5.3 FASES DO PROTOCOLO *IN SITU* E ORIENTAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Todos os voluntários participaram das 3 fases cruzadas, duplo-cegas e boca-dividida, com duração de 14 dias cada e com um período de descanso (“*washout*”) de 7 dias entre elas, para evitar contaminação das amostras entre os diferentes grupos.

Na **Fase A** foram realizados os tratamentos verniz de NaF a 5,45% (pH 5,0) x solução de NaF a 5,45% (pH 5,0). Na **Fase B** as amostras foram tratadas com verniz experimental de TiF_4 a 4% (pH 1,0) x solução de TiF_4 a 4% (pH 1,0). A **Fase C** correspondeu à fase controle (verniz placebo sem flúor, pH 5,0 x nenhum tratamento).

Durante o período experimental (14 dias/fase), os voluntários mantiveram o aparelho posicionado no interior da boca durante todo o dia, inclusive para dormir. O aparelho apenas poderia ser retirado para os períodos de refeição (4 vezes ao dia, máximo de 1h de duração cada) e para os experimentos. O intervalo entre as refeições foi mantido entre 2 a 3h. Durante o período de refeições, o aparelho deveria ser armazenado em gaze umedecida com água deionizada, sendo imprescindível a realização da higiene bucal com dentífrico não fluoretado antes de o aparelho ser recolocado na boca.

Os voluntários foram orientados a manter os hábitos alimentares usuais e a realizar higienização bucal utilizando a escova dentária (Sorriso[®], Kolynos), fio dentário (Hillo Ind. e Com.) e dentífrico não fluoretados (Crest[®]) fornecidos pelos pesquisadores durante todas as etapas do estudo. A higienização do aparelho somente poderia ser realizada na superfície que permanecia em contato com o palato, para que não houvesse interferência externa no acúmulo de placa sobre as amostras de esmalte dentário. Os voluntários também foram orientados a não utilizar qualquer tipo de produto fluoretado ou antibacteriano durante o período experimental (ANEXO D).

Para a realização do experimento, os voluntários deveriam aplicar 1 gota de solução de sacarose a 20% em cada bloco de esmalte hígido (cera de cor verde) (2 gotas/vez/aparelho), durante 5 minutos fora da boca, 8 vezes/dia, com intervalo

de 2h entre cada desafio. Após 5 minutos, o aparelho deveria ser reposicionado na boca (AIRES et al., 2006). Este procedimento foi realizado com o objetivo de provocar a formação de lesão inicial de cárie *in situ*. A solução de sacarose foi preparada pelos pesquisadores no laboratório de Bioquímica FOB-USP, e era trocada a cada 3 dias, para evitar crescimento de bactérias e fungos. Na fileira correspondente aos blocos previamente desmineralizados (cera de cor vermelha) nada deveria ser feito para possibilitar a remineralização *in situ* das lesões produzidas *in vitro*. Em adição, os voluntários foram orientados a ficarem atentos e não permitirem que qualquer resquício de solução de sacarose pudesse escorrer e atingir os blocos da fileira vermelha, durante as 8 aplicações diárias (ANEXO D) (Figura 31).

Figura 31 – Esquema de distribuição dos blocos H (hígido) e MB (previamente desmineralizados) no aparelho palatino, de acordo com o tipo de tratamento realizado (verniz ou solução).

Ao término de cada fase *in situ*, os aparelhos de todos os voluntários foram recolhidos, lavados com água deionizada corrente (para a retirada da placa bacteriana acumulada) e cada bloco foi retirado de seu sítio com auxílio de uma lâmina de bisturi (para corte da tela plástica) e uma espátula.

Na seqüência, os blocos de esmalte foram novamente fixados nos respectivos discos de acrílico.

4.6 Avaliação da microdureza de superfície final e microdureza longitudinal

A microdureza de superfície final (MD final) foi avaliada em todos os blocos (5 endentações/distância de 100 µm, 25g/10s) para o cálculo da porcentagem de perda de microdureza superficial para as amostras híginas ($\%PMDS = (MD \text{ final} - MD \text{ inicial}) / MD \text{ inicial} \times 100$) e da porcentagem de recuperação da microdureza de superfície para as amostras previamente desmineralizadas ($\%RMDS = (MD \text{ pós-}in \text{ situ} - MD \text{ pós-lesão}) / (MD \text{ inicial} - MD \text{ pós-lesão}) \times 100$).

Na seqüência, uma secção longitudinal foi realizada no centro de cada bloco, de forma que esse corte ficasse perpendicular à orientação do esmalte de unha protetor, ou seja, que englobasse os controles e a lesão (Figura 32). Para tal, foi utilizado um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Bulher Ltda., Lake Bluff, IL, USA), com um disco diamantado de dupla face – XLI 2205, “high concentration”, 102 mm longitudinalmente X 0,3 mm X 12,7 mm (Extex Corp., Enfield, CT, USA / Ref. 12.205) posicionado perpendicularmente à superfície do bloco e refrigerado com água deionizada.

Figura 32 – Demonstração do sentido de corte das amostras de forma que englobasse os controles (bordas) e a lesão (centro).

Após o corte, uma metade da amostra foi utilizada para a avaliação da microdureza longitudinal e a outra para a avaliação da microradiografia transversal (TMR).

Para a realização da microdureza longitudinal, uma metade de cada amostra foi incluída em resina acrílica, com a parte interna voltada para a superfície externa da resina, através de uma Embutidora (Arotec, Figuras 33 e 34). Posteriormente foi realizado o polimento da placa de acrílico obtida após a inclusão dos blocos de esmalte (Figuras 35 e 36). O polimento foi realizado através de uma Politriz Metalográfica (Arotec) e lixas de carbeto de silício de granulações 320, 600, 1200 e um feltro (Extec Corp.) embebido em suspensão de diamante de 1 μ m (Buehler) como descrito anteriormente.

Figura 33

Figura 34

Figura 33 – Embutidora utilizada para incluir metade dos blocos em resina acrílica. Figura 34 – Blocos incluídos em resina acrílica.

Figura 35

Figura 36

Figura 35 – Politriz metalográfica utilizada para o polimento da placa de acrílico com os blocos incluídos. Figura 36 – Placa de acrílico após o polimento final, blocos prontos para análise da microdureza longitudinal.

A microdureza longitudinal foi avaliada a partir de seqüências de 7 endentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 220 μm da superfície externa do esmalte.

Para os blocos de esmalte hígido, na região desmineralizada foram realizadas três seqüência de 7 endentações, e em cada região hígida, uma seqüência de endentações (dados não inseridos nos Resultados) (Figuras 37 a 39). Já para os blocos previamente desmineralizados, em cada região controle hígida (dados não inseridos nos resultados) e desmineralizada *in vitro* foram realizadas duas seqüência de 7 endentações. Na região desmineralizada *in vitro* e remineralizada *in situ*, foram realizadas três seqüência de 7 endentações cada (Figuras 40 a 42).

Figura 37

Figura 38

Figura 39

Figura 37 – Seqüência de endentações realizada na região controle hígida 1 de um bloco hígido. Figura 38 – Seqüência de endentações realizadas na região de lesão produzida *in situ* de um bloco hígido. Figura 39 - Seqüência de endentações realizada na região controle hígida 2 de um bloco hígido.

Figura 40

Figura 41

Figura 42

Figura 40 – Seqüência de endentações realizadas na região controle hígida de um bloco previamente desmineralizado. Figura 41 – Seqüência de endentações realizadas na região desmineralizada *in vitro* e remineralizada *in situ* de um bloco previamente desmineralizado. Figura 42 - Seqüência de endentações realizadas na região controle somente desmineralizada *in vitro* de um bloco previamente desmineralizado.

As médias de microdureza longitudinal foram calculadas em cada distância, para cada região, por amostra. Através da média de microdureza (kPa/mm^2) por distância, pode-se calcular o ΔKHN (perda mineral integrada, $\text{kPa/mm}^2 \cdot \mu\text{m}$) (SPIGUEL et al., 2009; HONÓRIO et al., 2010) para as amostras hígidas e o $\Delta\Delta\text{KHN}$ (ΔKHN lesão - ΔKHN efeito) para as amostras previamente desmineralizadas. O ΔKHN ou ΔKHN lesão ($\text{kPa/mm}^2 \cdot \mu\text{m}$) é o produto da diferença entre a microdureza de um esmalte sadio e microdureza do esmalte desmineralizado, em relação à profundidade da lesão (μm). O ΔKHN efeito ($\text{kPa/mm}^2 \cdot \mu\text{m}$) é o produto da diferença entre a microdureza de um esmalte sadio e microdureza do esmalte desmineralizado e remineralizado, em relação à profundidade da lesão (μm). Já a profundidade da lesão foi definida pela distância da superfície até a profundidade em que o esmalte apresentasse no mínimo 270 kPa/mm^2 de microdureza correspondem a uma valor de aproximadamente 95% do valor de microdureza da superfície interna do esmalte hígido.

4.7 Avaliação da microradiografia transversal (TMR)

A outra metade dos blocos seccionados foi adicionalmente seccionada longitudinalmente da mesma maneira como descrita anteriormente para a realização da TMR, possibilitando a obtenção de um fragmento com uma espessura de aproximadamente 500 μm (espessura mínima para que o bloco não fraturasse durante o corte).

Para a realização da microradiografia transversal, é necessário que a amostra apresente uma espessura de aproximadamente 100 μm , portanto, foi realizado um polimento manual de todas amostras, utilizando-se lixas de granulação 600 e 1200, e refrigeração com água deionizada. A espessura final foi checada com paquímetro digital. A média de espessura final de todas as amostras foi de 127 ± 17 μm (Figura 43).

Após o preparo das amostras, estas foram enviadas via correio, a Universidade de Zurich/Suíça, sob supervisão do PD. Wolfgang Buchalla e da PD. Annette Wiegand, para a realização e análise da TMR de todos os blocos, visto que este equipamento ainda não se encontra disponível no Brasil.

As microradiografias de cada amostra foram realizadas em combinação com uma meia fatia “*stepwedge*” de alumínio (14 fatias, ± 22 μm de espessura, 99.9% Al) para calibração, utilizando-se filmes radiográficos monocromáticos de alta velocidade (SO 253, Kodak AG, Stuttgart, Alemanha), expostos a raio x Cu K α (20 kv e 20 mA) por 15 s (Figuras 44 e 45).

O raio X foi direcionado perpendicularmente à direção da progressão da lesão, a 30 cm de distância focal. Após cada exposição, o filme foi revelado, fixado e lavado. A análise do filme foi realizada através de um microscópio estéreo (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com camera CCD preta e branca (XC-77 CE, Sony, Toquio, Japão) acoplado a um computador com um software para os cálculos (TMR, 1.25e, Inspector Research BV, Amsterdam, Holanda). As microradiografias foram salvas como imagens com um tamanho de 640x480 pixels e resolução de 256 valores de cinza (BUCHALLA et al., 2008).

Figura 43

Figura 44

Figura 45

Figura 43 – Bloco de esmalte preparado para análise da microradiografia transversal. Figura 44 – Bloco de esmalte acoplado em dispositivo de acrílico. Figura 45 – Conjunto dispositivo de acrílico+bloco de esmalte acoplado na máquina de microradiografia transversal com as fatias de alumínio.

A perda mineral (ΔZ) e profundidade da lesão (μm) foram calculadas a partir de valores de cinza de microradiografias padrão usando a fórmula de Angmar, Carlstrom e Glas (1963). O ΔZ (%vol. μm) é o produto da diferença entre a porcentagem de volume mineral de um esmalte sadio (87%) e porcentagem de volume mineral do esmalte desmineralizado, em relação à profundidade da lesão (μm). Para o esmalte previamente desmineralizado, o $\Delta\Delta Z$ foi calculado pela diferença entre o ΔZ lesão e ΔZ efeito (pós *in situ*). Já a profundidade da lesão é definida pela distância da superfície (0% vol min) até a profundidade em que o esmalte volte a apresentar um conteúdo mineral igual ou maior que 95% do conteúdo mineral do esmalte sadio (82%) (ARENDS; TEN BOSCH, 1992). A profundidade da zona superficial pseudo-intacta (μm) e o valor R (ΔZ /profundidade), que representa a média da perda mineral da lesão, também foram calculados.

4.8 Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do Excel e submetidos à análise estatística utilizando os softwares Graph Pad Instat e Prisma versão 5.0 para Windows e Mac Book, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

Para a comparação entre grupos experimentais (%PMDS, %RMDS, ΔZ , ΔKHN , profundidade de lesão, camada superficial e R) utilizaram-se os testes ANOVA de medidas repetidas seguido pelo Tukey-Kramer. Para comparação das

variáveis dentro do mesmo grupo experimental (ΔZ lesão x ΔZ efeito, profundidade antes e depois, camada superficial antes e depois, R antes e depois), utilizou-se teste t pareado. Para a comparação entre grupos na presença de 2 critérios (% vol min ou microdureza vs. profundidade), utilizaram-se ANOVA a 2 critérios seguida do teste de Bonferroni.

O número de voluntários foi adotado como número amostral e o nível de significância em todos os testes foi de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Dezesseis voluntários foram selecionados para este estudo *in situ*, sendo que destes, cinco desistiram (dois voluntários por dificuldade para a execução do experimento, dois voluntários por motivos pessoais e uma por falta de adaptação ao uso do aparelho). Dessa forma, somente 11 voluntários (2 homens e 9 mulheres, 19-29 anos de idade) completaram o estudo. Portanto, a perda amostral foi de 31,25%.

Considerando as variáveis estudadas (%PMDS, %RMDS, Δ KHN, $\Delta\Delta$ KHN, Δ Z, $\Delta\Delta$ Z abaixo descritas), a média de força amostral para a diferenciação entre o verniz de TiF_4 e controle foi de $80 \pm 32\%$ e de diferenciação entre o verniz de TiF_4 e o verniz NaF foi de $60 \pm 41\%$. O Quadro 1 mostra a porcentagem de força amostral para cada variável.

Diferença\ Variável	Blocos Hígidos			Blocos previamente Desmineralizados		
	%PMDS	Δ KHN	Δ Z	%RMDS	$\Delta\Delta$ KHN	$\Delta\Delta$ Z
Verniz TiF_4 x controle	100%	99,6%	100%	100%	30,4%	47,4%
Verniz TiF_4 x verniz NaF	67,9%	76,3%	98,3%	99,9%	7,9%	10,1%

Quadro 1. Porcentagem de força amostral para a diferenciação entre os verniz de TiF_4 e controle e verniz de NaF para os diferentes tipos de bloco considerando as variáveis estudadas e um alfa-erro de 5% (http://www.dssresearch.com/toolkit/spcalc/power_a2.asp).

Como critério de seleção dos voluntários, o fluxo e pH salivar foram avaliados. Os voluntários apresentaram um fluxo salivar não estimulado de $0,6 \pm 0,3$ mL/minuto e estimulado de $2,0 \pm 0,8$ mL/minuto. O pH salivar variou entre 6,5 e 7,5. Nenhum dos voluntários apresentou lesões de cárie ativas ou doença periodontal.

5.1 Microdureza Superficial

5.1.1. Amostras hígidas submetidas à desmineralização *in situ*

As amostras previamente hígidas apresentaram uma média geral de microdureza de superfície (MD) inicial de $371,4 \pm 17,9$.

A análise de variância de medidas repetidas (ANOVA-RM) mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos em relação à porcentagem de perda de microdureza de superfície (desmineralização superficial, %PMDS) ($p < 0,0001$, $F = 11,67$). O verniz de TiF_4 , solução de TiF_4 e verniz de NaF reduziram significativamente a porcentagem de perda de microdureza de superfície em comparação ao verniz placebo e controle, sendo que o verniz de TiF_4 adicionalmente diferiu da solução de NaF. Não houve diferenças significativas entre a solução de NaF, verniz placebo e controle.

A Tabela 1 mostra a média e desvio-padrão dos valores de MD inicial, MD pós-*in situ*, %PMDS e as diferenças entre os grupos. As Figuras 46 e 47 mostram o aspecto clínico de uma amostra representativa do grupo verniz placebo e verniz de TiF_4 , que apresentaram a maior e menor % PMDS, respectivamente.

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos valores de MD inicial, MD após desmineralização *in situ* (kPa/mm^2) e %PMDS, para os blocos hígidos de acordo com os grupos de tratamento ($n=11$)

Grupos\Variáveis	MD inicial*	MD pós- <i>in situ</i>	% PMDS
Verniz TiF_4	$375 \pm 18,6$	$139,6 \pm 36,2^a$	$62,6 \pm 10,1^a$
Solução TiF_4	$370 \pm 18,0$	$85,1 \pm 37,8^b$	$77,0 \pm 10,3^{a,b}$
Verniz NaF	$370 \pm 18,7$	$89,5 \pm 61,3^{a,b}$	$75,4 \pm 17,4^{a,b}$
Solução NaF	$371 \pm 20,0$	$65,2 \pm 64,3^{b,c}$	$82,3 \pm 17,6^{b,c}$
Verniz placebo	$372 \pm 16,6$	$21,5 \pm 15,6^c$	$94,8 \pm 4,1^c$
Controle	$373 \pm 18,0$	$27,1 \pm 21,4^c$	$92,8 \pm 5,7^c$

Valores na mesma coluna que apresentam letras sobrescritas diferentes diferem significativamente entre si (ANOVA-RM, $p < 0,0001$, Teste de Tukey-Kramer). *Anova ($p > 0,05$).

Figura 46

Figura 47

Figura 46 - Bloco de esmalte desmineralizado *in situ* pertencente ao grupo verniz placebo. Figura 47 – Bloco de esmalte desmineralizado *in situ* pertencente ao grupo verniz de TiF_4 .

5.1.2. Amostras desmineralizadas *in vitro* submetidas à remineralização *in situ*

As amostras previamente desmineralizadas apresentaram uma média geral de MD inicial e pós-lesão de $370,7 \pm 26,1$ e $22,1 \pm 12,5$ kPa/mm², respectivamente.

ANOVA-RM mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos em relação à porcentagem de recuperação de microdureza de superfície (remineralização, %RMDS) ($p < 0,0001$, $F = 11,50$). O verniz de TiF_4 e solução de TiF_4 aumentaram significativamente a porcentagem de recuperação da microdureza de superfície em comparação a todos os outros grupos, que não diferiram entre si.

A Tabela 2 mostra a média e desvio-padrão dos valores de MD inicial, MD pós-lesão, MD pós *in situ*, %RMDS e as diferenças entre os grupos.

Tabela 2. Média e desvio-padrão dos valores de MD inicial, MD pós-lesão, MD pós-*in situ* (kPa/mm²) e %RMDS, para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11)

Grupos/Variáveis	MD Inicial*	MD pós-lesão*	MD pós- <i>in situ</i>	%RMDS
Verniz TiF ₄	374,0±18,9	18,8±9,2	77,3±24,3 ^a	17,7±6,2 ^a
Solução TiF ₄	377,4±22,5	21,5±10,5	70,2±28,7 ^{a,b}	13,8±7,1 ^a
Verniz NaF	373,3±22,9	22,8±13,6	49,9±28,4 ^{a,b}	7,3±3,3 ^b
Solução NaF	373,2±16,1	21,2±12,9	46,9±28,7 ^{a,b}	6,4±5,7 ^b
Verniz placebo	366,4±24,3	24,7±15,3	38,7±21,5 ^b	4,8±3,2 ^b
Controle	369,2±23,8	24,0±14,3	48,7±31,6 ^{a,b}	5,6±1,9 ^b

Valores na mesma coluna que apresentam letras sobrescritas diferentes diferem significativamente entre si (ANOVA-RM, MD pós-*in situ* e %RMDS, $p=0,018$ e $p<0,0001$, respectivamente, Teste de Tukey-Kramer). *ANOVA ($p>0,05$)

As Figuras 48 e 49 mostram o aspecto clínico de uma amostra representativa do grupo verniz placebo e verniz de TiF₄, que apresentaram a menor e maior % RMDS, respectivamente.

Figura 48

Figura 49

Figura 48 - Bloco de esmalte remineralizado *in situ* pertencente ao grupo verniz placebo. Figura 49 – bloco de esmalte remineralizado *in situ* pertencente ao grupo verniz de TiF₄.

De uma forma geral, pôde-se constatar pelas análises estatísticas que houve uma redução significativa da desmineralização superficial e um aumento significativo da remineralização superficial do esmalte *in situ* pelos tratamentos com verniz e solução de TiF₄.

5.2 Microdureza longitudinal

5.2.1. Amostras hígidas submetidas à desmineralização *in situ*

Em relação à desmineralização das amostras de esmalte previamente hígidas, a ANOVA-RM mostrou haver diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos valores de microdureza longitudinal utilizando os parâmetros ΔKHN ($\text{kPa}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$) e a profundidade da lesão (μm) ($p < 0,0001$). A Tabela 3 mostra média e desvio padrão destes parâmetros da microdureza longitudinal e as diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 3. Média e desvio-padrão dos valores de ΔKHN ($\text{kPa}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$) e profundidade da lesão (μm) para os blocos hígidos de acordo com os grupos de tratamento ($n=11$)

Grupos\Variáveis	ΔKHN ($\text{kPa}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$)	Profundidade (μm)
Verniz TiF_4	3.223 ± 1.086^a	38 ± 9^a
Solução TiF_4	4.370 ± 1.862^a	$60 \pm 20^{a,b}$
Verniz NaF	4.786 ± 1.908^a	$60 \pm 20^{a,b}$
Solução NaF	67.644 ± 61.162^b	136 ± 62^c
Verniz placebo	9.398 ± 2.675^a	57 ± 9^a
Controle	86.069 ± 63.553^b	$104 \pm 46^{b,c}$

Valores na mesma coluna que apresentam letras sobrescritas diferentes diferem significativamente entre si (ANOVA-RM e teste Tukey-Kramer, $p < 0,0001$).

Considerando que o esmalte hígido apresenta uma variação grande em termos de valores de microdureza, consideraram-se hígidas as amostras com valores acima de $270 \text{ kPa}/\text{mm}^2$. Este parâmetro de microdureza foi utilizado para a avaliação da profundidade da lesão, sendo que o esmalte tratado com solução de NaF apresentou a maior profundidade de lesão em comparação ao esmalte tratado com os outros produtos fluoretados, sendo que estes últimos grupos não diferiram do verniz placebo. Quando os grupos fluoretados foram comparados ao controle, as

amostras tratadas com o verniz de TiF_4 foram as que apresentaram lesões mais rasas (Tabela 3).

Quando a microdureza foi integrada à profundidade da lesão para o cálculo da perda de microdureza integrada, os tratamentos com verniz e solução de TiF_4 bem como verniz NaF foram os mais eficazes em reduzir a desmineralização da subsuperfície, diferindo significativamente dos grupos solução NaF e controle. As amostras de esmalte tratadas com o verniz e solução de TiF_4 bem como verniz NaF apresentaram menor ΔKHN que as amostras do grupo verniz placebo, porém esta diferença não foi significativa (Tabela 3). Na Figura 50, pode-se observar o perfil da microdureza longitudinal para todos os grupos em cada profundidade.

Figura 50. Valores médios da microdureza longitudinal (n=11) para cada profundidade avaliada.

ANOVA a 2 critérios mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,0001$, $F = 18,32$), entre as profundidades avaliadas ($p < 0,0001$, $F = 98,21$) e interação entre os fatores ($p = 0,0028$, $F = 1,94$). As amostras de esmalte tratadas com o verniz de TiF_4 apresentaram maior valor de microdureza que as amostras dos grupos solução de NaF e controle aos 30 e 50 μm , e do verniz placebo, aos 30 μm de profundidade. O mesmo resultado foi visto com a solução de

TiF₄, porém esta não diferiu da solução de NaF. Não houve diferenças significativas entre os veículos de administração dos sais fluoretados, isto é, verniz e solução de TiF₄ assim como o verniz e solução de NaF tiveram comportamento semelhante entre si. O grupo do verniz de NaF não diferiu do controle e do verniz placebo em nenhuma das distâncias avaliadas, porém as amostras tratadas com solução de NaF apresentaram menor microdureza que as do grupo placebo aos 70 µm de profundidade. O verniz placebo e o grupo controle apresentaram diferenças entre si somente aos 50 e 70 µm de profundidade (Figura 50).

5.2.2. Amostras desmineralizadas *in vitro* submetidas à remineralização *in situ*

Em relação à remineralização das amostras de esmalte previamente desmineralizadas *in vitro*, ANOVA mostrou não haver diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos valores de Δ KHN lesão (porção somente desmineralizada, $F=2,12$, $p=0,08$) e do Δ KHN efeito (porção des-remineralizada, $F=1,70$, $p=0,15$) assim como no cálculo da diferença entre as duas perdas de microdureza integrada ($\Delta\Delta$ KHN, $F=1,27$, $p=0,29$), mostrando que o protocolo experimental bem como os tratamentos propostos foram ineficazes em promover a remineralização da lesão artificial em esmalte. Estes dados foram confirmados quando teste t pareado foi aplicado para a comparação entre o Δ KHN efeito e Δ KHN lesão para cada tratamento dentro da mesma amostra, em que não foi vista diferença significativa entre a área desmineralizada e des-remineralizada com exceção das amostras do grupo da solução de TiF₄ (Tabela 4).

Tabela 4. Média e desvio-padrão dos valores de Δ KHN lesão, Δ KHN efeito e $\Delta\Delta$ KHN ($\text{kPa/mm}^2 \times \mu\text{m}$), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11)

Grupos\Variáveis	Δ KHN lesão ($\text{kPa/mm}^2 \times \mu\text{m}$)**	Δ KHN efeito ($\text{kPa/mm}^2 \times \mu\text{m}$)*	Test t pareado Valor de p	$\Delta\Delta$ KHN ($\text{kPa/mm}^2 \times \mu\text{m}$)*
Verniz TiF_4	8.213,8 $\pm$ 2.453,6	7.800,0 $\pm$ 1.481,7	p=0,64	413,8 $\pm$ 2.858,8
Solução TiF_4	10.719,2 $\pm$ 2.730,5	9.025 $\pm$ 3.188,1	p=0,008	1.694,0 $\pm$ 1.716,4
Verniz NaF	9.101,4 $\pm$ 2.663,4	8.393,3 $\pm$ 1.887,5	p=0,45	708,0 $\pm$ 2.984,9
Solução NaF	7.822,1 $\pm$ 3.275,4	7.743,9 $\pm$ 1.872,0	p=0,91	78,2 $\pm$ 2.468,9
Verniz placebo	7.402,1 $\pm$ 1.760,3	6.963,7 $\pm$ 2.111,5	p=0,49	438,3 $\pm$ 2.032,8
Controle	8.433,1 $\pm$ 2.770,5	9.282,1 $\pm$ 1.833,9	p=0,26	-849,0 $\pm$ 2.352,5

*Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA-RM, $p>0,05$). ** Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $p>0,05$). Valores positivos significam que houve remineralização, e valores negativos, desmineralização.

Em relação à profundidade da lesão (μm), não houve diferenças significativas entre os grupos na lesão inicial (ANOVA-RM, $F=1,64$, $p=0,17$), porém após a remineralização, o verniz de TiF_4 , a solução de TiF_4 e verniz NaF diferiram do verniz placebo (ANOVA-RM, Tukey-Kramer, $F=3,21$, $p=0,013$), isto é, apresentaram um menor valor de profundidade de lesão que o grupo do verniz placebo. Quando teste t pareado foi aplicado para a comparação entre as profundidades da lesão antes e após a remineralização dentro do mesmo grupo, houve redução significativa do tamanho da lesão somente para as amostras tratadas com solução de TiF_4 e verniz NaF (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio-padrão dos valores da profundidade da lesão (μm) antes e após a remineralização *in situ*, para os blocos previamente desmineralizados, de acordo com os grupos de tratamento (n=11)

Grupos\Variáveis	Profundidade (μm)		
	Antes*	Após	Test t pareado Valor de p
Verniz TiF_4	55,5 $\pm$ 15,7	55,5 $\pm$ 9,3 ^a	p>0,99
Solução TiF_4	72,2 $\pm$ 18,9	57,5 $\pm$ 15,3 ^a	p=0,006
Verniz NaF	68,0 $\pm$ 16,6	56,0 $\pm$ 9,2 ^a	p=0,002
Solução NaF	58,9 $\pm$ 18,1	68,0 $\pm$ 18,9 ^{ab}	p=0,24
Verniz placebo	70,0 $\pm$ 17,9	88,9 $\pm$ 47,8 ^b	p=0,20
Controle	61,3 $\pm$ 12,2	67,1 $\pm$ 13,9 ^{ab}	p=0,22

Valores na mesma coluna que apresentam letras sobrescritas diferentes diferem significativamente entre si (ANOVA-RM e Teste de Tukey-Kramer, p=0,013). *Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, p>0,05).

Nas Figuras 51 e 52, pode-se observar o perfil da microdureza longitudinal para todos os grupos em cada profundidade para a porção das amostras somente desmineralizadas e para aquelas des-remineralizadas, respectivamente.

Figura 51. Valores médios da microdureza longitudinal (n=11) para cada profundidade avaliada para a porção das amostras somente desmineralizadas.

Figura 52. Valores médios da microdureza longitudinal (n=11) para cada profundidade avaliada para a porção das amostras des-remineralizadas.

ANOVA a 2 critérios mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,0001$, $F = 10,3$ – somente des/ $p < 0,0001$, $F = 5,54$ –des-remineralizada) e entre as profundidades avaliadas ($p < 0,0001$, $F = 148$ / $p < 0,0001$, $F = 378,8$). Não houve interação entre os fatores ($p = 0,88$, $F = 0,65$ / $p = 0,43$, $F = 1,03$). No entanto, quando o teste de Bonferroni foi aplicado, não se observaram diferenças nos valores de microdureza entre os grupos em nenhuma das profundidades avaliadas tanto para a porção somente desmineralizada como para a porção des-remineralizada das amostras, respectivamente.

Em geral, a partir da análise de microdureza longitudinal e considerando as limitações da técnica, pode-se constatar que os tratamentos com o verniz de TiF_4 e solução de TiF_4 foram efetivos na redução da desmineralização subsuperficial *in situ*. No entanto, observou-se que o protocolo experimental não permitiu uma adequada remineralização de subsuperfície *in situ*, sendo que apenas um fraco efeito foi visto pelo tratamento com a solução de TiF_4 , que mostrou capaz de reduzir a profundidade da lesão e, conseqüentemente, a perda de microdureza integrada.

5.3 Microradiografia transversal

5.3.1. Amostras hígidas submetidas à desmineralização *in situ*

Em relação à desmineralização das amostras de esmalte previamente hígidas, ANOVA-RM mostrou haver diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos valores de R (% perda vol.min, $F = 10,86$), profundidade da lesão (μm , $F = 24,74$) e perda mineral integrada (%vol.min x μm , $F = 19,72$) ($p < 0,0001$). A profundidade da camada superficial não pôde ser detectada em todas as amostras. Dessa forma, esta variável não foi submetida à análise estatística. A Tabela 6 mostra média e desvio padrão destes parâmetros microradiográficos e as diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 6. Média e desvio-padrão dos valores de R (% perda vol.min), profundidade da lesão (μm) e perda mineral integrada (%vol.min x μm), para os blocos hígidos de acordo com os grupos de tratamento (n=11)

Grupos\Variáveis	R (% perda vol.min)	Profundidade (μm)	Perda mineral – ΔZ (%vol.min x μm)
Verniz TiF_4	27,8 $\pm$ 5,6 ^{a,b}	14,4 $\pm$ 7,1 ^a	448,8 $\pm$ 232,1 ^a
Solução TiF_4	25,3 $\pm$ 6,1 ^a	56,2 $\pm$ 25,1 ^{b,c}	1.378,8 $\pm$ 603,4 ^a
Verniz NaF	31,9 $\pm$ 4,3 ^{a,b,c}	30,9 $\pm$ 13,3 ^{a,b}	954,3 $\pm$ 378,8 ^a
Solução NaF	40,5 $\pm$ 8,0 ^d	104,8 $\pm$ 25,1 ^d	3.206,2 $\pm$ 1.399,2 ^b
Verniz placebo	39,2 $\pm$ 5,0 ^{c,d}	67,1 $\pm$ 30,9 ^c	2.973,4 $\pm$ 1.192,6 ^b
Controle	34,3 $\pm$ 7,7 ^{b,c,d}	83,9 $\pm$ 18,0 ^{c,d}	3.289,1 $\pm$ 1.002,0 ^b

Valores na mesma coluna que apresentam letras sobrescritas diferentes diferem significativamente entre si (ANOVA-RM e teste de Tukey-Kramer, $p < 0,0001$).

Considerando que o esmalte hígido apresenta em torno de 87% de volume mineral, todos os grupos apresentaram-se com um volume mineral reduzido na lesão, sendo que a solução de NaF apresentou maior perda de volume mineral em comparação a todos os outros grupos fluoretados, que não diferiram entre si. O verniz de TiF_4 e solução de TiF_4 ainda apresentaram menor perda de volume mineral em relação ao verniz placebo. Por outro lado, somente a solução de TiF_4 apresentou-se diferente do controle (Tabela 6).

Em relação à profundidade da lesão, houve uma tendência dos grupos com valores mais baixos de % perda de volume mineral apresentarem lesões mais rasas em relação aos grupos com uma maior % perda de volume mineral. O esmalte tratado com solução de NaF apresentou uma maior % perda de volume mineral em relação aos outros grupos fluoretados, e ainda teve a maior profundidade de lesão. Quando os grupos fluoretados foram comparados ao controle, as amostras tratadas com os vernizes NaF e TiF_4 foram as que apresentaram lesões mais rasas (Tabela 6).

Quando a % de perda de volume mineral foi integrada à profundidade da lesão para o cálculo da perda mineral integrada, os tratamentos com verniz e solução de TiF_4 bem como verniz NaF foram os mais eficazes em reduzir a desmineralização da subsuperfície, diferindo significativamente dos grupos solução NaF, verniz placebo e controle (Tabela 6).

A Figura 53 mostra a % volume mineral para todos os grupos em cada profundidade.

Figura 53. Valores médios de % volume mineral para cada profundidade avaliada e grupo experimental (n=11).

ANOVA a 2 critérios mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,0001$, $F = 27,73$), entre as profundidades avaliadas ($p < 0,0001$, $F = 86,86$) e interação entre os fatores ($p < 0,0001$, $F = 4,16$). As amostras de esmalte tratadas com o verniz de TiF_4 apresentaram maior valor de volume mineral que as amostras dos grupos solução de NaF, dos 10 aos 70 μm , e do verniz placebo e controle aos 10 e 30 μm de profundidade. O mesmo resultado foi visto com a solução de TiF_4 , porém em profundidades diferentes (solução de NaF: 10 a 50 μm , verniz placebo: 10 e 30 μm , e controle: 10 μm). Houve diferenças significativas entre os veículos de administração do NaF, sendo que as amostras tratadas com verniz de NaF tiveram maiores valores de % de volume mineral dos 30 aos 70 μm de profundidade em comparação às amostras do grupo solução de NaF. O grupo do verniz de NaF diferiu do controle, aos 30 μm , e do verniz placebo, aos 10 e 30 μm de

profundidade. Não houve diferenças significativas entre a solução de NaF, verniz placebo e controle (Figura 53).

As Figuras 54-59 mostram a microscopia e o perfil de volume mineral por profundidade de uma amostra representativa de cada grupo, a qual foi escolhida com base nos valores médios do ΔZ .

Figura 54. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz TiF_4 .

Figura 55. Perfil microrradiográfico de uma amostra do grupo solução TiF₄.

Figura 56. Perfil microrradiográfico de uma amostra do grupo verniz NaF.

Figura 57. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo solução NaF.

Figura 58. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo placebo.

Figura 59. Perfil microrradiográfico de uma amostra do grupo controle.

5.3.2. Amostras desmineralizadas *in vitro* submetidas à remineralização *in situ*

Em relação à remineralização das amostras de esmalte previamente desmineralizadas, ANOVA mostrou não haver diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos valores de R (% perda vol.min) tanto para as porções somente desmineralizada ($F=0,69$, $p=0,63$) como para as des-remineralizadas ($F=1,05$, $p=0,40$). Para averiguar se houve aumento do conteúdo mineral da lesão, os valores de R entre as porções desmineralizadas somente (antes) e aquelas des-remineralizadas (após) foram comparados dentro do mesmo grupo utilizando test t pareado. Somente as amostras tratadas com solução de TiF_4 , verniz placebo e aquelas não tratadas (controles) apresentaram aumento significativo nos valores de R (Tabela 7), isto é houve um aumento da perda de volume mineral.

Tabela 7. Média e desvio-padrão dos valores de R (% perda vol.min) da porção desmineralizada (antes) e daquela des-remineralizada (após), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11)

Grupos\Variáveis	R antes (% perda vol.min)	R após (% perda vol.min)	Test t pareado Valor de p
Verniz TiF₄	35,1±7,0	40,9±10,2	p=0,07
Solução TiF₄	33,9±4,5	38,6±7,6	p=0,03
Verniz NaF	31,4±9,1	35,8±9,2	p=0,12
Solução NaF	32,9±12,5	34,0±9,5	p=0,72
Verniz placebo	30,3±4,2	38,1±3,0	p=0,004
Controle	33,9±6,2	38,4±4,8	p=0,02

Em relação à profundidade da lesão (μm) das porções somente desmineralizada (antes) e des-remineralizada (após), não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, $F=1,90$, $p=0,11$ / $F=0,95$, $p=0,05$, respectivamente). Adicionalmente não houve diferença entre as profundidades das porções desmineralizadas e des-remineralizadas dentro do mesmo grupo, isto é, não houve redução ou aumento da profundidade da lesão pelo protocolo e tratamentos propostos (teste t pareado, $p>0,05$, Tabela 8). O mesmo resultado foi obtido para a espessura da camada superficial pseudo-intacta (ANOVA, $F=0,45$, $p=0,36$ / $F=1,87$, $p=0,11$, respectivamente para as amostras desmineralizadas e des-remineralizadas, Tabela 9).

Tabela 8. Média e desvio-padrão dos valores de profundidade da lesão (μm) da porção desmineralizada (antes) e daquela des-remineralizada (após), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11)

Grupos\Variáveis	Profundidade da lesão (μm)		
	Antes	Após	Test t pareado Valor de p
Verniz TiF_4	58,4 $\pm$ 9,8	66,8 $\pm$ 16,2	p=0,15
Solução TiF_4	74,7 $\pm$ 21,9	74,8 $\pm$ 16,6	p=0,96
Verniz NaF	79,3 $\pm$ 18,7	77,8 $\pm$ 18,6	p=0,76
Solução NaF	78,6 $\pm$ 18,9	84,0 $\pm$ 26,3	p=0,33
Verniz placebo	71,7 $\pm$ 19,6	69,9 $\pm$ 10,7	p=0,77
Controle	73,4 $\pm$ 15,7	89,6 $\pm$ 16,9	p=0,07

Tabela 9. Média e desvio-padrão dos valores de espessura da camada superficial pseudo-intacta (μm) da porção desmineralizada (antes) e daquela des-remineralizada (após), para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento (n=11)

Grupos\Variáveis	Espessura da camada superficial (μm)		
	Antes	Após	Test t pareado Valor de p
Verniz TiF_4	7,7 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 0,6	p=0,92
Solução TiF_4	6,9 $\pm$ 1,8	7,0 $\pm$ 2,5	p=0,84
Verniz NaF	9,4 $\pm$ 4,7	8,8 $\pm$ 2,7	p=0,69
Solução NaF	8,4 $\pm$ 1,9	8,6 $\pm$ 2,9	p=0,89
Verniz placebo	9,2 $\pm$ 3,2	8,6 $\pm$ 2,7	p=0,42
Controle	8,1 $\pm$ 1,7	6,6 $\pm$ 1,9	p=0,09

Quando a perda mineral integrada (ΔZ lesão, % perda vol.min x μm) da porção somente desmineralizada foi comparada à porção des-remineralizada (ΔZ efeito) dentro do mesmo grupo, o teste t pareado detectou diferenças significativas somente para os grupos do verniz placebo (p=0,005) e controle (p=0,0006), isto é, houve um aumento da desmineralização subsuperficial quando as amostras

desmineralizadas foram submetidas ao ensaio *in situ*. Para os grupos fluoretados, não houve progresso da desmineralização assim como não houve um aumento da remineralização da subsuperfície da lesão ($p>0,05$) (Tabela 10).

Quando os grupos foram comparados em cada porção separadamente, não houve diferença entre os mesmos tanto na porção somente desmineralizada como naquela des-remineralizada (ANOVA, $F=1,13$ $p=0,36$ / $F=1,82$, $p=0,13$, respectivamente). Para isolar somente o efeito da possível “remineralização” pelo tratamento, o $\Delta\Delta Z$ foi calculado e novamente nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos (ANOVA-RM, $F=1,10$, $p=0,37$). A Tabela 10 mostra os valores referentes ao ΔZ lesão, ΔZ efeito e $\Delta\Delta Z$.

Tabela 10. Média e desvio-padrão dos valores de ΔZ lesão, ΔZ efeito e $\Delta\Delta Z$, para os blocos previamente desmineralizados de acordo com os grupos de tratamento ($n=11$)

Grupos\Variáveis	ΔZ lesão	ΔZ efeito	Teste t pareado Valor de p	$\Delta\Delta Z^*$
Verniz TiF_4	2.022,0 $\pm$ 442,52	2.496,1 $\pm$ 758,4	$p=0,06$	-474,1 $\pm$ 755,3
Solução TiF_4	2.451,5 $\pm$ 593,5	2.723,5 $\pm$ 230,8	$p=0,15$	-272,0 $\pm$ 586,0
Verniz NaF	2.383,1 $\pm$ 533,9	2.733,6 $\pm$ 897,5	$p=0,18$	-350,5 $\pm$ 812,9
Solução NaF	2.434,5 $\pm$ 778,1	2.809,8 $\pm$ 1.154,5	$p=0,24$	-375,3 $\pm$ 992,2
Verniz placebo	2.131,8 $\pm$ 564,3	2.684,0 $\pm$ 543,6	$p=0,005$	-552,2 $\pm$ 515,6
Controle	2.413,6 $\pm$ 516,0	3.359,8 $\pm$ 514,6	$p=0,0006$	-946,2 $\pm$ 642,3

*Valores negativos significam que houve desmineralização e valores positivos, remineralização. Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA-RM, $p>0,05$)

As Figuras 60 e 61 mostram o perfil da % de volume mineral para todos os grupos em cada profundidade para as porções desmineralizada e des-remineralizada, respectivamente.

Figura 60. Valores médios de % volume mineral para cada profundidade avaliada para a porção desmineralizada dos diferentes grupos experimentais (n=11)

Figura 61. Valores médios de % volume mineral para cada profundidade avaliada para a porção des-remineralizada dos diferentes grupos experimentais (n=11).

ANOVA a 2 critérios mostrou haver diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,03$, $F=2,51$ para amostra somente des/ $p=0,0084$, $F=3,16$ para a des-remineralizada) e entre as profundidades avaliadas ($p<0,0001$, $F=334,6$ / $p<0,0001$, $F=307,3$). Não houve interação entre os fatores ($p=0,95$, $F=0,61$ / $p=0,84$, $F=0,74$). No entanto, quando o teste de Bonferroni foi aplicado, não se observaram diferenças nos valores de % volume mineral entre os grupos em nenhuma das profundidades avaliadas tanto para a porção somente desmineralizada como para a porção des-remineralizada das amostras, respectivamente.

As Figuras 62-67 mostram a microscopia e o perfil de volume mineral por profundidade de uma amostra representativa de cada grupo, a qual foi escolhida com base nos valores médios do ΔZ .

Figura 62. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz TiF_4 (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).

Figura 63. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo solução TiF_4 (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).

Figura 64. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo verniz NaF (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).

Figura 65. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo solução NaF (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).

Figura 66. Perfil microrradiográfico de uma amostra do grupo verniz placebo (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).

Figura 67. Perfil microradiográfico de uma amostra do grupo controle (porção desmineralizada e porção des-remineralizada, respectivamente).

Considerando os parâmetros microradiográficos, os tratamentos com os vernizes à base de TiF_4 e NaF bem como a solução de TiF_4 foram eficazes na redução da desmineralização subsuperficial. No entanto, observou-se que o protocolo experimental não permitiu uma adequada remineralização da subsuperfície do esmalte *in situ*.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

De acordo com os objetivos propostos, a 1ª hipótese nula foi rejeitada e a 2ª hipótese nula não pôde ser aceita e nem rejeitada, uma vez que o protocolo experimental permitiu a constatação de diferença de comportamento entre os produtos fluoretados na desmineralização do esmalte, porém isto não ocorreu na remineralização do esmalte. Este trabalho foi conduzido com continuidade de um estudo *in vitro* que mostrou resultados promissores com o uso do verniz de TiF_4 na des-remineralização do esmalte dentário bovino (MAGALHÃES et al., 2008a). Considerando a importância da realização de estudos *in situ* para comprovação dos resultados obtidos no Laboratório anteriormente à realização de estudos clínicos randomizados e controlados sobre o efeito deste verniz experimental na prevenção de lesões cariosas em pacientes de alto risco bem como no tratamento de lesões iniciais, o presente trabalho foi realizado.

O verniz e a solução de TiF_4 foram preparados de forma a apresentarem a mesma concentração de fluoreto que o verniz e a solução de NaF. O verniz de NaF foi utilizado como controle positivo no presente estudo, uma vez que a Literatura já deu suporte científico para uso deste produto no controle da cárie dentária na clínica (HOLM, 1979; SEPPA; TUUTTI; LUOMA, 1982; SEPPA; LEPPANEN; HAUSEN, 1995; AUTIO-GOLD; COURTS, 2001; STROHMENGER; BRAMBILLA, 2001; MARINHO et al., 2002; PETTERSON et al., 2004). O ideal seria a inclusão do verniz comercial de NaF-Duraphat® como controle positivo no presente estudo, uma vez que é o verniz mais testado em estudos clínicos, porém este não apresenta a mesma concentração de fluoreto que o verniz experimental de TiF_4 . Adicionalmente, o estudo *in vitro* realizado anteriormente não mostrou diferença no comportamento entre os vernizes Duofluorid® e Duraphat® na prevenção da desmineralização e no aumento da remineralização do esmalte *in vitro* (MAGALHÃES et al., 2008a). Por fim, seria importante também que os vernizes fluoretados e placebo tivessem a mesma base, pois esta pode ter influência na quantidade de F^- liberado, sendo este mais um motivo para a não inclusão do Duraphat®, mas sim de um verniz NaF com a mesma base e quantidade de fluoreto que o verniz de TiF_4 .

Dessa forma, os vernizes foram fabricados pela empresa FGM- DentsCare, utilizando a mesma base do verniz comercial da empresa, o Duofluorid[®]. Para tentar padronizar também o pH dos agentes, a empresa ajustou o pH do verniz de TiF_4 para 4,5-5,0 (semelhantemente ao verniz comercial Duraphat[®], o verniz mais testado para a prevenção da cárie dentária na clínica) com adição de diferentes sais (um deles foi o citrato de sódio), porém o pH retornou ao inicial (pH ~1,2) após algumas horas da modificação. Portanto, esta modificação do verniz não foi possível de ser aplicada neste trabalho. Vários estudos *in vitro* mostraram que soluções de TiF_4 com pH ajustado de 1,2 para 2,1 e 3,5 não foram eficazes na redução da desmineralização erosiva do esmalte e dentina (WIEGAND et al., 2009a; 2009b; HOVE et al., 2011). Dessa forma o efeito do TiF_4 parece ser altamente dependente do pH acidulado, suportando ao uso do verniz de TiF_4 com pH em torno de 1,2.

A razão pela qual nos trabalhos citados acima se conseguiu ajustar o pH da solução de TiF_4 e no presente estudo não conseguiu manter o pH mais alto deste verniz, pode ser devido ao tipo de veículo. Adicionalmente, nestes estudos a solução foi preparada, o pH mensurado e na seqüência o produto foi aplicado sobre a superfície dentária. É provável que com o tempo de armazenamento, o pH da solução pudesse se alterar, como ocorreu no presente trabalho com o verniz. Como não foi possível ajustar o pH do verniz para 4,5 e tão pouco é viável o uso de um verniz de NaF com pH 1,2, como controle positivo, uma vez que não há respaldo na Literatura em relação à eficácia e segurança deste produto, optamos por manter as diferenças de pH. Esta limitação deve ser considerada quando os dados obtidos no presente estudo são interpretados.

Por outro lado, as soluções foram preparadas pelas pesquisadoras no Laboratório de Bioquímica da FOB-USP, sendo que a solução de NaF foi ajustada para pH 5,0 pela adição do H_3PO_4 a 5M (WIEGAND et al., 2009a; 2009b). O pH da solução de TiF_4 é nativo. Inicialmente imaginou-se que a presença de fosfato na solução de NaF poderia ter uma influência positiva no seu efeito, porém pode-se constatar pelos resultados obtidos que a solução de NaF foi ineficaz na prevenção da desmineralização e aumento da remineralização do esmalte dentário.

Além da diferença de pH, outra questão metodológica que deve ser interpretada com cautela é o tempo de contato entre os produtos e o esmalte. Na prática clínica, os vernizes são aplicados e não são removidos pelo dentista que aconselha o paciente a postergar ao máximo a alimentação e higienização bucal até

12h após a aplicação. Nos estudos laboratoriais o tempo de contato do verniz com a estrutura dentária varia de 6 às 12h (MAGALHÃES et al., 2008a; 2008b; LEE et al., 2010), com o objetivo de simular a situação clínica. Por outro lado, soluções para bochecho e géis para aplicação profissional ficam em contato direto com a superfície dentária por 1-4 minutos, sendo a solução expectorada e o excesso de gel removido após este período. Os estudos laboratoriais em geral aplicaram a solução de TiF_4 por 1 minuto (REED; BIBBY, 1976, SKARTVEIT et al., 1991; CHEVITARESE et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2008b).

Portanto, no presente estudo os vernizes foram aplicados por 6h e as soluções por 1 minuto, sendo que este procedimento foi realizado *in vitro*, uma vez que seria difícil aplicar e remover os produtos *in situ* pela presença da tela plástica no aparelho.

Para simular a desmineralização, amostras de esmalte hígidas foram expostas à solução de sacarose a 20%, 8x ao dia, para permitir a formação de uma placa dentária cariogênica que fosse capaz de causar a desmineralização do esmalte (CURY et al., 2001; PAES LEME et al., 2004, TENUTA et al., 2006; CURY et al., 2010). Para testar o potencial remineralizante dos vernizes, lesões de cárie artificiais foram produzidas *in vitro*, utilizando-se uma solução desmineralizante de Buskes, Christoffersen e Arends (1985), sendo que esta se mostrou capaz de criar lesões profundas e de subsuperfície em esmalte em estudos prévios (RIEBEN et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009a). As autoras acreditam que, para testar o potencial remineralizante de produtos com alta concentração de fluoreto (uso profissional), seja interessante a inclusão de lesões cariosas profundas em esmalte, com aspecto esbranquiçado e opaco, e não lesões rasas e brilhantes, na tentativa de manter coerência com o protocolo de indicação do verniz fluoretado na prática clínica. A maioria dos estudos laboratoriais não leva em consideração este aspecto, porém deve-se considerar que produtos remineralizantes podem ter diferentes impactos na remineralização de lesões cariosas dependendo do tipo de lesão testada. (LYNCH; TEN CATE, 2006; LYNCH; MONY; TEN CATE, 2007; LIPPERT et al., 2011). Para manter o mesmo período experimental da desmineralização, as amostras que foram submetidas à remineralização permaneceram no aparelho por 14 dias (LIPPERT et al., 2011; LAHEIJ; VAN STRIJP; VAN LOVEREN, 2010), sob placa dentária, que foi menos cariogênica que a placa dentária das amostras submetidas à desmineralização, uma vez que não houve gotejamento de sacarose neste caso

(MAGALHÃES et al., 2007). A manutenção da placa dentária sobre as amostras submetidas à remineralização teve como objetivo tentar simular a situação clínica de pacientes de alto risco à cárie dentária, os quais não conseguem manter uma higiene bucal adequada. No entanto, é importante que na prática clínica haja a associação do uso do fluoreto com as instruções ao paciente em relação à dieta e higiene bucal, especialmente no delineamento de futuros estudos *in situ* e clínicos.

Para avaliar a desmineralização e remineralização do esmalte, utilizaram-se como variáveis de resposta a microdureza superficial e longitudinal, sendo a última considerada um método indireto para avaliar a desmineralização de subsuperfície, e a microradiografia transversal, padrão ouro para se avaliar quantidade mineral. A microdureza, apesar de ser facilmente realizada utilizando-se um equipamento mais barato em comparação a outras técnicas, apresenta certas limitações para avaliação da desmineralização por cárie em esmalte tais como: não é tão sensível para medir alterações nos primeiros 10-50 μm da subsuperfície do tecido dentário, pelo tamanho da endentação (CLASEN; OGAARD, 1999; ATTIN et. al., 2005b; ATTIN, 2006), diferentemente da microradiografia transversal que mede a quantidade mineral a cada 2 μm e é imprecisa somente nos primeiros 10 μm ; não é possível mostrar se a lesão é superficial ou de subsuperfície com este método; assim como não é possível definir precisamente a profundidade da lesão pela característica acima citada e pela grande variação dos valores de microdureza do esmalte hígido (MAGALHÃES et al., 2009a). Foi considerado, como esmalte hígido, amostras com um volume mineral ao redor de 87% e com valores de microdureza acima de 270 kPa/mm^2 , com base nas análises de amostras de esmalte híginas por microradiografia transversal e microdureza longitudinal (dados não inclusos nos resultados).

Apesar da microdureza longitudinal não ser mais usada para estimar a quantidade mineral com segurança, este método pode ser utilizado para analisar lesões cariosas, uma vez que nos dá uma importante evidência sobre as propriedades mecânicas de resiliência do esmalte desmineralizado em profundidade (KIELBASSA et al., 1999; BUCHALLA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2009a). Por outro lado, a microdureza superficial deve ser evitada como variável de resposta única para lesões cariosas, visto que nosso grupo de pesquisa mostrou uma baixa correlação com os dados da microradiografia transversal para diferentes tipos de lesões produzidas *in vitro* (MAGALHÃES et al., 2009a). Portanto, os valores de

microdureza superficial podem não refletir a característica da subsuperfície da lesão, em discordância com estudos prévios que mostraram que a largura da endentação está relacionada com a quantidade mineral na camada superficial (ARENDS; LODDING; PETERSSON, 1980; WHITE, 1987; NELSON et al., 1992) e com a profundidade da lesão (ARENDS; LODDING; PETERSSON, 1980). Outra questão que deve ser refletida em relação à microdureza de superfície é a possibilidade das endentações finais serem realizadas sobre a camada depositada pelo produto fluoretado, em especial no caso do TiF_4 , e não sobre a superfície dentária, o que pode refletir em um dado de microdureza que não se refere à microdureza do esmalte. Análises por microscopia eletrônica de varredura da superfície das amostras tratadas com os diferentes fluoretos após o ensaio *in situ* seriam úteis para averiguar se a camada tipo “glaze” permaneceu sobre a superfície dentária após os desafios cariogênicos.

Apesar de não ter sido objetivo do trabalho e desta relação não ter sido avaliada do ponto de vista estatístico, os dados de microdureza superficial não foram correspondentes aos resultados obtidos com a microdureza longitudinal e microradiografia transversal especialmente no caso da remineralização do esmalte, dando mais suporte para a afirmação acima. Ainda em relação à análise geral da microdureza longitudinal e microradiografia transversal, apesar das técnicas terem induzido a conclusões similares em relação aos tratamentos, observaram-se algumas diferenças entre as mesmas. No caso da desmineralização, o verniz placebo teve efeito positivo quando a microdureza longitudinal foi avaliada, porém este resultado não foi suportado pela microradiografia transversal. No caso da remineralização, para ambos não houve diferença significativa entre os grupos nas comparações do $\Delta\Delta\text{KHN}$ e $\Delta\Delta\text{Z}$, porém a microdureza longitudinal apontou um possível papel remineralizador da solução de TiF_4 , sendo que todos os grupos levaram a uma remineralização, com exceção do controle. Já no caso da microradiografia transversal, houve um aumento da desmineralização em todos os grupos, porém diferença estatística foi vista somente para o verniz placebo e controle. Apesar das evidências estatísticas, os dados devem ser interpretados com cautela, sendo importante sempre que possível a associação de métodos para um melhor entendimento das características das lesões.

Somando os dados obtidos pelos diferentes métodos de análise, no caso da prevenção da desmineralização, os vernizes NaF e TiF_4 bem como a solução TiF_4

foram igualmente efetivos na redução da desmineralização superficial e de subsuperfície do esmalte dentário bovino. A solução de NaF foi similar ao verniz placebo e controle. Interessante é que não houve diferença entre os tipos de veículo no efeito do TiF_4 , mostrando que possivelmente o tempo de 1 minuto seja suficiente para a interação entre o TiF_4 e o esmalte ou que a fluidez da solução permita uma grande interação entre o sal fluoretado e o esmalte, compensando o curto tempo de atuação em comparação ao verniz. Já no caso do NaF, o tipo de veículo ou o tempo de atuação parece importante no efeito do sal fluoretado, isto é, é provável que mais CaF_2 tenha sido formado pelo verniz em comparação à solução de NaF.

Aplicação tópica de fluoreto induz a formação de uma camada protetora sobre o tecido dentário que pode ser composta por CaF_2 (no caso do NaF) ou por precipitados ricos em metal (no caso do TiF_4) (DIJKMAN; ARENDS, 1988; WIEGAND, MAGALHÃES; ATTIN, 2010). O TiF_4 pode promover aumento da incorporação de fluoreto ao esmalte (WEI; SOBOROFF; WEFEL, 1976; WIEGAND; MAGALHÃES; ATTIN, 2010), a substituição do cálcio da apatita por titânio e a formação de camada protetora do tipo “glaze” na superfície do esmalte composta por óxido de titânio ou fosfato de titânio hidratado (MUNDORFF; LITTLE; BIBBY, 1972; WEFEL, 1982; BÜYÜKYILMAZ et al., 1994; YU et al., 2010). Wefel (1982) afirma que o efeito do TiF_4 está mais relacionado ao “glaze” que a incorporação de fluoreto ao esmalte.

Dos resultados do presente estudo, pode ser especulado que a camada rica em CaF_2 oriunda da atuação do verniz NaF sobre o esmalte hígido seja tão eficaz quanto à camada rica em precipitados metálicos oriundos do verniz ou solução de TiF_4 na prevenção da desmineralização do esmalte *in situ*.

Resultados similares a este foram obtidos em um estudo *in situ* delineado para erosão dentária, em que não houve diferença significativa entre os sais fluoretados e os veículos (verniz e solução) sobre esmalte humano submetido à desmineralização por refrigerante, isto é, todos os produtos foram capazes de reduzir similarmente a erosão do esmalte (LEVY et al., 2011). A única diferença é que no estudo da erosão dentária *in situ*, a solução de NaF teve efeito positivo, o que pode ser devido à dinâmica de perda mineral no caso da erosão dentária, em que o CaF_2 tem uma atuação protetora mais mecânica que química, diferentemente da cárie dentária em que o fluoreto oriundo do CaF_2 liberado na interface placa

dentária e esmalte, durante o ataque ácido (TENUTA et al., 2008), pode ser incorporado à apatita, aumentando a resistência desta à dissolução.

Apesar do desenvolvimento da erosão dentária ser diferente da cárie dentária, é interessante comentar sobre este estudo acima, uma vez que os resultados obtidos foram contraditórios aos dados de todos os estudos *in vitro* realizados pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais foi testada a solução de TiF_4 a 4% na prevenção da erosão do esmalte (MAGALHÃES et al., 2008b; MAGALHÃES et al., 2011 *in press*; LEVY et al., 2011), sendo que este produto não teve efeito positivo. Na verdade, nos estudos *in vitro* a solução de TiF_4 causou perda de microdureza e um leve desgaste após a aplicação especialmente quando esta foi feita com *microbrush*, devido ao baixo pH da solução. Para minimizar este efeito colateral do uso da solução de TiF_4 , optou-se por utilizar pipeta no presente estudo, o que pode ter influenciado os resultados obtidos. Com base nos resultados dos estudos *in vitro* e *in situ*, pode-se especular que a saliva humana tenha um importante papel na estabilização dos precipitados metálicos oriundos da solução de TiF_4 , tanto quando presente antes e após a aplicação do produto, como foi o caso do estudo *in situ* para a erosão dentária; como quando presente somente após a aplicação do produto no caso do presente estudo.

Os resultados positivos deste trabalho para o TiF_4 estão de acordo com estudos *in vitro* que testaram soluções com diferentes concentrações de TiF_4 (SHRESTHA; MUNDORFF; BIBBY, 1972; WEFEL, 1982) e do estudo *in vitro* que avaliou o efeito do verniz de TiF_4 a 4% na prevenção da desmineralização do esmalte (MAGALHÃES et al., 2008a), utilizando desafios ácidos simulando a cárie dentária.

Em futuros estudos seria interessante analisar os tipos de compostos formados pela aplicação do TiF_4 bem como a presença de fluoreto fracamente e fortemente ligado ao esmalte após a aplicação dos produtos e após o ensaio *in situ*. Estes dados serão importantes para dar suporte aos achados do presente estudo e só não foram realizados no momento, por falta de amostra (metade da amostra foi utilizada para microdureza longitudinal e a outra metade, para a microradiografia) bem como de tempo para a finalização do curso do mestrado.

Apesar de não ter havido diferença estatística entre o verniz de NaF, verniz de TiF_4 e solução de TiF_4 , houve uma tendência clara para um melhor efeito do verniz de TiF_4 na prevenção da desmineralização. Este dado pode ser comprovado

com as fotos clínicas das amostras dos grupos verniz placebo que apresentaram mancha branca opaca e rugosa com as amostras submetidas ao tratamento com verniz de TiF_4 , que mostraram uma alteração de cor mais branda (Figuras 76 e 77). Adicionalmente, é importante enfatizar as vantagens do verniz em relação à solução em termos de toxicidade e aceitabilidade pelo paciente.

Portanto, seria interessante testar o efeito deste verniz experimental, variando o tipo de desafio cariogênico (tempo de experimento e frequência de sacarose) *in situ* bem como utilizá-lo em ensaios clínicos. Somente um estudo clínico foi realizado testando solução de TiF_4 1% para a prevenção de lesões cariosas em dentição decídua de crianças que receberam de um lado da boca a solução de TiF_4 e do outro lado da boca tratamento com gel FFA (fluoreto fosfato acidulado), que mostrou superioridade do TiF_4 em relação ao APF após 3 anos de controle (REED; BIBBY, 1976). Skartveit e colaboradores (1991), em um estudo com ratos, concluíram que o efeito preventivo do TiF_4 foi pelo menos tão bom quanto ao do NaF sobre a incidência de cárie dentária. Diante ao fato que existem poucos estudos *in situ* e clínicos, há necessidade da realização de mais estudos sobre o efeito do TiF_4 na prevenção ou controle da cárie dentária.

Considerando que os dados do estudo *in vitro* com o verniz de TiF_4 mostraram que este foi igualmente efetivo quando comparado ao verniz de NaF na redução da desmineralização da subsuperfície, mas foi mais efetivo no aumento da remineralização da superfície e subsuperfície do esmalte (MAGALHÃES et al., 2008a), decidiu-se testar o potencial remineralizante deste verniz experimental *in situ*. Os resultados do presente estudo foram similares aos dados do estudo clínico de Seppa e colaboradores (1983), porém opostos ao estudo prévio realizado *in vitro* (MAGALHÃES et al., 2008a).

Observou-se que o protocolo experimental escolhido não permitiu uma adequada remineralização de subsuperfície *in situ*. De fato, só houve uma ligeira remineralização de superfície em torno de 5% no grupo controle e de 17% no grupo do verniz de TiF_4 . Devemos considerar, no caso das amostras tratadas, que os dados de microdureza de superfície final podem refletir em parte a camada produzida pelos fluoretos e não necessariamente o esmalte. Independentemente desta possibilidade, foi possível visualizar as endentações iniciais após o tratamento e ensaio *in situ*, apontando para a possibilidade da inexistência da camada após o experimento. Interessante é que as Figuras 78 e 79 não mostram uma diferença

nítida entre as amostras desmineralizadas e tratadas com verniz placebo e verniz de TiF_4 , respectivamente, como as Figuras 76 e 77. Adicionalmente, as amostras desmineralizadas tratadas com verniz de TiF_4 apresentaram-se mais amareladas ao final do experimento, o que pode ser considerado um efeito colateral do tratamento. Não se tentou remover a coloração amarelada da superfície do esmalte após o experimento, para evitar a possibilidade de cavitação.

Apesar dos dados de microdureza longitudinal terem apontado para uma possível remineralização de subsuperfície, os valores de $\Delta\Delta\text{KHN}$ foram muito baixos em comparação ao ΔKHN lesão, mostrando que estes valores podem ser irrelevantes, sendo que só houve diferença entre ΔKHN lesão e ΔKHN efeito no caso da solução de TiF_4 , dado que não foi suportado pelos achados da microradiografia. Em contraste, a microradiografia apontou para uma tendência ao aumento da desmineralização das amostras previamente desmineralizadas, especialmente para aquelas que não receberam tratamento com o fluoreto. Da mesma forma que na microdureza longitudinal, os valores de $\Delta\Delta Z$ foram mínimos em comparação aos valores de ΔZ lesão.

Somando os dados obtidos e observando-se as figuras das microradiografias (Figuras 62-67), pode-se afirmar que de fato não houve remineralização. Se não houve remineralização nem das amostras sem tratamento (controle) que foram expostas à cavidade bucal por 14 dias, como era esperado, nenhuma conclusão a respeito do potencial remineralizante dos produtos pode ser dada. Se no grupo controle tivesse havido remineralização e nos grupos tratados não, poder-se-ia concluir que os tratamentos com os produtos fluoretados foram ineficazes; porém como isso não ocorreu, há necessidade de se encontrar um protocolo que permita uma adequada remineralização pela saliva, para a comparação entre o controle e os tratamentos. A hipótese para justificar a ausência de remineralização pode ser dada pela presença da placa dentária (*like* biofilme), que apesar de não ser tão cariogênica como a placa dentária submetida à sacarose, pode ter servido como uma barreira para a atuação da saliva na remineralização subsuperficial. Este achado reforça a importância da atuação do dentista na educação do paciente em relação aos hábitos de higiene bucal, uma vez que somente a aplicação do verniz fluoretado pode ser ineficaz para o tratamento de lesões iniciais de cárie quando há acúmulo de placa dentária.

Ainda devemos considerar a possibilidade dos microorganismos presentes nesta placa dentária terem metabolizado os nutrientes oriundos da saliva, produzindo ácidos em proporções obviamente muito menores que a placa submetida às aplicações de sacarose. Quando os dados obtidos das amostras hígidas submetidas à desmineralização são comparados às amostras des-remineralizadas, percebe-se uma grande variabilidade entre os voluntários nesta última condição, isto é, um grande desvio-padrão das médias obtidas nos grupos experimentais. Em princípio pode-se pensar que a lesão de esmalte provocada *in vitro* não seria homogênea, porém ao se analisar com detalhes os parâmetros de microdureza e volume mineral da porção somente desmineralizada das amostras, pode-se concluir que a lesão não foi responsável pela grande variabilidade entre voluntários, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros iniciais. A grande variabilidade vista após a fase *in situ* reduziu expressamente a força amostral. Na verdade, acredita-se que a grande variabilidade entre voluntários se deva a questões biológicas como quantidade e qualidade da microbiota bucal, que foi minimizada na placa dentária submetida à solução de sacarose (condição de alto desafio cariogênico). Nesta placa submetida à sacarose provavelmente houve uma seleção da microbiota mais acidôgena e acidúrica (TENUTA et al., 2006), isto é, houve um nivelamento da microbiota que compôs a placa dentária. No caso da placa dentária não submetida à sacarose, não houve tal nivelamento, aumentando a possibilidade da microbiota da placa dentária ser um reflexo da microbiota do hospedeiro, sendo que esta característica não foi avaliada no presente estudo. Alguns estudos já testaram o efeito de diferentes tipos de açúcar e frequência de exposição na composição da placa dentária especialmente em relação aos *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* (CURY et al., 2001; CURY et al., 2003; TENUTA et al., 2006; AIRES et al., 2006; CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; VALE et al., 2007; ARTHUR et al., 2007; DUARTE et al., 2008), porém a hipótese levantada na discussão ainda não foi testada e deve ser avaliada no futuro, comparando a variabilidade da microbiota da placa dentária submetida ou não à sacarose para o mesmo voluntário. Se esta variabilidade da microbiota realmente tiver impacto na resposta em relação à remineralização, deve-se pensar em aumentar o número amostral nos próximos estudos.

Dessa forma, futuros estudos deverão testar diferentes protocolos *in situ* para avaliar o potencial remineralizante dos vernizes fluoretados em diferentes tipos de

lesões cariosas artificiais, na ausência e presença de placa dentária com diferentes espessuras, na presença e ausência de sacarose (diferentes frequências de exposição e tempos experimentais) e dentifrício fluoretado.

Além do estudo *in vitro* que testou o potencial do TiF_4 na remineralização do esmalte desmineralizado (MAGALHÃES et al., 2008a), Chevitarese e colaboradores (2004) mostraram que o esmalte humano hígido teve uma maior tendência, mesmo que não significativa, para a incorporação de titânio em profundidade que o esmalte artificialmente desmineralizado em contraposição com o efeito visto no estudo de Magalhães e colaboradores (2008a). Exterkate e Ten Cate (2007) mostraram que tratamentos diários/ semanais com várias concentrações de TiF , derivado do TiF_4 , (100, 250 e 500 ppm F^- , pH 3,0) foram mais efetivos na redução da progressão da desmineralização do esmalte previamente desmineralizado em relação ao tratamento com NaF com concentrações de fluoreto e pH similares.

Apesar de poucos estudos *in situ* testando o efeito de vernizes fluoretados na remineralização de lesões cariosas (ATTIN et al., 2005a; ATTIN et al., 2007; Lee et al., 2010), há um número expressivo de estudo clínicos que dão suporte ao uso do verniz de NaF na remineralização de manchas brancas (SEPPA, TUUTTI; LUOMA, 1982; SEPPA et al., 1983; PETERSSON et al., 1991; AUTIO-GOLD; COURTS, 2001; HAUSEN et al., 2007; FERREIRA et al., 2009). Já em relação ao verniz de TiF_4 , há necessidade de mais estudos *in situ*, para confirmar se este produto é efetivo e se realmente é capaz de alterar a cor do esmalte, como aconteceu no presente estudo (efeito colateral), antes da sua utilização clínica, especialmente voltada para o tratamento de lesões iniciais. Ainda é importante a obtenção de dados em relação à citotoxicidade do TiF_4 . Nosso grupo de pesquisa investigou o efeito do TiF_4 (pH 1,2 e 4,5) e NaF (pH 4,5 e 10), em concentrações de F^- variando entre 0,61 a 2,45%, na viabilidade e morfologia de fibroblastos. 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. Pôde-se concluir que os fluoretos apresentam potencial citotóxico similar, independentemente da concentração de fluoreto e pH (dados não publicados). Apesar de estes resultados apontarem para um potencial citotóxico similar entre NaF e TiF_4 , mais estudos devem ser realizados para a confirmação desses efeitos, anteriormente à realização de ensaios clínicos.

Por fim, os resultados deste estudo devem ser futuramente confirmados *in vivo*, considerando a variabilidade biológica entre os indivíduos e uma possível interação diferencial entre os agentes fluoretados e o esmalte humano hígido e com lesão cariiosa inicial.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve as seguintes conclusões:

- O vernizes NaF, TiF_4 e solução TiF_4 foram capazes de reduzir significativamente a desmineralização superficial e de subsuperfície do esmalte dentário bovino em comparação à solução NaF, verniz placebo e controle;
 - O verniz e solução de TiF_4 foram capazes de aumentar significativamente a remineralização superficial do esmalte dentário bovino previamente desmineralizado em comparação ao verniz e solução de NaF, verniz placebo e controle. O protocolo experimental não permitiu uma adequada remineralização de subsuperfície *in situ*.
-
-

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.

Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006;40(1):28-32.

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.

Arthur RA, Tabchoury CP, Mattos-Graner Rde O, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Vale GC, Cury JA. Genotypic diversity of *S. mutans* in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure. *Braz Dent J.* 2007;18(3):185-91.

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.* 2005a Mar;50(3):317-22.

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.

Attin T, Vollmer D, Wiegand A, Attin R, Betke H. Subsurface microhardness of enamel and dentin after different external bleaching procedures. *Am J Dent*. 2005b Feb;18(1):8-12.

Attin T. Methods for assessment of dental erosion. *Monogr Oral Sci*. 2006;20:152-72.

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.

Beltrán-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.

Buchalla W, Imfeld T, Attin T, Swain MV, Schmidlin PR. Relationship between nanohardness and mineral content of artificial carious enamel lesions. *Caries Res*. 2008;42(3):157-63.

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.

Büyükyılmaz T, Ogaard B, Rølla 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.

Büyükyılmaz T, Tangugsorn V, Ogaard B, Arends J, Ruben J, Rølla G. The effect of titanium tetrafluoride (TiF₄) application around orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1994 Mar;105(3):293-6.

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, pp. 111-162.

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.

Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res*. 2007;41(1):9-15.

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.

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

Clasen AB, Ogaard B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta Odontol Scand*. 1999 Dec;57(6):334-41.

Cury JA, do Amaral RC, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Low-fluoride toothpaste and deciduous enamel demineralization under biofilm accumulation and sucrose exposure. *Eur J Oral Sci*. 2010 Aug;118(4):370-5.

Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. In situ study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. *Braz Dent J*. 2001;12(2):101-4.

Cury JA, Marques AS, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. *Braz Dent J*. 2003;14(3):147-52.

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 TG, Arends J. The role of 'CaF₂-like' material in topical fluoridation of enamel in situ. *Acta Odontol Scand*. 1988 Dec;46(6):391-7.

Dohnke-Hohrmann S, Zimmer S. Change in caries prevalence after implementation of a fluoride varnish program. *J Public Health Dent*. 2004 Spring;64(2):96-100.

Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Jun;23(3):206-12.

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, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res*. 1983;17(5):385-91.

Ferreira JM, Aragão AK, Rosa AD, Sampaio FC, Menezes VA. Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions: a randomized clinical trial. *Braz Oral Res*. 2009 Oct-Dec;23(4):446-51.

Furlani TA, Magalhães AC, Iano FG, Cardoso VE, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on enamel and on dental plaque formed in situ. *Oral Health Prev Dent*. 2009;7(1):23-8.

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

Hausen H, Seppä L, Poutanen R, Niinimaa A, Lahti S, Kärkkäinen S, Pietilä I. Noninvasive control of dental caries in children with active initial lesions. A randomized clinical trial. *Caries Res*. 2007;41(5):384-91.

Hicks J, Wild T, Flaitz CM, Seybold S. Fluoride varnishes and caries development in primary tooth enamel: an in vitro study. *ASDC J Dent Child*. 2001 Sep-Dec;68(5-6):304-10, 300.

Holm AK. Effect of fluoride varnish (Duraphat) in preschool children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1979 Oct;7(5):241-5.

Honório HM, Rios D, Santos CF, Magalhães AC, Delbem AC, Buzalaf MA, Machado MA. Cross-sectional microhardness of human enamel subjected to erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges. *Caries Res*. 2010;44(1):29-32. Epub 2010 Jan 15.

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.

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.

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.

Kielbassa AM, Wrbas KT, Schulte-Mönting J, Hellwig E. Correlation of transversal microradiography and microhardness on in situ-induced demineralization in irradiated and nonirradiated human dental enamel. *Arch Oral Biol*. 1999 Mar;44(3):243-51.

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.

Laheij AM, van Strijp AJ, van Loveren C. In situ remineralisation of enamel and dentin after the use of an amine fluoride mouthrinse in addition to twice daily brushings with amine fluoride toothpaste. *Caries Res.* 2010 Jul;44(3):260-6.

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.

Levy FM, Magalhães AC, Rios D, Buzalaf MAR. Effect of NaF and TiF₄ on dental erosion/abrasion in situ. In: Abstract 3381 of IADR general Session; 2011 March 16-19; San Diego, California.

Lippert F, Lynch RJ, Eckert GJ, Kelly SA, Hara AT, Zero DT. In situ Fluoride Response of Caries Lesions with Different Mineral Distributions at Baseline. *Caries Res.* 2011;45(1):47-55.

Lynch RJ, Mony U, ten Cate JM. Effect of lesion characteristics and mineralizing solution type on enamel remineralization in vitro. *Caries Res.* 2007;41(4):257-62.

Lynch RJ, Ten Cate JM. The effect of lesion characteristics at baseline on subsequent de- and remineralisation behaviour. *Caries Res.* 2006;40(6):530-5.

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, Furlani Tde A, Italiani Fde M, Iano FG, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on remineralisation of artificially demineralised enamel and on the composition of the dental biofilm formed in situ. *Arch Oral Biol.* 2007 Dec;52(12):1155-60.

Magalhães AC, Kato MT, Rios D, Wiegand A, Attin T, Buzalaf MA. 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.* 2009a;43(6):474-83.

Magalhães AC, Romanelli AC, Rios D, Comar LP, Navarro RS, Grizzo LT, Aranha ACA, Buzalaf MAR. Effect of a single application of TiF_4 and NaF varnishes and solutions combined with Nd:YAG laser irradiation on enamel in vitro. *Photomed Laser Surg.* In press 2011.

Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Hannas A, Attin T, Buzalaf MA. Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *J Dent.* 2009b Dec;37(12):994-8.

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

Margolis HC, Moreno EC. Physicochemical perspectives on the cariostático mechanisms of systemic and topical fluorides. *J Dent Res.* 1990 Feb;69 Spec No:606-13.

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.

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.

Munshi AK, Reddy NN, Shetty V. A comparative evaluation of three fluoride varnishes: an in-vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2001 Sep;19(3):92-102.

Nelson DG, Coote GE, Shariati M, Featherstone JD. High resolution fluoride profiles of artificial in vitro lesions treated with fluoride dentifrices and mouthrinses during pH cycling conditions. *Caries Res*. 1992;26(4):254-62.

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.

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.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res*. 2004 Jan;83(1):71-5.

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 (1997). Fluoride varnish for community-based caries prevention in children. World Health Organization:Geneva, pp 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.

- Petersson LG. In vivo fluorine uptake in human enamel following treatment with a varnish containing sodium fluoride. *Odontol Revy*. 1975;26(4):253-66.
- 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 hydroxyapatite 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.
- Rølla G, Ogaard B, Cruz Rde A. Topical application of fluorides on teeth. New concepts of mechanisms of interaction. *J Clin Periodontol*. 1993 Feb;20(2):105-8.
- Rølla G, Saxegaard E. Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides, with emphasis on the role of calcium fluoride in caries inhibition. *J Dent Res*. 1990 Feb;69 Spec No:780-5.
- 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.
- 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, Forss H, Sormunen P. Prevention of rat fissure caries by sodium fluoride varnish (Duraphat) with different fluoride concentrations. *Caries Res*. 1989;23(5):365-7.
- 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.

Skartveit L, Spak CJ, Tveit AB, Selvig KA. Caries-inhibitory effect of titanium tetrafluoride in rats. *Acta Odontol Scand.* 1991 Apr;49(2):85-8.

Spiguel MH, Tovo MF, Kramer PF, Franco KS, Alves KM, Delbem AC. Evaluation of laser fluorescence in the monitoring of the initial stage of the de-/remineralization process: an in vitro and in situ study. *Caries Res.* 2009;43(4):302-7.

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.

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, Pearc EIF, Fejerskov O: Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In Fejerskov O, Kidd EAM (eds): *Dental Caries: The Disease and it's clinical management*. Oxford; Blackwell Munksgaard, 2003:49-69.

ten Cate JM. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):254-7.

ten Cate JM. In situ models, physico-chemical aspects. *Adv Dent Res*. 1994 Jul;8(2):125-33.

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, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. *J Dent Res*. 2008 Nov;87(11):1032-6.

Tenuta LM, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Res*. 2006;40(6):546-9.

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.

Tveit AB, Hals E, Isrenn R, Tötdal B. Highly acid SnF₂ and TiF₄ solutions. Effect on and chemical reaction with root dentin in vitro. *Caries Res*. 1983;17(5):412-8.

Vale GC, Tabchoury CP, Arthur RA, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Cury JA. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Res*. 2007;41(5):406-12.

van Rijkom H, Ruben J, Vieira A, Huysmans MC, Truin GJ, Mulder J. Erosion-inhibiting effect of sodium fluoride and titanium tetrafluoride treatment in vitro. *Eur J Oral Sci*. 2003 Jun;111(3):253-7.

van Rijkom HM, Truin GJ, van 't Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res*. 1996 Feb;75(2):790-5.

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.

Wefel JS. Artificial lesion formation and fluoride uptake after TiF_4 applications. *Caries Res*. 1982;16(1):26-33.

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

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.

White DJ, Featherstone JD. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. *Caries Res*. 1987;21(6):502-12.

White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res*. 1987;21(2):126-40.

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

Wiegand A, Magalhães AC, Sener B, Waldheim E, Attin T. TiF_4 and NaF at pH 1.2 but not at pH 3.5 are able to reduce dentin erosion. *Arch Oral Biol*. 2009b Aug;54(8):790-5.

Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhães AC, Attin T. Comparison of the effects of TiF_4 and NaF solutions at pH 1.2 and 3.5 on enamel erosion in vitro. *Caries Res.* 2009a;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.

Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res.* 1995 Nov;9(3):214-30.

Anexos

ANEXO A

Ofício de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 058/2009

Bauru, 16 de junho de 2009.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado: **"Comparação do efeito de TIF4 e NaF, nas formas de verniz e solução, sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dentário bovino in situ"**, de autoria de Lívia Picchi Comar, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 29 de abril de 2009 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta

Coordenadora

Profª Drª Ana Carolina Magalhães

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B

CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA

Nome do sujeito da pesquisa: _____

1 - Título do Trabalho Experimental

Comparação do efeito de TiF_4 e NaF, nas formas de verniz e solução, sobre a desmineralização e remineralização do esmalte dentário bovino *in situ*

2 - Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar do efeito da aplicação de um verniz experimental de TiF_4 a 4%, comparando-o a outros agentes fluoretados, sobre o processo de des-mineralização do esmalte dentário bovino *in situ*.

3 - Procedimentos da Fase Experimental

Vocês utilizarão, durante três fases de 14 dias 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 4 blocos de dente bovino previamente esterilizados e tratados com diferentes agentes fluoretados (2 fileiras horizontais de 2 blocos). Sobre os blocos será fixada uma tela plástica com objetivo de acumular placa bacteriana. Durante cada período, vocês terão que aplicar uma gota de solução de sacarose a 20% por bloco, 8 vezes ao dia, por 5 minutos, fora da boca, nos blocos que estarão fixados com cera que não seja a vermelha. Na seqüência, o aparelho deverá ser reinserido na boca. O aparelho só poderá ser removido para a realização do experimento e para as principais refeições (café da manhã, almoço, lanche e jantar, 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. Durante o uso do aparelho, nenhum tipo de alimento ou bebida poderá ser ingerido, exceto água. Durante o experimento, vocês utilizarão dentífrício sem flúor.

4 - Benefícios do Experimento

Produtos fluoretados, dentre estes podemos citar mousses, soluções, géis e vernizes, têm sido testados para a prevenção da cárie dentária. Os vernizes parecem possuir um bom efeito protetor devido à sua adesão à superfície do esmalte, o que prolonga o tempo de contato entre flúor e esmalte. A idéia 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 comparados ao NaF e AmF sobre a desmineralização dentária. Espera-se que este verniz de tetrafluoreto de titânio possa apresentar um melhor efeito preventivo sobre a cárie dentária que os produtos já disponíveis no mercado, beneficiando a população de alto risco ao aparecimento da lesão.

5 - Riscos do Experimento

Devido ao acúmulo de placa bacteriana no aparelho, o voluntário poderá apresentar uma leve inflamação das amígdalas.

Fica claro que o voluntário pode, 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 sujeito da pesquisa pode recorrer a qualquer um dos membros da equipe do projeto (Laboratório de Bioquímica 14-3235-8246 ou Livia tel: 14-81260040). 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 Biblioteca, FOB/USP) ou pelo telefone (14)3235-8356.

ANEXO C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o senhor(a) _____, portador(a) da cédula de identidade número _____, após leitura minuciosa da TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pela profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

Fica claro que o sujeito 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 tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Bauru, _____ de _____ de 2009.

Sujeito da pesquisa

Livia Picchi Comar

Autora

ANEXO D

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 dental e dentífrico não fluoretado, fornecidos pela autora do trabalho.
 3. A pesquisa será composta por três fases de 15 dias cada uma, com 7 dias de descanso entre elas.
 4. Os voluntários deverão utilizar um dispositivo bucal palatino e só o removerão 4 vezes ao dia (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 deionizada fornecida pela autora do trabalho.
 6. Durante o uso do dispositivo, nenhum tipo de alimento ou bebida poderá ser ingerido, exceto água (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 verde (2 blocos), 8 vezes ao dia, com um intervalo de 2 horas entre as aplicações. Portanto, serão 2 gotas/vez/aparelho a cada 2 horas. Nada deverá ser realizado nos blocos da fileira vermelha.
 10. Muito cuidado deverá ser tomado para que a solução de sacarose aplicada na fileira verde não escorra para a fileira vermelha. Esse cuidado é de extrema importância.
 11. 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.
 12. Quando qualquer material estiver acabando, entrar em contato com a autora, para que este seja repostado.
-

13. 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.
14. Qualquer dúvida, entrar em contato com a autora do trabalho pelos telefones abaixo:

Lívia Comar
Celular: (14) 81260040
Residência Bauru: (14) 32060193
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 deionizada.
 - 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 **VERDE** (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. **Nada deverá ser realizado** na fileira **VERMELHA**.

Obs: Ao fazer a aplicação de sacarose na fileira VERDE, tomar o máximo de cuidado para que esta não escorra para a fileira VERMELHA.

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

Muito grata.

Lívia Comar